

Eficiência de Microrganismos Mineralizadores de Fitato Isolados da Rizosfera de Linhagens de Milho Eficientes e Ineficientes para o Uso de Fósforo

Patrícia Gomes Silva¹, Amanda A. Oliveira Neves Viana², Daiane Cristina Diniz Caldeira³, Lorena Laura da Silva Reis⁴, Ivanido Evódio Marriel⁵ e Andréa Almeida Carneiro⁶

¹ Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG patriciabio1@yahoo.com.br, ² Universidade Estadual Paulista de Jaboticabal, São Paulo, amandaneves@yahoo.com.br, ³ Centro Universitário de Sete Lagoas, Sete Lagoas, MG e bolsista/Embrapa, ⁴ Escola Senet, Sete Lagoas, e bolsista FAPEMIG/Embrapa, lorenalaura-71@hotmail.com, ^{5,6} Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas- MG e-mail: imarriel@cnpms.embrapa.br, andreac@cnpms.embrapa.br

RESUMO - Fósforo (P) é primordial para o crescimento e o desenvolvimento dos vegetais. No solo, uma proporção significativa de P está na forma orgânica (50-80%), sendo que aproximadamente metade deste corresponde ao ácido fítico. Microrganismos produtores de fitase são essenciais para uma maior disponibilidade do P orgânico para a planta. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de mineralização de fitato por microrganismos isolados da rizosfera de plantas de milho eficientes e ineficientes para o uso de P, cultivadas em solo com alta e baixa disponibilidade de Pi. Em meio líquido, 54% dos fungos e 76% das bactérias isoladas da rizosfera de cultivares de milho eficientes e ineficientes para o uso de P, foram capazes de mineralizar em média apenas 50% do fitato. Os resultados mostraram que independente da cultivar de milho utilizada e do teor de P do solo, a maioria dos microrganismos isolados apresentou uma baixa eficiência de liberação de Pi para o meio de cultivo. A maior parte dos microrganismos mineralizadores de fitato foram isolados de genótipos ineficientes para a utilização de P (L22 e Cateto). Seria de grande relevância pesquisas para a busca de novos microrganismos com uma atividade de fitase mais eficiente e que possam ser utilizados como inoculantes, fontes de genes ou enzimas para o bioprocessamento de fontes orgânicas de P.

Palavras-chave: mineralização, fitato, fungos e bactérias

Introdução

A aquisição de fósforo (P) é primordial para o crescimento e o desenvolvimento dos vegetais, desempenhando importantes papéis em funções fisiológicas básicas (Raghothama, 1999). Entretanto, P é um dos nutrientes mais limitantes para o crescimento de plantas, embora seja abundante no solo tanto na forma orgânica (Po) quanto inorgânica (Pi) (Gyaneshwar et al., 2002). Esta escassez é devida ao fato de este mineral ter uma difusão muito pequena na maioria dos solos, seus íons serem altamente reativos com numerosos constituintes do solo (Hinsinger, 2001) e as plantas utilizarem este nutriente quase que exclusivamente na forma de ânions de fosfato, principalmente HPO_4^{-2} e $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$. Apenas uma pequena quantidade destes íons, entre 0,1 e 10 μM , está disponível na fase líquida do solo. Para manter um crescimento saudável, plantas necessitam, no mínimo, entre 5 a 60 μM de P, dependendo da espécie. Estima-se que 5,7 bilhões de hectares ao redor do mundo contenham

quantidades insuficientes de P para um ótimo crescimento de lavouras. Para resolver o problema da deficiência de P e manter um ótimo rendimento agrícola, mais de 30 milhões de toneladas de fertilizantes fosfatados, são adicionados aos solos no mundo inteiro (International Fertilizers Industry Association, IFIA, 2005). Com base no atual consumo de fertilizantes fosfatados estima-se uma durabilidade de, no máximo, 90 anos para as fontes de P utilizadas para a produção de suprimentos agrícolas. A situação ainda é mais complicada pelo fato que 75-90% dos fertilizantes aplicados no solo rapidamente tornam-se indisponíveis para a utilização pelas plantas devido a sua ligação a cátions e compostos orgânicos. Este acúmulo de fertilizantes fosfatados em regiões agrícolas é potencialmente poluente (Miller et al., 2001) e tem causado danos ao meio ambiente. A lixiviação destes fertilizantes gera eutrofização, hipoxia e conseqüentemente, degradação de ecossistemas, principalmente os aquáticos.

O P orgânico (Po) representa até 80% do total de P presente nos solos, sendo que 50% deste estão na forma de fitato (Na-IHP). Esta forma de P orgânico parece ser utilizada apenas marginalmente pelas plantas (Hayes et al., 2000; Richardson et al., 2000). Para ser utilizado o Po precisa ser hidrolisado através da atividade de enzimas fosfatases de origem microbiana ou vegetal. A hidrólise de fitato é mediada especificamente pelas fitases, cuja contribuição para a nutrição de plantas tem sido pouco explorada. Sabe-se que a rizosfera de plantas é habitada por uma gama variada de microrganismos com papel importante na ciclagem e disponibilização de nutrientes. Espera-se que a prospecção de comunidades microbianas com capacidade de utilizar fitato como fonte de P permita a identificação de microrganismos com alta produção e atividade de fitase, que possam ser utilizados diretamente como inoculantes, fontes de genes ou enzimas para o bioprocessamento de fontes orgânicas de P.

Material e Métodos

Foram coletadas amostras de solo de diferentes linhagens de milho eficientes (L3, L161, BR3060) e ineficientes (L53, L22, Cateto) após 30 dias de germinação do milho em solo contendo altos e baixos teores de P, na camada de 0-20 cm de profundidade nos campos experimentais da Embrapa Milho e Sorgo. Em seguida, o solo bem aderido às raízes foi retirado e passado em peneira de aproximadamente 2 mm, constituindo as amostras de solo rizosférico.

Isolamento dos microrganismos da rizosfera capazes de utilizar Na-IHP

Amostras de 1 g de solo foram suspensas em 9 ml de solução salina (NaCl, 0,85%

p/v) e agitadas em shaker durante 40 minutos em temperatura ambiente. Para o isolamento dos microrganismos capazes de utilizar Na-IHP, foram preparadas diluições seriadas decimais de 10^{-1} a 10^{-4} , com três réplicas cada uma, através da transferência de 1 ml de cada suspensão para 9 ml de solução salina. Alíquotas de 0,1 ml de cada diluição foram transferidas para placas contendo meio de fitato sólido (FS), com a seguinte composição por litro: 10,0 g de glicose, 1,0 g de $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, 1,0 g uréia, 3,0 g ácido cítrico, 2,0 g citrato de sódio, 1,0 g sulfato de magnésio, 3,0 g fitato de sódio, 100 ml de Tris buffer (pH 8.0), 0,1g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 μg biotina, 20 mg tiamina-HCl, e 20,0 g de ágar. O pH foi ajustado para 7,0 usando HCl 1M antes de ser autoclavado a 120°C por 20 minutos. O isolamento dos microrganismos capazes de utilizar Na-IHP crescidos em meio de cultura suplementado com fitato como a única fonte de fósforo foi efetuado a partir de colônias puras obtidas no bioensaio para contagem de microrganismos. As colônias obtidas nesse meio foram caracterizadas morfológicamente quanto à forma, cor, presença de halo, opacidade, consistência, superfície. As colônias selecionadas foram transferidas duas vezes para novos meios de cultivo para obtenção de colônias puras. Após o isolamento e purificação os isolados foram estocados em frascos de 12 ml, que continham meio sólido BDA (Batata, dextrose e ágar). As culturas foram cobertas com 3 ml de óleo mineral esterilizados e os frascos foram fechados com rolha de plástico e identificados para conservação e realização de estudos posteriores.

Análise da capacidade de utilização de Na-IHP pelos microrganismos da rizosfera

Diluições feitas utilizando as amostras de solo coletadas da rizosfera de plantas de milho foram plaqueadas em meio sólido seletivo contendo fitato, como fonte de P. Foram pré-selecionados 174 isolados (bactérias, fungos) dos quais 45 bactérias e 45 fungos foram avaliados quanto ao potencial de mineralização de fitato em meio fitato líquido (FL) (mesma composição do meio FS sem agente geleificante. Fungos (6 mm de disco de micélio de cultura) e bactéria (10^6 a 10^8) foram inoculados em frascos erlenmeyer de 125 ml contendo 25 ml de meio (FL) e incubados por 10 dias sob agitação constante à temperatura ambiente. Em seguida, a cultura foi filtrada e o ácido fítico quantificado (Thompson et al., 1982). No tubo contendo o material filtrado foram adicionados 25 ml da solução cloreto férrico, a qual é composta pelos seguintes reagentes: 2g $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + 16,3mL HCl/L H_2O deionizada. Em seguida, o material foi agitado em banho-maria em ebulição por 75 minutos. Após esse período as amostras foram colocadas em banho de gelo por 15 minutos, seguidos de centrifugação a 140000 rpm por 15 minutos; nesta etapa o sobrenadante foi separado do ácido fítico restante no meio de cultivo. O precipitado (fitato) foi submetido a três lavagem com a

25 ml da solução de cloreto férrico descrita acima; após cada lavagem o material foi centrifugado por 15 minutos a 14000 rpm. Concentração de P presente no sobrenadante e precipitado foram determinadas após a digestão ácida com solução de nitroperclórica das amostras. Para a análise de sobrenadante, foi pipetado 1ml do material em tubo de ensaio próprio para digestão seguido pela adição de 3ml de solução nitroperclórica 2:1. Ao material do resíduo (fitato) precipitado através da solução de cloreto férrico, foi adicionado 4ml da solução de nitroperclórica. As amostras foram colocadas no bloco digestor à temperatura de 150°C durante 40 minutos. Após os 40 minutos, a temperatura do bloco foi aumentada para 250°C até o clareamento total das amostras (~30 minutos). Assim que todas as amostras estavam frias, adicionaram-se 50mL de água deionizada, seguidos por homogeneização constante. O P das amostras foi determinado usando a reação de coloração Molybdato Blue. A absorbância medida foi de 720 nm. Pipetou-se 1 ml das amostras do sobrenadante o qual foi digerido em erlenmeyer de 125ml e adicionado de 21 ml de água deionizada, mais 4ml da solução de ácido ascórbico 0,53%. As amostras do precipitado (fitato) digeridas foram diluídas 1/10. Pipetou-se 1 ml dessa diluição das amostras do precipitado para 21 ml de água deionizada procedido de 4ml da solução de ácido ascórbico, seguido por homogeneização das amostras pipetadas as quais foram deixadas em repouso por 20minutos. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 725 nm.

Resultados e discussão

Mais de 200 microrganismos cresceram no meio seletivo sólido. Posteriormente, 119 isolados cresceram em meio líquido suplementado com Na-IHP. Deste total de fungos e/ou bactérias inicialmente inoculadas, apenas 57 cresceram. Os dados apresentados nas Figuras 1A e B mostram que independente da cultivar de milho utilizada e do teor de P do solo, a maioria dos microrganismos isolados apresentou uma baixa eficiência de liberação de Pi para o meio de cultivo. A maior parte dos microrganismos mineralizadores de fitato foram isolados de genótipos ineficientes para a utilização de P (L22 e Cateto). Neste trabalho, assumiu-se que diferentes concentrações de Pi presentes no solo, bem como diferentes cultivares de milho, poderiam influenciar na distribuição da população de microrganismos produtores de fitato. Portanto, analisou-se a presença de microrganismos capazes de mineralizar fitato em cultivares de milho (eficientes e não-eficientes na utilização de Pi) crescidos em solo contendo alto ou baixo teores de Pi. Independentemente da cultivar utilizada ou do tipo de solo em que ela foi cultivada, não foi observada nenhuma diferença na presença de microrganismos mineralizadores de fitato na rizosfera. Poucos dados relativos à presença de

microrganismos mineralizadores de fitato comparando diferentes condições de manejo do solo existem na literatura. Richardson & Hadobas (1997) isolaram 238 bactérias de solos submetidos a vários tipos de manejo agrícola e observaram que as estirpes mais eficientes na mineralização de fitato vieram de solos adubados com resíduos orgânicos. Estes autores concluíram que a faixa de microrganismos nos diferentes solos capazes de utilizar fitato ainda é desconhecida. Também, Unno et al. (2005) isolaram cerca de 300 bactérias da rizosfera de *Lupinus albus* crescidos em campos experimentais mantidos sob diferentes sistemas de adubação desde 1914 (+NPKS, +NPK, +NPS, +NKS, +PKS, -NPKS). Estes autores relataram que não foi observada uma diferença clara, quando da presença de microrganismos mineralizadores de fitato, entre os diferentes “plots” que tinham sido submetidos a um longo período de fertilização química.

A maioria dos fungos e bactérias isolados nesta etapa do trabalho utilizou fitato como fonte de Pi para crescer, mas provavelmente não possuem uma fitase extracelular eficiente nas condições do experimento, pois não foram capazes de disponibilizar altas concentrações de Pi no meio de crescimento. Entretanto, a presença de microrganismos que apresentam uma atividade extracelular eficiente de fitase no solo pode ser baixa, como sugerem os dados apresentados por Richardson & Hadobas, (1997). Estes pesquisadores testaram cerca de 200 colônias bacterianas isoladas de diversos solos para a habilidade de mineralizar Na-IHP, e encontraram que apenas 0,5% do total de bactérias cultiváveis puderam utilizar este sal como fonte de P e/ou C. Isto mostra que provavelmente, seria necessário aumentar a amostragem de solo utilizada no atual trabalho para ser possível detectar microrganismos com uma atividade de fitase mais eficiente e possíveis diferenças de colonização microbiana na rizosfera dos diferentes genótipos testados.

Conclusão

Os dados mostraram que independentemente da cultivar de milho utilizada e do teor de P do solo, a maioria dos microrganismos isolados apresentou uma baixa eficiência de liberação de Pi para o meio de cultivo.

Literatura Citada

GYANESHWAR, P.; KUMAR, G. N.; PAREKH, L. J.; POOLE, P.S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 245, p. 83-93, 2002.

HAYES, J. E.; SIMPSON, R.J.; RICHARDSON, A. E. The growth and phosphorus

utilisation of plants in sterile media when supplied with inositol hexaphosphate, glucose phosphate or inorganic phosphate. *Plant and Soil*, v. 220, p.165–174, 2000.

HINSINGER, P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil*, v.237, p.133-195, 2001.

INTERNATIONAL FERTILIZERS INDUSTRY ASSOCIATION. Fertilizes. Disponível em: <<http://www.fertilizes.org>>. Acesso em: 10 jan. 2011.

MILLER, S. S.; LIU, J.; ALLAN, D. L.; MENZHUBER, C. J.; FEDOROVA, M.; VANCE, C. P. Molecular control of acid phosphatase secretion into the rhizosphere of proteoid roots from phosphorus-stressed White Lupin. *Plant Physiology*, v. 127, p. 594-606. Oct. 2001.

RICHARDSON, A.E.; HADOBAS, P. A. Soil isolates of *Pseudomonas* spp. That utilize inositol phosphates. *Canadian Journal Microbiology*, v. 43, p. 509-516, 1997.

RICHARDSON, A. E.; HADOBAS, P. A.; HAYES, J. E. Acid phosphomonoesterase and phytase activities of wheat (*Triticum aestivum* L) roots and utilization of organic phosphorus substrates by seedlings grown in sterile culture. *Plant Cell Environmental* v. 23, p. 397–405, 2000.

STEVENSON, F. J. Cycles of soil: carbono, nitrogen, phosphorus, sulfur and micronutrients. New York: J. Willey, p.380, 1986.

UNNO, Y.; OKUBO, K.; WASAKI, J.; SHINANO, T.; OSAKI, M. Plant growth promotion abilities and microscale bacterial dynamics in the rhizosphere of Lupin analysed by phytate utilization ability. *Environmental Microbiology*, v. 7, p. 396-404, 2005.

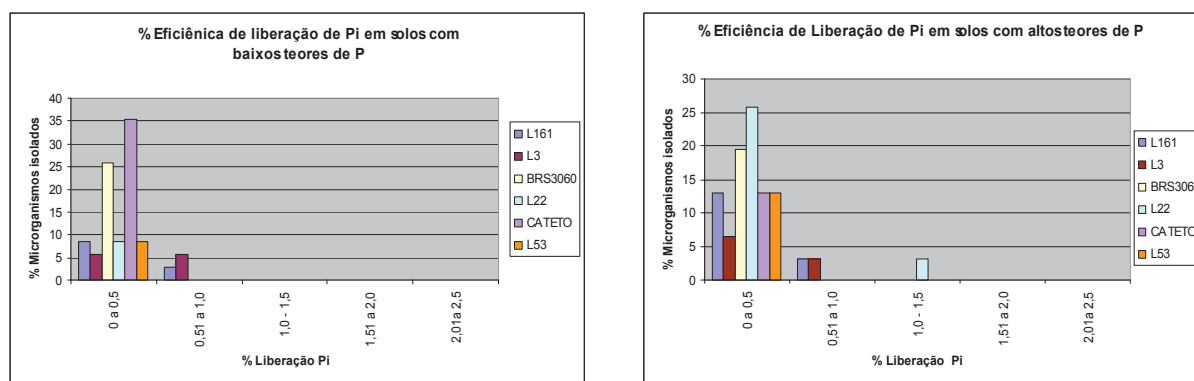


Figura 1: Eficiência da liberação de Pi por microrganismos isolados da rizosfera de diferentes cultivares de milho crescidos em solos com baixos e altos teores de P. Linhagens eficientes: L161, L3, BRS3060; Linhagens ineficientes: L22, Cateto, L53.