



Solubilização de fosfato de cálcio por bactérias endofíticas isoladas de raízes de castanha-do-Brasil⁽¹⁾.

Krisle da Silva⁽²⁾; Patrícia Bombonati Chalita⁽³⁾; Eliane do Nascimento Cunha Farias⁽⁴⁾; Marcos José Salgado Vital⁽⁵⁾; Teresinha Costa Silveira de Albuquerque⁽⁶⁾.

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos do da Embrapa projeto: 02.11.07.015.00.00

⁽²⁾ Pesquisadora do Laboratório de Microbiologia do Solo; Embrapa Roraima; Boa Vista, Roraima; krisle.silva@embrapa.br; ⁽³⁾ Pós-graduanda em Recursos Naturais; Universidade Federal de Roraima; Boa Vista, Roraima; patichalita@hotmail.com; ⁽⁴⁾ Técnica do Laboratório de Microbiologia do Solo; Embrapa Roraima; Boa Vista, Roraima; eliane.farias@embrapa.br; ⁽⁵⁾ Professor, Universidade Federal de Roraima; Boa Vista, Roraima; salvital2@hotmail.com; ⁽⁶⁾ Pesquisadora do Laboratório de Nutrição de Plantas; Embrapa Roraima; Boa Vista, Roraima; teresinha.albuquerque@embrapa.br;

RESUMO: *Bertholletia excelsa* H.B.K. pertence a família Lecythidaceae, conhecida popularmente como castanha-do-Brasil. É o principal produto do extrativismo e de exportação do bioma amazônico, e tem uma grande importância para os povos da região, além de contribuir para a preservação das florestas, tendo suas amêndoas elevado valor econômico, tanto numa escala regional e nacional. No entanto, pouco se sabe da microbiota presente nas raízes desta espécie de importância para a Amazônia. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de solubilização de fosfato de cálcio por bactérias isoladas de raízes de castanha-do-Brasil em áreas cultivadas e nativas de Roraima. Cem bactérias foram avaliadas no meio NBRIP sólido modificado. As bactérias foram repicadas em triplicata em cada meio e incubadas por 18 dias a 28°C. Ao final dos 18 dias foi avaliado o diâmetro da colônia e diâmetro do halo de solubilização com auxílio de paquímetro digital. O índice de solubilização (IS) para cada bactéria foi obtido através da fórmula: $IS = \frac{\text{diâmetro do halo (mm)}}{\text{diâmetro da colônia (mm)}}$. De acordo com os resultados obtidos as bactérias foram classificadas como baixa ($IS < 2$), média ($IS < 4$) e alta ($IS \geq 4$) capacidade de solubilização. Das 100 bactérias avaliadas, 69 apresentaram a capacidade de solubilizar fosfato de cálcio. Destas, duas apresentaram alto, quatro médios e 63 baixos índices de solubilização.

Termos de indexação: *Bertholletia excelsa* H.B.K.; Amazônia.

INTRODUÇÃO

Bertholletia excelsa H.B.K. é única espécie do gênero *Bertholletia* da família Lecythidaceae, conhecida popularmente como castanha-do-Brasil. É uma planta encontrada no Brasil, Venezuela, Colômbia, Peru, Bolívia e Guiana, sendo as formações de florestas mais densas encontradas

no Brasil (Lorenzi, 2002). A castanha-do-Brasil é o principal produto do extrativismo e de exportação do bioma amazônico, e tem uma grande importância para os povos da região, além de contribuir para a preservação das florestas, tendo seus frutos elevado valor econômico, tanto numa escala local, quanto regional e nacional (Locatelli et al., 2005).

Os microrganismos são os seres vivos mais primitivos do planeta e ao longo do processo evolucionário adquiriram características e adaptabilidades para coexistências com outros seres vivos, estabelecendo relações diversas em forma e função. Entre as relações biológicas existentes, destacam-se as interações entre plantas e microrganismos. Estas relações podem ser positivas, negativas ou neutras. Entre as relações positivas, cabe ressaltar as bactérias promotoras do crescimento vegetal. Os principais meios de promoção do crescimento vegetal são a fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios, solubilização de fosfatos, produção de compostos antifúngicos e indução de resistência sistêmica.

No entanto, pouco se sabe da microbiota presente nas raízes desta espécie de importância para a Amazônia. Recentemente foram isoladas 303 bactérias endofíticas de raízes de castanha-do-Brasil em Roraima (Costa et al., 2014). No entanto, são necessários estudos para verificar possíveis mecanismos de promoção do crescimento vegetal por estas bactérias.

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de solubilização de fosfato de cálcio por bactérias isoladas de raízes de castanha-do-Brasil em áreas cultivadas e nativas de Roraima.

MATERIAL E MÉTODOS

Cem bactérias foram utilizadas para avaliação da capacidade de solubilização de fosfato de cálcio em meio sólido. As bactérias foram obtidas de raízes de castanha-do-brasil de três localidades no estado de Roraima: Campo Experimental Serra da Prata (Município de Mucajaí) onde há um plantio de



castanheiras com sete anos de idade (N 02°22'28,2" e W 060°59'46,8"); Campo Experimental Confiança (Município do Cantá) dentro de um plantio consorciado em sistema agroflorestal (SAF) com 18 anos de implantação (N 02° 15' 00" e W 60° 39' 54") e área de floresta nativa em propriedade particular no município de São João da Baliza (N 02°45'24,9" e W 060°43'53,2") (Tabela 1).

Para a solubilização, foi utilizado o meio NBRIP (Nautiyal, 1999) modificado, contendo por litro: 10 g de glicose; 0,25 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 5 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,2 g de KCl; 0,1 g de $(NH_4)_2SO_4$ e 2,6 g de $CaHPO_4$. O pH do meio foi ajustado para 7.0. Para avaliação da capacidade solubilizadora as bactérias foram cultivadas em meio DYG'S líquido (Rodrigues Neto et al., 1986) por 24 horas. Após as 24 horas a densidade ótica (DO) foi ajustada para 0,5-0,7 a 630 nm e procedeu-se a inoculação no meio sólido NBRIP modificado. Foram inoculados 10 μ L de suspensão bacteriana crescida no meio DYG's em três pontos equidistantes na placa. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com três repetições.

Foram incluídas quatro estirpes padrões e de referência como controles positivos para avaliação da solubilização de fosfato de cálcio: BR11001^T (*Azospirillum brasiliense*), BR11340 (*Burkholderia* sp.), BR11790^T (*Herbaspirillum frisingense*), ERR 532 (*Bacillus* sp. isolada de raízes de braquiária). As placas foram incubadas a 28° por 18 dias e posteriormente foi medido o diâmetro do halo de solubilização (áreas translúcidas ao redor das colônias), utilizando um paquímetro digital, resultando em três medições. A partir dessas medidas foi obtido o índice de solubilização (IS) para cada isolado através da fórmula: $IS = \frac{\varnothing \text{ halo (mm)}}{\varnothing \text{ colônia (mm)}}$ (Berraquero et al., 1976). Com base nos índices de solubilização, os isolados foram classificados como de baixa (IS até 2), média (IS de 3 a 4) e alta (IS > 4) capacidade de solubilização.

Os dados foram analisados estatisticamente usando programa Sisvar versão 4.3 (Ferreira, 2008) sendo realizados os testes de distribuição normal dos erros e a análise de variância. A capacidade de solubilização dos isolados foram comparados pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 100 bactérias avaliadas quanta a capacidade de solubilização de fosfato de cálcio, 69 apresentaram esta característica (Tabela 1). A bactéria ERR 719 apresentou o maior índice de solubilização, sendo estatisticamente superior as demais. As bactérias ERR 587, ERR 692, ERR 779, ERR 694 e ERR 652 também se destacaram quanto à capacidade de solubilização.

As bactérias foram então classificadas quanto alta, média e baixa capacidade de solubilização. Duas bactérias foram classificadas com alta (ERR 719 e ERR 587), quatro com média (ERR 692, ERR 779, ERR 694 e ERR 652) e 63 com baixa capacidade de solubilização. Todas as estirpes tipo e de referência apresentaram baixa capacidade de solubilização (Tabela 1).

Quanto à origem, das seis bactérias que se destacaram quanto à capacidade de solubilização de fosfato de cálcio, uma (ERR 719) é oriunda do Campo Experimental do Confiança, de um sistema agroflorestal com 18 anos de idade, três de um monocultivo de castanha do Campo Experimental Serra da Prata com sete anos de idade (ERR 692, ERR 694 e ERR 652) e duas (ERR 587 e ERR 779) de uma área nativa em São João da Baliza. Estes resultados indicam a presença de bactérias com capacidade de promover o crescimento vegetal e futuros testes de inoculação na planta são necessários.

CONCLUSÕES

Raízes de castanha-do-Brasil abrigam bactérias capazes de solubilizar fosfato de cálcio e que possuem potencial de promover o crescimento vegetal.

REFERÊNCIAS

- BERRAQUERO, F. R.; BAYA, A. M.; CORMENZANA, A. R. Estabelecimento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. *Ars Pharmaceutica*, 17:399-406, 1976.
- COSTA, I. M.; CHALITA, P. B.; FARIAS, E. N. C.; ALBUQUERQUE, T. S.; SILVA, K. Ocorrência e isolamento de bactérias diazotróficas associativas de raízes de castanha-do-Brasil. In: FERTBIO, Araxá, 2014.
- FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium*, 6:36-41, 2008.
- GERDEMANN, J. W. & NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, 46:235-244, 1963.
- LOCATELLI, M. et al. Cultivo da castanha-do-Brasil em Rondônia. Rondônia: Embrapa, 2005. (Sistema de produção, 7). Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Castanha/CultivodaCastanhadoBrasilRO/index.htm>. Acessado em 19 fev. 2014.
- LORENZI, H. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2002, 384.



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

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. Summa Phytopathologica, 12:16, 1986.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. Revista Symposium, 6:36-41, 2008.



Tabela 1. Origem das bactérias avaliadas quanto à capacidade de solubilização de fosfato de cálcio isoladas de raízes de castanha-do-Brasil em Roraima.

Isolado	Área de Isolamento	Total por Área
ERR 575; ERR 584; ERR 602; ERR 604; ERR 611; ERR 616; ERR 626; ERR 640; ERR 710; ERR 711; ERR 712; ERR 717; ERR 719; ERR 720; ERR 721; ERR 723; ERR 727; ERR 733; ERR 737; ERR 738; ERR 739; ERR 741; ERR 744; ERR 745; ERR 750; ERR 752; ERR 753; ERR 754; ERR 761; ERR 762; ERR 763; ERR 765; ERR 770; ERR 771; ERR 772; ERR 773; ERR 827; ERR 828 ERR 838; ERR 843; ERR 849; ERR 858; ERR 859; ERR 865; ERR 870; ERR 873	Confiança	46
ERR 587; ERR 612; ERR 642; ERR 644; ERR 779; ERR 782; ERR 785; ERR 792; ERR 794; ERR 795; ERR 797; ERR 803; ERR 805; ERR 807; ERR 809; ERR 813; ERR 815; ERR 819; ERR 821; ERR 822; ERR 830; ERR 833	São João da Bliza	22
ERR 589; ERR 594; ERR 596; ERR 651; ERR 652; ERR 654; ERR 656; ERR 657; ERR 660; ERR 665; ERR 667; ERR 669; ERR 673; ERR 676; ERR 677; ERR 678; ERR 679; ERR 680; ERR 684; ERR 689; ERR 691; ERR 692; ERR 694; ERR 698; ERR 701; ERR 703; ERR 705; ERR 706; ERR 708; ERR 709; ERR 799; ERR 800;	Serra da Prata	32

Tabela 2. Índice de solubilização de fosfato de cálcio por bactérias isoladas de raízes de castanha-do-Brasil isoladas em Roraima.

Bactérias	I.S*	Classe	Bactérias	I.S	Classe	Bactérias	I.S	Classe
ERR 719	5,73 a	Alta	ERR 792	2,01 e	Baixa	ERR 865	1,60 f	Baixa
ERR 587	4,20 b	Alta	ERR 602	2,00 e	Baixa	ERR 741	1,50 g	Baixa
ERR 692	3,73 b	Média	ERR 684	1,99 e	Baixa	ERR 763	1,50 g	Baixa
ERR 779	3,72 b	Média	ERR 711	1,97 e	Baixa	ERR 838	1,48 g	Baixa
ERR 694	3,68 b	Média	ERR 739	1,97 e	Baixa	ERR 612	1,44 g	Baixa
ERR 652	3,33 c	Média	ERR 753	1,95 e	Baixa	ERR 800	1,44 g	Baixa
ERR 594	2,90 c	Baixa	ERR 669	1,93 e	Baixa	ERR 771	1,42 g	Baixa
ERR 676	2,87 c	Baixa	ERR 604	1,93 e	Baixa	ERR 797	1,41 g	Baixa
ERR 654	2,77 d	Baixa	ERR 651	1,92 e	Baixa	ERR 830	1,41 g	Baixa
ERR 532	2,62 d	Baixa	ERR 708	1,90 e	Baixa	ERR 761	1,41 g	Baixa
ERR 596	2,62 d	Baixa	ERR 723	1,90 e	Baixa	ERR 689	1,36 g	Baixa
ERR 733	2,62 d	Baixa	ERR 859	1,88 e	Baixa	ERR 833	1,35 g	Baixa
ERR 589	2,59 d	Baixa	ERR 680	1,86 e	Baixa	ERR 640	1,35 g	Baixa
ERR 712	2,57 d	Baixa	ERR 821	1,85 e	Baixa	ERR 750	1,32 g	Baixa
ERR 720	2,46 d	Baixa	ERR 678	1,83 f	Baixa	ERR 698	1,30 g	Baixa
BR 11001	2,44 d	Baixa	ERR 616	1,82 f	Baixa	ERR 807	1,28 g	Baixa
ERR 626	2,40 d	Baixa	ERR 858	1,80 f	Baixa	BR 11790	1,27 g	Baixa
ERR 752	2,40 d	Baixa	ERR 611	1,79 f	Baixa	ERR 575	1,16 g	Baixa
ERR 745	2,37 d	Baixa	ERR 710	1,78 f	Baixa	ERR 754	1,15 g	Baixa
BR 11340	2,34 d	Baixa	ERR 822	1,75 f	Baixa	ERR 673	1,13 g	Baixa
ERR 765	2,16 e	Baixa	ERR 644	1,74 f	Baixa	ERR 870	1,09 g	Baixa
ERR 795	2,15 e	Baixa	ERR 849	1,72 f	Baixa			
ERR 803	2,14 e	Baixa	ERR 828	1,71 f	Baixa			
ERR 721	2,08 e	Baixa	ERR 703	1,71 f	Baixa			
ERR 677	2,05 e	Baixa	ERR 584	1,70 f	Baixa			
ERR 827	2,03 e	Baixa	ERR 815	1,61 f	Baixa			

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5%.