

## Isolamento e seleção de bactérias mineralizadoras de fósforo em região de mineração no município de Vertentes - MG

**Vitória Palhares Ribeiro**<sup>(2)</sup>; **Crísia Santos de Abreu**<sup>(3)</sup>; **Jacqueline Aparecida Takahashi**<sup>(4)</sup>; **Jacqueline Araujo Teixeira**<sup>(5)</sup>; **Christiane Abreu de Oliveira**<sup>(6)</sup> **Ivanildo Evódio Marriel**<sup>(6)</sup>,

<sup>(1)</sup> Trabalho executado com recursos de FAPEMIG e Embrapa Milho e Sorgo <sup>(2)</sup> Estudante; Centro Universitário de Sete Lagoas; Sete Lagoas, MG. [vitypalhares18@hotmail.com](mailto:vitypalhares18@hotmail.com); <sup>(3)</sup> Mestranda; Universidade Federal de São João Del Rey; Sete Lagoas, MG. <sup>(4)</sup> Professora; Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte- MG; <sup>(5)</sup> Bolsista FAPEMIG/VALE. S.A ; <sup>(6)</sup> Pesquisador (a) Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 285, 35701-970, Sete Lagoas, MG.

**RESUMO:** Com a finalidade de desenvolver uma tecnologia segura e de baixo custo que possa substituir e/ou complementar a adubação fosfatada, diversos grupos têm proposto a utilização da adubação de áreas de plantio com fontes de fosfato insolúvel (Ex.: rochas naturais) em associação com microrganismos solubilizadores de fosfato. O objetivo deste trabalho foi selecionar microrganismos eficientes na solubilização e mineralização do fósforo (P), provenientes de áreas de minas de fosfato no estado de Minas Gerais. Foram coletadas amostras de solos e realizado o isolamento de microrganismos, utilizando-se meios de cultura contendo Fitato de sódio, como fonte orgânica de P, e fosfato tri-cálcio, como fonte inorgânica. Para a contagem dos microrganismos, 0,1 ml de diluições seriadas obtidas a partir do solo ( $10^{-4}$ - $10^{-5}$ ) foi plaqueado em meios de cultura contendo fontes insolúveis de P, conforme citado anteriormente. Após o período de incubação, o número de colônias formadoras de halo de solubilização foi determinado. A partir das amostras analisadas, foi obtido e incorporado à coleção de microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo um total de 150 isolados bacterianos capazes de mineralizar P. A liberação de fósforo em meio líquido mostrou-se associada à redução do pH do meio de cultura ( $p < 0,05$ ). A partir destas análises, foi possível selecionar dois isolados mais eficientes na mineralização de P, B4 e B5. No entanto, testes de solubilização em meio contendo P inorgânico são necessários para avaliar outras características destas estirpes e permitindo assim a conclusão deste "screening".

**Termos de indexação:** mineralização de fosfato, microrganismos e fitato.

### INTRODUÇÃO

Apesar de ser destaque na economia nacional, o agronegócio brasileiro ainda apresenta alta dependência do mercado externo quanto ao suprimento dos fertilizantes. Atualmente, cerca de 50% dos fertilizantes fosfatados utilizados no Brasil são importados, o que compromete a sustentabilidade da agricultura e a competitividade do agronegócio brasileiro no mercado mundial (MDIC, 2009), principalmente para grãos.

Os fertilizantes fosfatados têm como fonte principal de P as rochas fosfáticas, que representam um recurso natural não renovável. Em alguns casos, a solução encontrada para manter uma boa produtividade tem sido a adição de fósforo (P) no solo na forma de fertilizante fosfatado solúvel, o que acarreta na formação de complexos insolúveis com os constituintes do solo, deixando apenas uma parte do nutriente disponível para o uso das plantas. Com isso, há a necessidade de frequentes aplicações destes fertilizantes (Novais & Smyth, 1999), que apresentam custos elevados e podem causar danos ambientais (Simpson et al., 1997).

Alternativas têm sido buscadas para substituição parcial dos adubos solúveis e ou diminuição dos custos. Uma delas é o uso de microrganismos capazes de solubilizar o P agregado aos fosfatos naturais, ao solo e aos restos vegetais para aumentar a disponibilidade deste elemento (Stamford et al., 2004) para as plantas. Essa liberação de fósforo se dá através solubilização de fosfatos inorgânicos, associados aos íons Ca, Mg, Fe e Al por meio da produção de ácidos orgânicos (Kpombrekou & Tabatabai, 1994) e também pela mineralização de fosfatos orgânicos como o fitato, através da produção de enzimas fosfatases, como as fitases (Ghorbani-Nasrabadi et al., 2012).

Os microrganismos solubilizadores de fósforo (MSP) são comuns no solo, compreendendo bactérias (1 a 50% da população total de MSP) e

fungos (0,5 a 1,0% da população total de MSP) (Kucey, 1983). A relação entre os MSP e as plantas é mutualística, na qual o fosfato disponibilizado pelos microrganismos pode ser absorvido pelas plantas e os compostos carbônicos fornecidos pelas plantas podem ser metabolizados pelos microrganismos da rizosfera (Pérez, et al., 2007).

Diversas espécies de microrganismos têm sido avaliadas a partir do potencial de solubilização de fontes insolúveis de fósforo, como as rochas fosfáticas e as fontes orgânicas de P. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo isolar microrganismos potencialmente eficientes na solubilização e mineralização de P de locais próximos a áreas de mineração no estado de Minas Gerais.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foi efetuado isolamento de microrganismos solubilizadores e mineralizadores de fosfato a partir de amostras de solos coletadas nas margens de estradas próximas a uma área de mineração no município de Vertentes, no estado de Minas Gerais.

#### Isolamento de microrganismos solubilizadores e mineralizadores de P

Amostras de 1g de solo foram suspensas em 9 ml de solução salina (NaCl, 0,85% p/v) e agitadas durante 40 minutos, em temperatura ambiente, em agitador de mesa rotatório. Em seguida, a suspensão foi mantida em repouso por 10 minutos. Para a contagem dos microrganismos foram realizadas diluições seriadas decimais de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ , em duplicata. Em seguida, alíquotas de 0,1 ml de cada diluição foram transferidas para placas contendo o meio de cultura sólido Fitato (Richardson et al., 2001) e NIBRIP (Nautiyal, 1999), para observação da formação do halo transparente em torno das colônias, indicativo de solubilização/mineralização (Figura 1). Depois de verificada a formação de halo, as colônias distintas foram estriadas e purificadas, com o objetivo de formar colônias isoladas para estoque em óleo mineral. Após a caracterização fenotípica, as colônias formadoras de halo, foram transferidas novamente para o meio de origem, para que o halo pudesse ser medido. Para obter uma colônia com o formato circular, uma suspensão de células foi plaqueada em forma de gota (0,02 ml/região). Cerca de 20 dias após o plaqueamento, foi realizada a medição do halo. O critério utilizado para obtenção do diâmetro do halo foi o seguinte: diâmetro total (colônia + halo) – diâmetro da colônia.

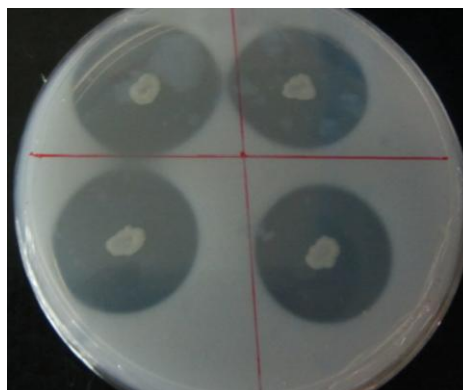


Figura 1- Aspecto de formação de halo por microrganismos solubilizadores e mineralizadores de P.

#### Análise do potencial das estirpes na mineralização de P

Para a realização desta etapa, dos 150 isolados, foram selecionadas oito (bactérias) com maior tamanho de halo. A capacidade de solubilização de fósforo orgânico destas estirpes foi avaliada quantitativamente. Para a análise quantitativa de mineralização de P, suspensões bacterianas, contendo  $10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$  foram inoculadas em meios de cultura contendo exclusivamente fontes orgânicas de fósforo (Richardson et al., 2001) e incubadas a  $27^\circ\text{C}$ , sob agitação, durante um total de 9 dias. O conteúdo de fósforo solúvel (Murphy & Riley, 1962) e o pH do meio de cultura foram determinados a cada intervalo de três dias.

#### Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas utilizando-se o teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ), programa SISVAR (Ferreira, 2010). Foi utilizada a correlação de Pearson ( $p \leq 0,05$ ) para comparação dos parâmetros analisados.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Isolamento

A partir das amostras analisadas, foram obtidos 150 morfotipos diferentes, com base na caracterização fenotípica e formação de halo ou não (Figura 1). Isso indica que no respectivo substrato, proveniente de áreas de afloramento de rochas fosfáticas, encontra-se uma grande diversidade de microrganismos capazes de solubilizar e/ou mineralizar o fósforo.

#### Formação de halo de solubilização

O diâmetro do halo variou significativamente entre os isolados avaliados (Tabela 1), evidenciando variabilidade genética entre as bactérias. O meio de cultura utilizado contém fonte insolúvel de fósforo,

na forma de fitato de sódio ou fosfato tri-cálcio, que quando na presença de cloreto de cálcio e substâncias liberadas pelos microrganismos, como ácidos orgânicos e enzimas, sofre processo de mineralização ou solubilização, respectivamente. Este processo é evidenciado através da formação de um halo translúcido em torno das colônias de microrganismos que apresentam este potencial (Nautiyal, 1999; Souchie et al., 2005).

Os isolados, B4 e B5, apresentaram o maior tamanho de halo, indicando maior potencial de solubilização. Segundo alguns autores, o potencial de solubilização de fosfato é proporcional ao tamanho do halo e a relação com o tamanho da colônia (Whitelaw et al., 2000). Entretanto, neste estudo, não foram encontradas correlações significativas entre o tamanho do halo e a liberação do fósforo em meio líquido (Tabela 1).

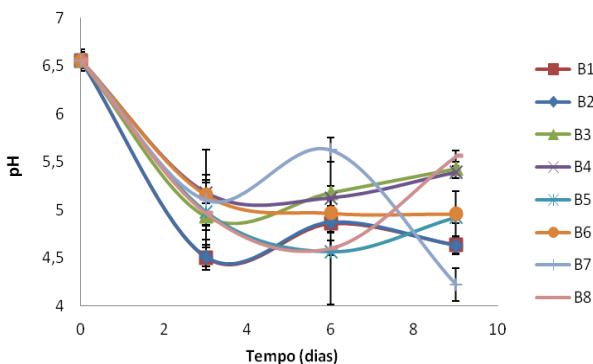
**Tabela 1** – Fósforo liberado em meio contendo fitato de sódio, pH e diâmetro do halo de solubilização de bactérias provenientes de áreas de mineração

Tratamentos (isolados) <sup>1</sup>	pH (final) <sup>1</sup>	P mineralizado (mg l <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	Diâmetro halo (cm) <sup>1</sup>
Sem bactéria	6,66 a	-	-
B1	4,63 b	12,71 a	0,15 b
B2	4,63 b	10,22 b	0,21 b
B3	5,43 c	9,89 b	0,31 c
B4	5,39 c	12,85 a	0,45 a
B5	4,92 b	8,68 b	0,50 a
B6	4,97 b	11,15 b	0,21 b
B7	4,22 d	12,67 a	0,17 b
B8	5,57 c	11,07 b	0,21 b

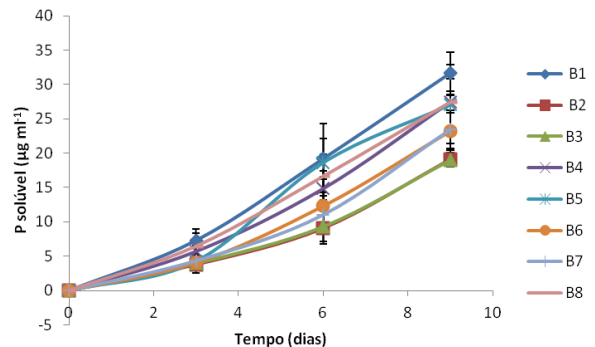
Correlação (pH x P)  $r = 0,72^*$  (Px halo)  $r = 0,29^2 sn^*$

<sup>1</sup> Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott,  $p \leq 0,05$ .

<sup>2</sup> Correlação de Pearson entre os parâmetros de pH, P mineralizado e diâmetro do halo,  $p \leq 0,05$ .



**Figura 2.** Valores de pH dos isolados de bactérias (B1 a B8), crescidos em meio líquido contendo fitato de sódio, durante 9 dias de incubação. Barras indicam o erro padrão da média de 3 repetições.



**Figura 3.** Taxa de liberação de fósforo em meio líquido contendo fitato de sódio, por 8 isolados de bactérias (B1 a B8), durante 9 dias de incubação. Barras indicam o erro padrão da média de três repetições.

### Potencial de mineralização de P

O pH final diferiu significativamente entre os isolados (Tabela 1). Ocorreu diminuição do pH para todas as estipes avaliadas, durante os 9 dias de incubação (Figura 2). Foi observada uma correlação negativa entre estes valores e a taxa de fósforo mineralizado para cada bactéria (Figura 3), indicando a relação entre a liberação de fósforo na presença de fosfato orgânico e a acidificação do sobrenadante de cultura.

A mineralização do IP (inositol fosfato = fitato de cálcio) no ambiente terrestre é atribuída a grupos especiais de fosfatases, as fitases (myo-inositol hexaofosfato fosfohidrolases). Estas enzimas, que pertencem à família das fosfatases ácidas compartilham uma sequência aminoacídica padrão e são capazes de catalisar a hidrólise de ligações fosfomonoéster do fitato, criando formas menos complexas de myo-inositol fosfato e fosfato inorgânico (Wodzinski & Ullah, 1996).

A eficiência das estipes testadas em mineralizar P indica a produção de enzimas do grupo fosfatases, no entanto, estudos posteriores serão realizados para a determinação da atividade de enzimas do grupo fosfatases para estas condições de cultivo.

Ocorreu também variação significativa entre os valores de P total mineralizado entre as bactérias avaliadas (Tabela 1). Os diferentes valores de pH e de liberação de P encontrados nas estipes testadas indicam a existência de variabilidade genética entre elas.

Neste estudo, o maior valor de fósforo total liberado foi de 12,84 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 1), pelo isolado B4, que apresentou também maior tamanho de halo. Indicando que esta estipe é promissora para testes de uso como inoculante em culturas de grãos. Apesar de não apresentarem diferença significativa entre os isolados, os valores de taxa de solubilização chegaram a superar 30 mg L<sup>-1</sup>, valor



médio encontrado por Oliveira e colaboradores em trabalhos anteriores (Figura 3). Sugerindo que todas as estirpes testadas são promissoras para estudos envolvendo a produção de inoculantes.

### CONCLUSÃO

Os isolados testados apresentaram variação significativa entre si, para os valores de pH, fósforo liberado e tamanho de halo.

Foi possível avaliar os isolados e selecionar, com base na formação de halo e potencial de liberação de P em meio líquido, duas bactérias, B4 e B5. No entanto, outros testes, de solubilização em meio contendo P inorgânico, são necessários para a conclusão deste “screening”.

### AGRADECIMENTOS

A FAPEMIG, Centro Universitário de Sete Lagoas (UNIFEMM) e Embrapa Milho e Sorgo.

### REFERÊNCIAS

- ABEL, S.; TICCONI, C. A.; DELATORRE, C. A. (2002). Phosphate sensing in higher plants *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 115, n. 1, p.1-8.
- FERREIRA, D.F. Sisvar versão 5.3. DEX-UFLA/2010.
- Ghorbani-Nasrabadi R, Greiner R, Alikhani HA, et al. Identification and determination of extracellular phytate-degrading activity in actinomycetes; *World J Microbiol Biotechnol* 2012 Jul; 28(7):2601-8.
- KPOMBLEKOU, A.K., TABATABAI, M. A. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Science* 158, 442-453. 1994.
- KUCEY, R.M.N. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Canadian Journal of Soil Science*, v. 63, n. 4, p.671, 1983.
- MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. Oficina sobre Fertilizantes no Brasil, Contrato Ministério de Ciência e Tecnologia e Centro de Estudos Estratégicos MCT/FSAG-CGEE/Consultoria No 056/2009, 2009.
- MURPHY, J. ; RILEY, J.P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal Chim Acta* , v. 27, p. 31–36, 1962.
- MUCHHAL, U. S.; RAGHOTAMA, K. G. (1999). Transcriptional Regulation of Plant Phosphate Transporters. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, Washington, v. 96, n. 10, p. 5868-5872.
- NAUTIYAL, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, v.170, p.265-270, 1999.
- NOVAIS, R.F; SMYTH, T.J. Fósforo em Solo e Planta em Condições Tropicais. Viçosa: UFV, 1999. 399 p.
- OLIVEIRA, C.A.; ALVES, V.M.C.; MARRIEL, I.E.; GOMES, E.A. SCOTTI, M.R.; 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 on the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biology and Biochemistry*. 2009.
- Richardson A.E. (2001) Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Australian Journal of Plant Physiology* 28, 897-906.
- RICHARDSON, A. E.; HADOBAS, P. A.; HAYES, J. E.; O'HARA, C. P.; SIMPSON, R. J. Utilization of phosphorus and pasture plants supplied with myo-inositol hexaphosphate is enhanced by the presence of soil microorganisms. *Plant and Soil*, The Hague, v. 229, p. 47-56, 2001.
- STAMFORD N.P.; SANTOS C.E.R.S.; STAMFORD JÚNIOR, W.P.; DIAS, S.L. 2004. Biofertilizantes de rocha fosfatada com *Acidithiobacillus* como adubação alternativa de caupi em solo com baixo P disponível. *Analytica*, n.9, p.48-53, 2004.
- STEVENSON FJ (1986) Cycles of soil. Carbon, nitrogen, phosphorus, sulphur and micronutrients. Wiley, New York, pp 176–177.
- VANCE CP, UHDE-STONE C, ALLAN DL. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157: 423–447, 2003.
- WHITELAW, M.A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*, Newark, v. 69, p. 99-151, 2000.