

## Efeito da adubação fosfatada sobre a população de micro-organismos solubilizadores e mineralizadores de fósforo isolados em rizosfera de milho

Crísia Santos de Abreu<sup>(1)</sup>; Michele da Silva Campos<sup>(2)</sup>; Ramon Silva de Oliveira<sup>(3)</sup>; Mikaely Sousa Marins<sup>(3)</sup>; Eliane Aparecida Gomes<sup>(5)</sup>; Maria Aparecida de Resende Stoianoff<sup>(4)</sup>; Christiane Abreu de Oliveira<sup>(5)</sup>.

- (1) Doutoranda em Microbiologia; Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG; Belo Horizonte; Minas Gerais; [crisiaabreu@gmail.com](mailto:crisiaabreu@gmail.com); (2) Estudante do Curso Técnico em Meio Ambiente; Escola Técnica Municipal de Sete Lagoas - ETMSL; Bolsista BIC JR do Convênio Fapemig/CNPq/Embrapa/FAPED; (3) Graduando (a) em Biotecnologia; Faculdade Ciências da Vida - FCV; Bolsista Embrapa Milho e Sorgo; (4) Professora da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG; (5) Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo.

(2)

**RESUMO:** A fertilidade do solo de regiões tropicais é substancialmente limitada pelo alto custo e baixa disponibilidade natural de fósforo (P). Como alternativa para aperfeiçoar a eficiência na labilidade desse nutriente, micro-organismos solubilizadores (MSP) e mineralizadores (MMP) de P podem ser utilizados. Objetivou-se isolar, selecionar e caracterizar MSP e MMP isolados da rizosfera de milho cultivado em diferentes manejos de adubação fosfatada. As fontes de P utilizadas foram super fosfato triplo (ST), meia dose de ST e uma mistura da metade da dose com ST e outra metade com Fosfato natural de Araxá (FA). O material vegetal de milho foi coletado em experimento de campo durante o estágio de floração desta cultura. Para a seleção dos micro-organismos foram utilizados meios de cultura contendo fontes orgânicas e inorgânicas de P para evidenciar crescimento e/ou formação de halo transparente indicador de assimilação de P. Obtiveram-se 205 morfotipos bacterianos e 99 fúngicos. De acordo com os tratamentos de adubação, ocorreram diferenças significativas entre os números de isolados MSP e MMP, sendo 62 % provenientes de solo sem adubação fosfatada e 33% de solo adubado com fosfato de rocha. O tipo de adubação fosfatada influenciou o número de isolados obtidos dependendo da disponibilidade de P no solo. Esses resultados indicam o potencial solubilizador e mineralizador dos micro-organismos a serem selecionados em áreas agrícolas com menor quantidade de P solúvel. De acordo com a caracterização macromorfológica, os resultados indicam diversidade entre os isolados, que será confirmada, posteriormente, por identificação molecular, via sequenciamento de DNA.

**Termos de indexação:** biossolubilização, fosfato, *Zea mays* L.

## INTRODUÇÃO

A fertilidade do solo de regiões tropicais, mais especificamente em regiões de Cerrado do Brasil, fica substancialmente limitada pela baixa disponibilidade natural de fósforo (P), uma vez que a deficiência desse elemento no solo acarreta alterações no metabolismo das plantas e pode prejudicar o fluxo de energia e a produção de carboidratos, gerando perdas de produtividade e até mesmo inviabilidade da safra (Simpson et al., 1997; Rodriguez & Fraga, 1999).

Micro-organismos solubilizadores (MSP) e mineralizadores (MMP) de P estão sendo utilizados como alternativa para aperfeiçoar a eficiência na utilização deste elemento disponibilizando-o para as plantas, através do fluxo de P gerado pela solubilização do P inorgânico pela produção de ácidos orgânicos, mineralização do P orgânico, pela atividade enzimática de fosfatases, dentre outros mecanismos (Oliveira et al., 2009; Richardson & Simpson, 2011; Abreu, 2014; Vassilev et al., 2014).

A rizosfera compreende a fração de solo sob influência do sistema radicular das plantas em que ocorre interações biológicas dinâmicas e exerce efeito direto sobre o crescimento de plantas e raízes (Aiken & Smucker, 1996; Hawes et al., 1998), possibilitando interações microbianas. A composição da comunidade microbiana rizosférica pode afetar a disponibilidade de P para as plantas (Marschner et al., 2006), aumentando a concentração deste elemento na região rizosférica.

Diante disto, o objetivo deste trabalho foi isolar, selecionar e caracterizar macromorfológicamente micro-organismos solubilizadores de fosfatos e mineralizadores de P orgânico isolados da rizosfera de milho cultivado em diferentes manejos de adubação fosfatada.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta das amostras

As amostras de solo rizosférico foram coletadas em experimento de campo contendo milho no estágio de floração, plantado em Latossolo Vermelho distrófico no campus experimental da Embrapa Milho e Sorgo (19°28'S 44°15'W), município de Sete Lagoas-MG, na safra 2015. Os tratamentos foram constituídos das adubações de P utilizadas no plantio, distribuídos em faixas com 3 repetições: Super Fosfato Triplo (ST), meia dose de ST e uma mistura da metade da dose com ST e outra metade com Fosfato natural de Araxá (STFA). O plantio sem adição de P foi utilizado como controle. A adubação de plantio foi realizada com base na dose de P de 100 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup>, exceto no controle sem adubação fosfatada (PO). Foram coletadas 5 plantas em cada parcela dos tratamentos de adubação para a coleta de amostras de solo de acordo com Oliveira et al. (2009), considerando-se como solo rizosférico o fortemente aderido a raízes centrais e finas.

### Isolamento de micro-organismos rizosféricos

Um total de 5 g de solo rizosférico foram peneirados, acrescentados a 45 mL de solução salina 0,85% e homogeneizados por 30 minutos. Após homogeneização, uma alíquota de 1 mL foi retirada e procedeu-se às diluições seriadas decimais (10<sup>-3</sup> a 10<sup>-5</sup>) para selecionar os micro-organismos e efetuar as contagens em cada tratamento.

### Seleção de micro-organismos rizosféricos

Após o isolamento, 100 µL de cada diluição seriada foi plaqueada em meio de cultura NBRIP (*National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium*) (Nautiyal, 1999) e Fitato de Sódio (Richardson & Hadobas 1997), contendo, respectivamente, fontes inorgânica e orgânica de P.

As placas inoculadas foram incubadas a 25 ± 3°C por até 10 dias, sendo o crescimento dos micro-organismos acompanhado diariamente. Os isolados foram selecionados pelo crescimento e/ou formação de halo transparente indicador de solubilização (**Figura 1**) no meio de cultura e o número total de isolados foram mensurados. Foram realizadas três repetições para cada plaqueamento. No tratamento controle, as placas foram inoculadas com solução salina (0,85%) esterilizada.

### Caracterização de micro-organismos rizosférico

A caracterização macromorfológica dos isolados bacterianos foi realizada segundo Hungria e Silva (2011). Para a caracterização dos isolados fúngicos, foram adotados os mesmos parâmetros de Hungria e Silva (2011), com modificações para os parâmetros tipo e consistência do micélio (Marriel 2015, comunicação pessoal).

Após o isolamento, seleção e caracterização macromorfológica, todos os micro-organismos foram incorporados à Coleção de Micro-Organismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo, após serem purificados e armazenados sob: preservação em glicerol a -20 °C e -80 °C, preservação em óleo mineral, preservação segundo método de Castellani (1939) e preservação de micélios fúngicos a 8 °C.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das amostras de solo rizosférico, obtiveram-se 200 morfotipos bacterianos e 99 morfotipos fúngicos (**Tabela 1**), selecionados pelo crescimento e/ou formação de halo transparente em meio de cultura sólido. Esses resultados indicam o potencial solubilizador e mineralizador em um total dos micro-organismos isolados.

Em geral, a eficiência solubilizadora de bactérias em meio sólido foi maior que a mineralizadora, quando comparamos o número total de isolados crescidos no meio NBRIP em relação ao meio Fitato de Sódio (**Tabela 1**). O maior número de isolados bacterianos (53,92 %) foi computado no tratamento sem adubação fosfatada, o que pode ser explicado por interferentes como um potencial solubilizador intrínseco do microbioma do solo e/ou concentração insuficiente de adubação de P nos demais tratamentos a ponto de superarem a eficiência solubilizadora da microbiota natural quanto à disponibilidade total de P. Outra possibilidade é pela redução da complexação natural de P no solo com cátions como ferro e alumínio, o que favorece a sua disponibilidade para as plantas.

O segundo tratamento com maior número de isolados bacterianos foi o STFA (39,22 %), que trata-se de uma mistura de adubação sintética (superfosfato triplo) com o fosfato de Araxá, uma apatita de origem ígnea, com alto grau de cristalização e baixa labilidade natural em ácido cítrico (Kliemann & Lima 2001). Os fosfatos naturais são insolúveis em água, mas podem ser aplicados diretamente no solo, pois o P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> contido nesses fosfatos reage diretamente com o ácido cítrico presente na rizosfera e no solo, sendo liberado pelos micro-organismos e plantas (Pérez-Montañó et al., 2014) e a absorção de fosfato, mesmo que lenta, acelera o ciclo biogeoquímico de P do solo. Além disso, a absorção direta pelas raízes que secretam substâncias ácidas potencializa a solubilidade de P na região rizosférica (Pérez-Montañó et al., 2014).

O meio de cultura NBRIP contém fonte insolúvel de P na forma de fosfato tricálcio que na presença de cloreto de cálcio e substâncias liberadas pelos micro-organismos, como ácidos orgânicos e enzimas no meio circundante, sofre

processo de solubilização que é evidenciado pela formação de um halo translúcido ao redor das colônias que apresentam capacidade solubilizadora (Nautiyal, 1999; Souchie et al., 2005; Abreu, 2014).

Para a realização deste trabalho, foram selecionados todos os morfotipos distintos que cresceram e formaram ou não halo de solubilização nos meios de cultura utilizados. Este critério de seleção foi adotado visto que alguns autores como Whitelaw et al. (2000), relatam que o potencial de solubilização e mineralização de fosfato é proporcional ao tamanho do halo e a sua relação com o tamanho da colônia. Porém, a confiabilidade desta técnica é questionável uma vez que isolados que não produzem qualquer halo visível indicativo de solubilização podem solubilizar formas insolúveis de fosfatos inorgânicos em meio líquido (Oliveira et al., 2009; Sousa, 2010).

Dentre todos os isolados caracterizados, houve variabilidade entre os parâmetros avaliados. Estes resultados indicam uma possível diversidade entre os isolados, que será verificada posteriormente pela realização da caracterização molecular dos mesmos por meio do sequenciamento do DNA.

As bactérias obtiveram características distintas, mas em sua maioria elas apresentaram uma predominância da cor branco e creme, superfície entre lisa e gomosa, forma circular, borda inteira, elevação convexa da colônia e os tamanhos foram variados. Os fungos obtiveram variações em todos os parâmetros.

### CONCLUSÕES

A caracterização macromorfológica permitiu identificar o fenótipo de cada cepa na coleção de micro-organismos, facilitando o processo de purificação e reativação em novos cultivos e testes.

O tipo de adubação fosfatada em milho influenciou o número de isolados obtidos, dependendo da disponibilidade de P no solo. O maior número de isolados foi mensurado em solo sem adubação fosfatada, seguido dos tratamentos com adição de fosfato natural.

Esses resultados indicam o potencial solubilizador e mineralizador dos micro-organismos para uso na cultura do milho a serem selecionados em áreas agrícolas com menor quantidade de P solúvel.

### AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Embrapa Milho e Sorgo e à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

### REFERÊNCIAS

ABREU, C. S. Seleção e caracterização de bactérias endofíticas isoladas de plantas de milho com potencial para a biossolubilização de rochas fosfáticas. 2014. 47 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de São João Del Rei, Sete Lagoas.

AIKEN, R.M.; SMUCKER, A.J.M. Root system regulation of whole plant growth. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v.34, p.325-346, 1996.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **J. Trop.Med.Hyg.**, 42: 225-226, 1939.

HAWES, M. C.; BRIGHAM, L. A.; WEN, F.; WOO, H. H.; ZHU, Y. Function of root border cells in plant health:pioneers in the rhizosphere. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.36, p.311-327, 1998.

HUNGRIA, M & SILVA, K. Manual de curadores de germoplasma – Micro-organismos: rizóbios e bactérias promotoras do crescimento vegetal. **Documentos 332 e 333**, 20 p. Embrapa Soja e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, 2011.

KLIEMANN, H.J. & LIMA, D.V. Eficiência agrônômica de fosfatos naturais e sua influência no fósforo disponível em dois solos de Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.31, n.2, 2001.

MARSCHNER, P.; SOLAIMAN, Z.; RENGEL, Z. Rhizosphere properties of Poaceae genotypes under P-limiting conditions. **Plant and Soil**, v.283, p.11-24, 2006.

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

OLIVEIRA, C.A.; ALVES, V.M.; MARRIEL, I.E.; GOMES, E.A.; MUZZI, M.R.S., CARNEIRO, N.P.; GUIMARAES, C.T., SCHAFFERT, R.E; SÁ, N.M.H. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in na oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, v.41,p.1782–1787, 2009.

PÉREZ-MONTAÑO, F.; ALÍAS-VILLEGAS, C.; BELLOGÍN, R.A.; CERRO, P. del.; ESPUNY, M.R.; JIMÉNEZ-GUERRERO, I.; LÓPEZ-BAENA, F.J.; OLLERO, F.J.; CUBO, T. Plant growth promotion in cereal and leguminous agriculturalimportant plants: From microorganism capacities to crop production. **Microbiological Research**, v.169, p.325-336, 2014.

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

RICHARDSON, A.E. & SIMPSON, R.J. Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability. **Plant Physiol**, v.156, p. 989–996, 2011.

RODRIGUEZ, H. & FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v.17, p.319-339, 1999.

SIMPSON, P. G.; SALE, P. W. G.; TENNAKOON, S. B. An economic analysis of the field performance of North Carolina reactive phosphate rock compared with single superphosphate for selected sites from the national reactive phosphate rock project. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v.37, p.1061-1076, 1997.

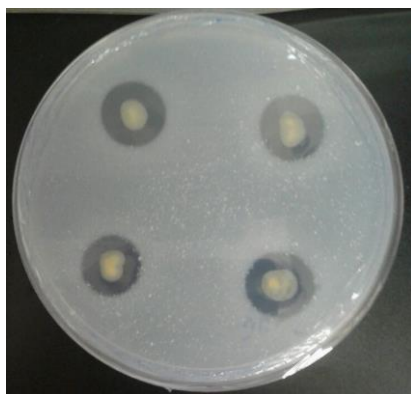
SOUCHIE, E.L.; ÁZCON, R.; BAREA, J.M.; SAGGIN-JUNIOR, O.J.; SILVA, E.M.R. Solubilização de fosfatos em meio sólido e líquido

por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.11, p.1149-1152, 2005b.

SOUSA, C.B. Solubilização de fósforo por bactérias endofíticas. 2010. 38p. **Dissertação** (mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

VASSILEV, N.; MENDES, G.; COSTA, M.; VASSILEVA, M. Biotechnological Tools for Enhancing Microbial Solubilization of Insoluble Inorganic Phosphates. **Geomicrobiology Journal**, v.31, p.751–763, 2014.

WHITELAW, M. A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. **Advances in Agronomy**, New York, v. 69, p. 99-151, 2000.



**Figura 1** - Halo de solubilização em meio sólido NBRIP formado por microrganismos capazes de solubilizarem fosfato tricálcio, fonte exclusiva de fósforo adicionado ao meio de cultura. Halo translúcido ao redor da colônia indica processo de solubilização de fósforo.

**Tabela 1** – Número de isolados rizosféricos de milho selecionados nos meios NBRIP (micro-organismos solubilizadores de fósforo) e Fitato de Sódio (micro-organismos mineralizadores de fósforo), cultivado com diferentes manejos de adubação fosfatada. Média de 3 repetições.

Adubação	Bactérias		Fungos	
	NBRIP <sup>1</sup>	Fitato de Sódio <sup>2</sup>	NBRIP	Fitato de Sódio
P0 <sup>3</sup>	55	56	15	56
ST <sup>4</sup>	2	----	6	1
½ ST <sup>5</sup>	5	----	----	----
STFA <sup>6</sup>	40	42	9	7
Total de isolados	102	98	30	64

<sup>1</sup> *National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium* (Nautiyal, 1999).

<sup>2</sup> Fitato de Sódio (Richardson & Hadobas 1997).

<sup>3</sup> Tratamento controle, sem adição de fonte de fósforo.

<sup>4</sup> Super Fosfato Triplo.

<sup>5</sup> Meia dose de Super Fosfato Triplo.

<sup>6</sup> Meia dose da mistura entre Super Fosfato Triplo e Fosfato de Araxá.