



Seleção de Bactérias Solubilizadoras de Fosfato Isoladas de Lodo de Esgoto de Abatedouro de Aves na Cultura do Milho⁽¹⁾.

Lilian Estrela Borges Baldotto⁽²⁾; Jorge Avelino Rodriguez Lozada⁽³⁾; Kleber Cristiano Silveira⁽⁴⁾; Marihus Altoé Baldotto⁽⁵⁾.

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos da FUNARBE (FUNARPEQ-2014).

⁽²⁾ Professor; Universidade Federal de Viçosa; Florestal, MG; lilian.estrela@ufv.br; ⁽³⁾ Estudante; Universidade Federal de Viçosa; ⁽⁴⁾ Estudante, Universidade Federal de Viçosa; ⁽⁵⁾ Professor, Universidade Federal de Viçosa.

RESUMO: O fósforo é um macronutriente limitante para a produção agrícola. O trabalho objetivou: (i) isolar e quantificar bactérias solubilizadoras de fosfato do lodo de esgoto de abatedouro de aves, (ii) caracterizar os isolados de acordo com a morfologia celular e da colônia e (iii) avaliar o crescimento de plantas de milho em resposta à aplicação dos isolados em conjunto com fosfato natural. As bactérias foram isoladas em meio de cultura contendo fosfato de cálcio. A avaliação morfológica consistiu na descrição do formato celular, coloração gram e nas características das colônias. Para fazer uma avaliação da solubilização de fosfato natural (FN), realizou-se inoculação em sementes de milho na presença de fosfato de Araxá. O experimento consistiu de dez tratamentos: oito isolados bacterianos + FN, FN e controle. O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação por 45 dias, em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições e a unidade experimental foi um vaso contendo duas plantas. As variáveis mensuradas foram as características de crescimento da planta. Foram isoladas oito estirpes bacterianas e todas formaram halo de solubilização de fosfato in vitro. Todos os isolados apresentaram coloração gram positiva e 90% apresentaram forma de bastonete e 10% de cocos. A inoculação da estirpe LSOF-7 em conjunto com FN promoveu incrementos na matéria seca de plantas de milho, 17% frente ao tratamento contendo apenas FN e 40% em relação ao controle. Conclui-se que os lodos de esgoto de abatedouro de aves contêm bactérias com potencial de promoção do crescimento de plantas de milho.

Termos de indexação: *Zea mays*, bactérias promotoras de crescimento de plantas, resíduos sólidos.

INTRODUÇÃO

Depois do nitrogênio, o fósforo é o segundo macronutriente limitante para a produção agrícola no país e no mundo (Vance et al., 2003). Sem a presença de P, funções biológicas básicas como a formação de ácidos nucleicos, fosfolípidios, metabolismo energético e regulação enzimática,

não poderiam ser possíveis (Rausch & Bucher, 2002).

Para evitar uma possível carência deste nutriente existem na atualidade diversos esforços de diferentes setores objetivando tornar as plantas mais adaptáveis a ambientes de baixa fertilidade, melhorando assim a capacidade da mesma na procura e obtenção de nutrientes (Lynch, 2007). Outro foco de estudo é uso de bactérias solubilizadoras de fosfato (BSP), para possibilitar o uso de fontes de fósforo pouco solúveis, como os fosfatos naturais (Baldotto et al., 2012). O fosfato natural é um produto obtido por ataque da rocha fosfática, apresenta baixa concentração de P₂O₅ e pode ser aplicado como fertilizante de aplicação direta no solo ou como material para indústria de fertilizantes (Loureiro et al., 2008).

O presente trabalho teve como objetivos: (i) isolar e quantificar bactérias solubilizadoras de fosfato do lodo de esgoto de abatedouro de aves, (ii) caracterizar as bactérias de acordo com a morfologia celular e morfologia da colônia e (iii) avaliar a capacidade das bactérias em solubilizar fosfato natural utilizando plantas de milho em casa-de-vegetação.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras de lodo

Amostras de lodo de esgoto de abatedouro de aves (resíduo gerado no sistema de tratamento de efluentes do tipo Lodos Ativados/Aeração Prolongada) foram cedidas pelas Organizações FRANCAP S.A. As amostras foram transportadas para o Setor de Floricultura da Universidade Federal de Viçosa, Campus Florestal, onde foi realizado os trabalhos microbiológicos nos anos de 2013 e 2014.

O lodo foi caracterizado quimicamente por apresentar: N 9.5, P 1.1, K 0.45, Mg 1.35, S 0.18, CO 18.72 dg/Kg ; Zn 517, Fe 1908 , Mn 114, Cu 342, B 8.3 mg/Kg ; pH 6.7; C/N 1.96.

Isolamento e quantificação de bactérias solubilizadoras de fosfato

Amostras de 10 g de lodo foram homogeneizadas em 90 mL de solução salina



(NaCl, 0,85 g L⁻¹) e a partir dessa diluição (10⁻¹) foram realizadas diluições seriadas até 10⁻¹². Amostras de 100 µL de cada diluição foram transferidas para placas de Petri contendo meio sólido constituído de 10 g de glicose, 5 g de cloreto de amônio (NH₄Cl), 1 g de cloreto de sódio (NaCl), 1 g de sulfato de magnésio heptahidratado (Mg SO₄.7H₂O), 1 g de fosfato de cálcio (Ca₅(PO₄)₃OH), 15 g de ágar bacteriológico, 2 mL de fungicida Cerconil (0,1 g L⁻¹), 1000 mL de água destilada, pH ajustado para 6,5 com ácido sulfúrico (H₂SO₄) e/ou hidróxido de potássio (KOH) e incubadas a 30°C por 3 dias. A formação de halo translúcido ao redor da colônia indicou atividade solubilizadora de fosfato. Colônias individuais foram transferidas para meio líquido DYGS (Döbereiner et al., 1995) e mantidas a 30°C, 120 rpm por 24 h. Em seguida, as bactérias foram transferidas para placas de Petri contendo o mesmo meio descrito acima para determinação do índice de solubilização de fosfato e purificação dos isolados. O índice de solubilização foi calculado por meio da fórmula: diâmetro médio do halo de solubilização/diâmetro médio do halo da colônia. Os isolados foram estocados em microtubos plásticos contendo água destilada autoclavada para uso de rotina.

Caracterização morfológica das células e das colônias dos isolados bacterianos

Após o isolamento, as bactérias cresceram em meio líquido DYGS por 24 h, a 30°C e 120 rpm e foram colocadas em placas de Petri contendo esse mesmo meio, porém sólido. As placas ficaram em estufa bacteriológica a 30°C por 7 dias e as colônias que ali cresceram foram caracterizadas de acordo com as características das células (forma, coloração gram) e as características das colônias (forma, cor, tamanho, elevação, borda, superfície e mucosidade) (Perin, 2003).

Ensaio de seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato na cultura do milho em casa-de-vegetação

O experimento consistiu em dez tratamentos: oito isolados bacterianos + fosfato natural (FN), um tratamento contendo apenas FN, e controle (sem bactéria e sem FN). O experimento foi conduzido durante 45 dias em casa-de-vegetação, no delineamento inteiramente casualizado, com 6 repetições e a unidade experimental foi um vaso contendo 2 plantas de milho.

Para obtenção do pré-inóculo, as bactérias foram crescidas em 5 mL de meio líquido DYGS por 24 h, a 30 °C e 120 rpm. O pré-inóculo foi vertido

em frascos de erlenmeyer contendo 200 mL de meio DYGS, que permaneceram por 24h, a 30°C sob agitação de 120 rpm para obtenção do inóculo. A inoculação foi realizada no erlenmeyer pela imersão das sementes de milho. Cada tratamento ficou imerso no meio bacteriano por 2 horas, com posterior aplicação do mesmo meio bacteriano no substrato. Os controles foram imersos em meio líquido DYGS autoclavado. Posteriormente, as sementes foram transferidas para vasos de 0,7 dm³ contendo substrato caracterizado quimicamente por apresentar: pH 4.1 ; P 6.8, K 78 mg/dm³; Ca 0.6, Mg 0.3, Al 1.4, H+Al 7.59, SB 1.10, CTC(t) 2.50, CTC(T) 8,69 cmolc /dm³; V 13, m 56 %. A aplicação de fosfato natural de Araxá (fluorapatita, com 22,7% P₂O₅ total, 4,3% de P₂O₅ solúvel em ácido cítrico 2% (1:100), em pó) se realizou na razão de 10g/kg de solo (Ribeiro et al., 1999).

Aos 45 dias após plantio, as plantas foram coletadas para a mensuração das seguintes variáveis: altura da planta (ALT); diâmetro do caule (DIAM); número de folhas (NF); matéria fresca da raiz (MFR); matéria fresca da parte aérea (MFPA); matéria fresca total (MFT); matéria seca da raiz (MSR), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca total (MST) obtidas pela secagem em estufa sob ventilação forçada de ar a 65 °C por 72 horas e posterior pesagem em balança de precisão.

Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância por meio do programa R e as médias foram comparadas pelo teste de TUKEY a 5 % de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No lodo de esgoto de abatedouro de aves foi possível o isolamento de 8 estirpes bacterianas e a quantificação das UFC em 17,70x10¹⁵/g de lodo.

Não existe uma garantia que as estirpes bacterianas que apresentaram os maiores índices de solubilização de fosfato in vitro, ofereçam os melhores resultados nos testes em viveiro ou em campo, pois as condições agroambientais e de simbiose afetam o desempenho da inoculação.

Na **tabela 1 e 2**, pode-se observar a caracterização morfológica das bactérias isoladas do lodo de esgoto de abatedouro de aves. Todas apresentaram coloração gram-positiva e mais de 85% apresentaram formato de cocos.

Com relação a morfologia das colônias, todas apresentaram formato circular, superfície lisa e ausência de mucosidade. Predominou a coloração



branca (87,5%) seguida da coloração amarela (12,5%). O diâmetro da colônia apresentou variação, 50% dos isolados apresentaram diâmetro igual 1,5 mm, 25 % maior que 1 mm e os 25% restantes diâmetro inferior a 1mm. Houve predomínio de borda inteira (87,5%), seguida pela denteada (12,5%). Resultados que diferem dos encontrados por de Bobadilla e Rincón (2008), onde a coloração amarela (100%) predominou nas estirpes. No mesmo trabalho, a mucosidade foi observada em 80% dos isolados. Tanto para a superfície e bordas, o presente trabalho e o de Bobadilla e Rincón (2008) apresentaram 80% dos isolados com bordas inteiras e superfície lisa.

As pesquisas feitas têm demonstrado uma rica variedade de formas, tamanhos, cores e reações bioquímicas de bactérias, com capacidade de solubilizar fosfato inorgânico e orgânico (Baldotto, 2008; Bobadilla e Rincón, 2008). No entanto, esses trabalhos apresentam uma tendência com relação à morfologia das células e das colônias dos isolados bacterianos, em apresentarem colônias circulares, de coloração branca ou creme, com borda inteira, células com coloração gram-positiva e formato de cocos.

As médias das variáveis de crescimento do milho em resposta à inoculação bacteriana na presença de FN e nos controles estão apresentados na tabela 3.

O isolado LSOF-7 promoveu incrementos significativos na biomassa das plantas de milho, foi o único tratamento que alcançou um peso de 1,00g, superior aos 0,60g do controle e aos 0,83g do tratamento só com FN, isto significa um rendimento de 40 e 17%, respectivamente. Segundo a AGEITEC (2011), com uma baixa tecnologia de produção, a densidade da cultura do milho é de 40.000 a 50.000 plantas/ ha. Com estirpe bacteriana LSOF-7, se logra alcançar incrementos de no mínimo 17 % respeito aos outros tratamentos, logo, a potencialidade que apresenta esta estirpe, como possível inoculante é promissora.

CONCLUSÕES

1. As bactérias solubilizadoras de fosfato habitam os lodos de esgoto de abatedouro de aves em quantidades superiores a $17,70 \times 10^{15}$ UFC/g de lodo.
2. Os isolados bacterianos de lodo de esgoto de abatedouro de aves apresentam a capacidade de solubilizar fosfato de cálcio in vitro.
3. O isolado UFVLSOF-7 promove o crescimento de plantas de milho e apresenta potencial para uso na formulação de inoculantes e biofertilizantes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às Organizações FRANCAP S.A, à FUNARBE e a CAPES.

REFERÊNCIAS

- AGEITEC. Agencia Embrapa de informação tecnológica (2011) www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONTAG01_49_168200511159.html. 10 de fev. 2015.
- BALDOTTO, L. & OLIVARES, L. Phylloepiphytic interaction between bacteria and different plant species in a tropical agricultural system. *Canadian Journal of Microbiology*, v.54, p.918-931, 2008.
- BALDOTTO, L.; SILVA JR, G.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, L.; BALDOTTO, M. Initial growth of maize in response to application of rock phosphate, vermicompost and endophytic bacteria. *Revista Ceres*, v.59, p.262-270, 2012.
- BOBADILLA C. & RINCÓN C. Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza. Bogotá: Universidad Pontificia Javeriana, 2008. p.87. Tesis de Graduación.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.; BALDANI, J. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. *Embrapa Agrobiologia, Seropédica*. 66p, 1995.
- RIBEIRO, C.; GUIMARÃES, G.; ALVAREZ, H. Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5a aproximação. Viçosa MG: UFV, p.99-110, 1999.
- LOUREIRO, L; DE MELLO, B; NASCIMENTO, M. Agrominerais–Fosfato. IN: Rochas & Minerais Industriais: Usos e Especificações. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, p. 141-174, 2008.
- LYNCH, P. Turner revolution no. Roots of the second green revolution. *Australian Journal of Botany*, v.55, 493-512, 2007.
- PERIN, L. Ecologia e diversidade de isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* associados à cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). *Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, 2003. 68p. Dissertação Mestrado.
- RAUSCH, C. & BUCHER, M. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta*, v.216, p.23-37, 2002.
- VANCE, C.P.; UHDE-STONE, C.; ALLAN, D.L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*, v.157, p.423-447, 2003.

Tabela 1. Caracterização morfológica das colônias dos isolados bacterianos de lodo de esgoto de abatedouro de aves.

Identificação dos isolados bacterianos	Característica Morfológica da Colônia						
	Coloração	Tamanho	Elevação	Forma	Borda	Superfície	Muco
UFVLSOF-1	Branco	> 1,0 mm	Plana	Circular	Inteira	Lisa	0%
UFVLSOF-2	Branco	> 1,0 mm	Plana	Circular	Inteira	Lisa	0%
UFVLSOF-3	Branco	= 1,5 mm	Lente	Circular	Inteira	Lisa	0%
UFVLSOF-4	Branco	= 1,5 mm	Convexa	Circular	Inteira	Lisa	0%
UFVLSOF-5	Branco	= 1,5 mm	Convexa	Circular	Inteira	Lisa	0%
UFVLSOF-6	Branco	= 1,5 mm	Plana	Circular	Inteira	Lisa	0%
UFVLSOF-7	Branco	< 1,5 mm	Pulvinada	Circular	Denteada	Lisa	0%
UFVLSOF-8	Amarelo	< 1,5 mm	Plana	Circular	Inteira	Lisa	0%

Tabela 2. Características de crescimento: altura da planta (ALT), diâmetro do caule (DIAM), número de folhas (NF), matéria fresca da raiz (MFR), matéria fresca da parte aérea (MFPA), matéria fresca total (MFT), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca total (MST); quadrado médio do resíduo (QMR) e coeficiente de variação (CV) de plantas de milho (*Zea mays*) em resposta à inoculação de bactérias solublizadoras de fosfato e fosfato natural (FN).

TRATAMENTOS	ALT	DIAM	NF	MFR	MFPA	MFT	MSR	MSPA	MST
	mm	mm	und	-----g-----					
Controle	364 a	2,91 c	4 a	4,11 ab	1,97 a	6,09 a	0,38 b	0,22 a	0,60 b
FN	353 a	3,15 bc	4 a	5,15 a	2,40 a	7,55 a	0,51 ab	0,33 a	0,83 ab
UFVLSOF-1 + FN	404	4,00 a	5 a	5,30 a	2,76 a	8,07 a	0,49 ab	0,35 a	0,84 ab
UFVLSOF-2+FN	413 a	3,75 ab	4 a	5,17 a	2,66 a	7,83 a	0,52 ab	0,33 a	0,85 ab
UFVLSOF-3+ FN	405 a	3,68 abc	4 a	4,53 ab	2,42 a	6,95 a	0,40 b	0,32 a	0,73 ab
UFVLSOF-4 + FN	415 a	3,66 abc	4 a	4,49 ab	2,54 a	7,03 a	0,51 ab	0,33 a	0,84 ab
UFVLSOF-5 + FN	399 a	3,65 abc	4 a	4,09 ab	2,32 a	6,41 a	0,41 b	0,32 a	0,38 ab
UFVLSOF-6 + FN	390 a	3,55 abc	4 a	4,20 ab	2,40 a	6,65 a	0,42 bc	0,36 a	0,74 ab
UFVLSOF-7 + FN	290 a	3,56 abc	4 a	4,61 ab	1,84 a	6,81 a	0,69 a	0,30 a	1,00 a
UFVLSOF-8 + FN	380 a	3,68 abc	4 a	3,34 b	2,47 a	5,82 a	0,49 ab	0,35 a	0,84 ab
QMR	47,13	0,17	0,067	0,78	0,37	1,68	0,017	0,0077	1,41
CV (%)	18,0	11,7	6,5	19,5	25,5	21,8	27,5	27,1	17,1