

Avaliação do Potencial de Solubilização de Fosfato de Ferro *in vitro* por Bactérias e Fungos do Solo

Eliane A. Gomes¹, Ubiana C. Silva², Ubiraci G. P. Lana¹ e Ivanildo E. Marriel¹

¹Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG 35701-970.

²Centro Universitário UNIFEMM, Sete Lagoas, MG 35701-242

Palavras-chave: microrganismos, solubilização de fósforo, fosfato de ferro.

Introdução

A expansão das fronteiras agrícolas das regiões do Cerrado brasileiro tem sido relevante para garantir o desenvolvimento agrário do País, visto que, em 2008, um total de 12 milhões de hectares deste bioma já era ocupado pela produção de milho, soja, arroz, feijão e café (IBGE, 2008). Entretanto, o avanço da agricultura nesta região é dificultado pelas características dos solos, que são compostos por cerca de 46% de latossolos, que apresentam alto grau de intemperismo e, portanto, baixos níveis de fertilidade natural, em particular de fósforo (P) (NOVAIS; SMYTH, 1999).

Segundo Souza et al. (2004), dentre os macronutrientes requeridos pelas plantas, o fósforo é o que mais limita a produtividade agrícola nacional devido a sua baixa disponibilidade nos solos em condições naturais. Este elemento pode ser encontrado em duas formas no solo, fósforo inorgânico e fósforo orgânico, de acordo com o composto a que está ligado. O fósforo inorgânico é composto pelos minerais primários, P adsorvido e pequenas quantidades de P da solução do solo. O P adsorvido pode ser encontrado ligado a vários minerais do solo devido a sua elevada capacidade de formar complexos de alta energia de ligação. Nestes complexos, as formas de P no solo podem estar ligadas a óxidos de ferro (Fe), de alumínio (Al) e a silicatos de alumínio nos solos ácidos e ligadas a carbonato de cálcio nos solos alcalinos (NOVAIS; SMYTH, 1999). Alguns estudos têm demonstrado que, independente da cobertura vegetal, há um predomínio de fosfato de ferro nos solos brasileiros agricultáveis (BARROSO; NAHAS, 2005). Dessa forma, verifica-se que, apesar de grande parte desses solos apresentarem teores elevados de P total, a maior concentração deste nutriente é encontrada em formas pouco solúveis, sendo, portanto, indisponíveis para as plantas.

Os microrganismos, assim como as plantas e os animais, estão envolvidos no ciclo do fósforo. Neste processo, ocorre a absorção do P pelas plantas, mineralização e solubilização de fosfatos mediada pela atividade microbiana, além da imobilização pela adsorção dos compostos de P pelas argilas, óxidos e hidróxidos do solo.

Comunidades microbianas, que apresentam capacidade de solubilizar fontes de fósforo de baixa solubilidade, têm sido isoladas e avaliadas com o objetivo de melhorar a biodisponibilidade deste nutriente no sistema solo-planta. Entretanto, a maioria dos estudos sobre a utilização de microrganismos nestes processos tem contemplado fosfatos de cálcio, sendo escassos os que abordam a solubilização de fosfato de ferro que, por sua vez, constitui uma das formas predominantes e de menor solubilidade de P nos solos de Cerrado brasileiro (BARROSO; NAHAS, 2008).

Portanto, uma maior compreensão da diversidade, eficiência e capacidade da comunidade microbiana do solo em solubilizar fosfato de ferro poderá favorecer a seleção e



identificação de estirpes potencialmente úteis para disponibilizar o P agregado a essa fonte de baixa solubilidade para o uso na agricultura, principalmente nos solos do Cerrado.

Neste contexto, este trabalho objetiva selecionar, avaliar e caracterizar estirpes de microrganismos com potencial de solubilização de fosfato de ferro, visando uma possível utilização em programas de biofertilização de P para agricultura nos solos tropicais brasileiros.

Material e Métodos

As estirpes microbianas avaliadas quanto à capacidade de solubilização de fosfato de ferro foram retiradas da Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo. Estes acessos foram obtidos a partir de solo rizosférico de genótipos de milho contrastantes para eficiência no uso de P (OLIVEIRA et al., 2009). As culturas foram reativadas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA: batata (200 g L⁻¹), dextrose (20 g L⁻¹) e ágar (15 g L⁻¹). Em seguida, avaliou-se o potencial de solubilização de 15 isolados, 12 fungos e 3 bactérias, em meio de cultura líquido NIBRIP (NAUTIYAL, 1999) acrescido de 2g L⁻¹ de fosfato de ferro (FePO₄).

Alíquotas de 0,5 mL de suspensão bacteriana (10⁸ células mL⁻¹) e cinco discos de micélio de 8 mm dos fungos foram transferidas, individualmente, para erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura líquido e 0,1g de fosfato de ferro como fonte de P. Estabeleceu-se como controles o meio de cultura e o meio de cultura mais o fosfato de ferro sem inóculo. Os tratamentos foram incubados a 28°C com agitação por 10 dias, sendo utilizadas três repetições para cada tratamento.

Após o período de incubação de 10 dias, as culturas foram centrifugadas (5.000g x 10 min) e o sobrenadante filtrado em papel filtro Whatman n°42. Para quantificar o P solúvel foi utilizado o método colorimétrico de Murphy e Riley (1962), subtraindo-se o P solúvel contido na amostra controle (meio de cultura com fosfato de ferro sem inoculação). Determinou-se também o pH no sobrenadante filtrado de todas as amostras, incluindo os controles.

Efetou-se a caracterização molecular de todas as estirpes através da extração do DNA genômico dos isolados, seguido de amplificação por PCR. As bactérias foram caracterizadas com base na sequência de nucleotídeos da região 16S rDNA (DNA ribossômico) utilizando-se os *primers* F968 e R1401 (NUBEL et al., 1996) e os fungos baseados na região ITS (espaçador interno transcrito) do rDNA utilizando-se os *primers* universais ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990).

Os produtos da amplificação foram removidos do gel, purificados usando o kit “QIAquick Gel Extraction” (Qiagen, Alemanha) e sequenciados utilizando a técnica do “Big Dye Terminator” (Applied Biosystems, Foster City, CA). As amostras foram analisadas no sequenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) e as sequências de nucleotídeos editadas e comparadas com sequências depositadas no banco de dados *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando o programa Blast N (ALTSCHUL et al., 1997).

Os ensaios foram analisados segundo o delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade utilizando-se o programa Sisvar (FERREIRA, 1998).



Resultados e Discussão

Os resultados da eficiência da biossolubilização do fosfato de ferro (FePO_4) em relação ao controle podem ser visualizados na Figura 1. De acordo com esses resultados,

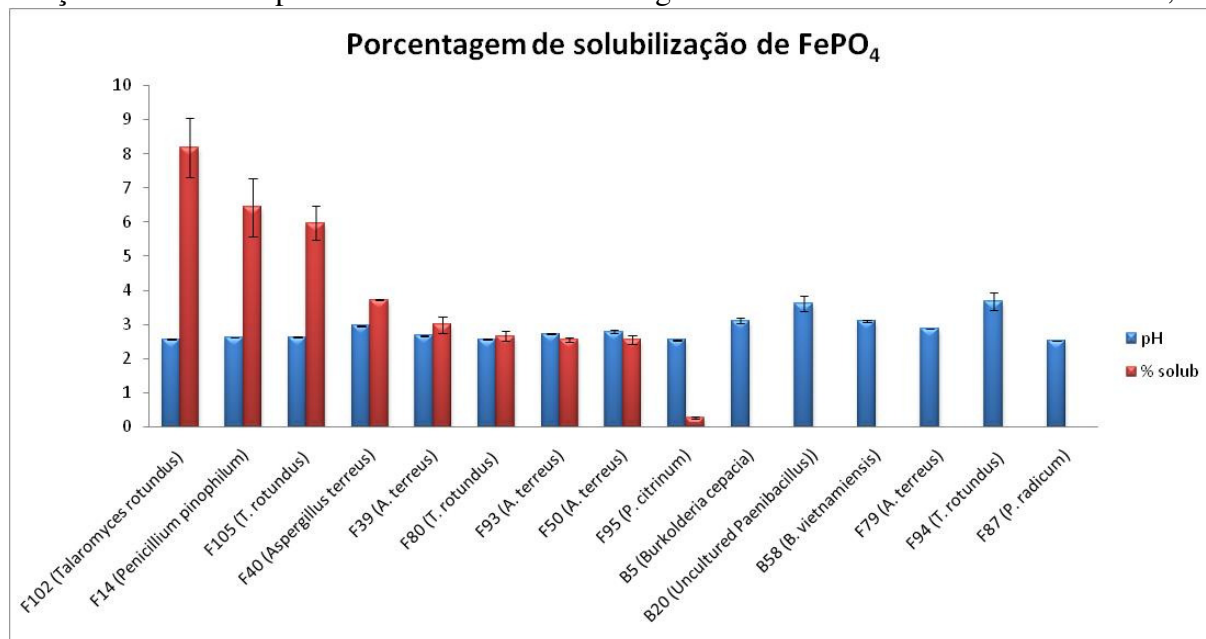


Figura 1. Avaliação da porcentagem de solubilização de FePO_4 e pH final do meio de cultura de bactérias e fungos isolados de solo rizosférico de milho.

observou-se variação significativa ($p < 0,05$) no potencial de disponibilizar P entre as estirpes avaliadas. A maior solubilização de P foi observada entre os fungos, sendo os isolados F102 identificados como *Talaromyces rotundus*, F14 (*Penicillium pinophilum*) e F105 (*T. rotundus*), os mais eficientes, liberando, respectivamente, 8,19; 6,43 e 5,97% do fósforo total, após 10 dias de crescimento.

Este resultado pode ser atribuído à melhor adaptação dos isolados fúngicos ao meio de cultura, que apresentou caráter ácido após o período de incubação evidenciando uma maior habilidade desse grupo de microrganismos em produzir metabólitos acidificantes para solubilização do fosfato. Além disso, no tratamento controle, incubado por 10 dias sem inóculo, foi observado um pH próximo a 4, indicando que a adição de FePO_4 acidificou o meio de cultura. Esses dados estão de acordo com Souchie et al. (2005), que observaram maior capacidade de solubilização de fosfato de Araxá e fosfato de alumínio dos isolados fúngicos comparados às bactérias avaliadas. Entretanto, há poucos estudos que abordaram a solubilização do FePO_4 e os resultados não foram tão satisfatórios quando comparados com outros fosfatos. Por exemplo, a solubilização de hidroxiapatita por *P. rugulosum* foi mais eficiente do que a dos fosfatos de ferro ou de alumínio (REYES et al., 1999).

De acordo com os resultados da determinação do pH, observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os isolados avaliados. De modo geral, os fungos apresentaram maior redução do pH no meio de cultura após o período de incubação, com alguns isolados fúngicos apresentando pH com valores próximos a 2,5. Esses dados demonstram uma relação inversa entre a solubilização de P e os valores de pH no meio de cultura para os fungos testados ($R^2 = -0,50$). Segundo Barroso e Nahas (2008), a produção de ácidos foi o principal mecanismo de solubilização do FePO_4 por *Aspergillus niger*, com base na correlação positiva



e significativa entre a produção de fosfato e a acidez. Ácidos orgânicos podem atuar na complexação do cátion do fosfato inorgânico, permitindo a liberação do fosfato solúvel no meio. Esse mecanismo tem sido amplamente utilizado por diversas espécies de fungos (VASSILEV et al., 2006).

Segundo Stamford et al. (2002), os microrganismos podem também permitir uma maior disponibilidade de fosfato através da produção de ácido sulfúrico, podendo reduzir o pH do solo. Massenssini (2007) relata variação dos valores finais do pH no meio de cultura de 3,7 a 3,9 entre os microrganismos avaliados na solubilização de fosfato de ferro, porém, segundo este autor, esta redução não foi significativa quando foi comparada com as amostras controle. Neste trabalho, o fosfato de ferro foi a fonte de P menos solubilizada pela microbiota do solo comparado ao fosfato de cálcio e de alumínio, com valor médio de 141,22µg/L de P.

Os isolados foram identificados utilizando-se a sequência de nucleotídeos da subunidade 16S do DNA ribossomal (rDNA) para bactérias e a região ITS do rDNA para os fungos. Os resultados da caracterização molecular dos isolados avaliados quanto à eficiência na solubilização de fosfato de ferro podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização molecular dos isolados avaliados quanto à eficiência na solubilização de FePO₄

Isolado	Espécie	Acesso GenBank	E-value	Similaridade	Táxon
B5	<i>Burkholderia cepacia</i>	EF602558	0.0	98%	Bactéria
B20	Uncultured <i>Paenibacillus</i>	EU647536	1e-115	99%	Bactéria
B58	<i>B. vietnamiensis</i>	FJ669165	0.0	98%	Bactéria
F50	<i>Aspergillus terreus</i>	GU256759	0.0	99%	Fungo
F102	<i>Talaromyces rotundus</i>	EU497950	0.0	97%	Fungo
F105	<i>T. rotundus</i>	AF285115	0.0	95%	Fungo
F40	<i>A. terreus</i>	GU256759	0.0	99%	Fungo
F79	<i>A. terreus</i>	GU594778	0.0	98%	Fungo
F80	<i>T. rotundus</i>	EU497950	0.0	94%	Fungo
F93	<i>A. terreus</i>	AB369899	0.0	97%	Fungo
F94	<i>T. rotundus</i>	AF285115	0.0	94%	Fungo
F87	<i>Penicillium radicum</i>	EU262660	0,0	97%	Fungo
F14	<i>P. pinophilum</i>	GU595046	0.0	98%	Fungo
F39	<i>A. terreus</i>	AJ001333	0.0	99%	Fungo
F95	<i>P. citrinum</i>	GU256955	0.0	97%	Fungo

Dentro os fungos, os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* têm sido considerados os mais eficientes no processo de solubilização de P. Silva Filho et al (2002), por exemplo, numa avaliação de 56 isolados de microrganismos solubilizadores de fosfatos naturais, verificaram melhor desempenho de estirpes que pertenciam a esses gêneros. A análise da eficiência de solubilização do FePO₄, pelo fungo *Aspergillus niger* em meio de cultura com variadas fontes de carbono, de nitrogênio e de fosfato, demonstrou que a solubilização do FePO₄, depende da



fase de crescimento do fungo e que concentrações acima de $330 \mu\text{g mL}^{-1}$ de $(\text{PO}_4)^{-3}$ comprometem o potencial de solubilização deste isolado (BARROSO; NAHAS, 2008).

Conclusões

1. Os fungos apresentaram maior potencial de solubilização de FePO_4 do que as bactérias.
2. Os isolados fúngicos F102 e F105 identificados como *Talaromyces rotundus* e F14, identificado como *Penicillium pinophilum*, foram os mais eficientes na solubilização de FePO_4 , após 10 dias de crescimento.
3. A adição de FePO_4 ao meio de cultura e posterior incubação por 10 dias acidificaram o meio de cultura, dificultando o crescimento de bactérias.

Agradecimentos

O projeto contou com recursos da Fundação McKnight, FAPEMIG e Embrapa

Referências

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, 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.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 29, p. 73-83, 2005.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, p. 529-535, 2008.

FERREIRA, D. N. **Sistema de análise estatística para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 1998.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home>>. Acesso em: 20 nov. 2008.

MASSENSINI, A. M. **Solubilização de fosfatos mediada por microrganismos do solo de plantio de eucalipto**. 2007. 95 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

MURPHY J.; RILEY J. P. A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. **Analytical Chemistry Acta**, v. 27, p. 31-36, 1962.

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



NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 399 p.

NUBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKÉ, 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**, Washington, 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.; GUIMARÃES, 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**, Oxford, v. 41, p. 1782-1787, 2009.

REYES, I.; BERNIER, L.; SIMARD, R. R.; ANTOUN, H. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV: induced mutants. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 28, p. 281-290, 1999.

SILVA FILHO, G. N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 6, p. 847-854, 2002.

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. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 11, p. 1147-1152, 2005.

SOUZA, D. M. G. de; LOBATO, E.; REIN, T. A. Adubação com fósforo. In: SOUZA, D. M. G.; LOBATO, E. (Ed.). **Cerrado: correção do solo e adubação**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 147-168.

STAMFORD, N. P.; FREITAS, A. D. S.; FERRAZ, D. S.; SANTOS, C. E. R. S. Effect of sulphur inoculated with *Thiobacillus* on saline soils amendment and growth of cowpea and yam bean legumes. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 139, p. 275-281, 2002.

VASSILEV, N.; MEDINA, A.; AZCÓN, R.; VASSILEVA, M. Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and P uptake. **Plant and Soil**, The Hague, v. 287, p. 77-84, 2006.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.

Apoio: FAPEMIG

