

Sobrevivência em Biopolímeros e Potencial de Bactérias Solubilizadoras de Fósforo *in vitro*

Bianca Braz Mattos¹, Christiane Abreu de Oliveira Paiva², Eliane Aparecida Gomes³,
Melissa Valença Barbosa⁴, Amanda de Oliveira Baracho⁵, Eveline Anielly Cristelli
Soares⁶, e Ivanildo Evódio Marriel⁷

^{1,2,3,7}EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. ⁴Graduanda do curso de Engenharia Ambiental, UNIFEMM/Bolsista da EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. ³Graduanda do curso de Ciências Biológicas, UNIFEMM/ Bolsista da EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG ⁵Graduanda do curso de Engenharia Ambiental, UNIFEMM/Estagiária da EMBRAPA Milho e Sorgo ¹bianca@cnpms.embrapa.br, ²christiane.paiva@cnpms.embrapa.br, ³eliane@cnpms.embrapa.br, ⁴melissavalensa@hotmail.com, ⁵mandinhabaracho@hotmail.com, ⁶evcristelli@yahoo.com.br, e ⁷imarriel@cnpms.embrapa.br

RESUMO – A adubação fosfatada é um fator limitante para a produção de milho no Cerrado. Devido aos impactos associados ao uso de fertilizantes químicos, o uso inoculantes biológicos tem se destacado como alternativa para melhorar a eficiência de fontes de fósforo (P). Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de bactérias isoladas em áreas de cultivo de milho na liberação de fósforo a partir de fontes inorgânicas e orgânicas de P, bem como a sua sobrevivência em diferentes biopolímeros como veículos de aplicação (carvão, turfa, CMC e amido). A capacidade de solubilização de fósforo de duas estirpes foi avaliada por método quantitativo (P disponível) e sua sobrevivência através da contagem de células viáveis (UFC g⁻¹ substrato) nos veículos após 30 e 60 dias de armazenamento, em geladeira e temperatura ambiente. No teste quantitativo, detectou-se liberação de P variando de 143,85 mg L⁻¹ a 120,44 mg L⁻¹ de P, para fontes inorgânicas e orgânicas, respectivamente. Quanto à sobrevivência, os inoculantes à base de amido (10⁸ células g⁻¹) apresentaram maior viabilidade, em relação a CMC, que superou turfa e carvão, aos 60 dias. Conclui-se que os microrganismos testados são promissores como bioinoculantes e que a sobrevivência da bactéria depende do substrato do inoculante.

Palavras-chave: *Zea mays*, microrganismos solubilizadores de fósforo e inoculantes.

Introdução

Um dos fatores limitantes para a produção de milho em alguns biomas brasileiros, como o Cerrado, é a baixa disponibilidade de fósforo. A aplicação de fosfatos solúveis como estratégia para o aumento da fertilidade de solos pobres esbarra em uma série de fatores, como o alto custo de adubos fosfatados e aos impactos ambientais relacionados ao uso dos mesmos, como a eutrofização e hipóxia em reservatórios hídricos.

Tendo isso, atualmente, tem aumentado a busca por alternativas para a adubação fosfatada. Uma das alternativas encontradas é a utilização de rochas naturais em associação com microrganismos do solo, denominados solubilizadores de fósforo (MSP). Estes microrganismos são capazes de liberar fósforo solúvel a partir de rochas naturais, tornando-o disponível para a nutrição da planta, solubilizando fosfatos inorgânicos, associados aos íons de Ca, Mg, Fe e Al, e também mineralizando fosfatos orgânicos como o fitato. Estudos recentes apontam que, em ensaios *in vitro*, os MSP proporcionam a

liberação de até 211mg de fósforo por litro, utilizando fosfato tricálcico como fonte de fósforo. Além disso, estudos em campo com arroz apontam que o uso de inoculantes poderia reduzir em até 50% o uso de adubos fosfatados.

Como proposto por Stephens & Rask, (2000) para que se possa formular e produzir comercialmente os inoculantes é necessário à integração dos parâmetros físicos, químicos e biológicos, permitindo assim elevadas populações do microrganismo alvo e maior tempo de sobrevivência. Os mesmos autores relatam que formulações inadequadas são frequentemente as barreiras mais comuns para a comercialização dos inoculantes.

Polímeros biodegradáveis têm sido apontados como veículos ecologicamente seguros, por serem degradado pela ação de microrganismos sem causar danos ao meio ambiente. As aplicações tecnológicas desses materiais normalmente requerem melhorias em suas propriedades mecânicas. Alguns polímeros promovem o encapsulamento das células, liberando-as após a degradação do material no ambiente e protegendo as células contra estresses ambientais, podendo, assim, favorecer a multiplicação e sobrevivência das células, quando aplicados ao solo.

Neste trabalho, duas estirpes bacterianas isoladas de áreas de cultivo de milho foram avaliadas *in vitro* quanto a sua capacidade de solubilizar e mineralizar fósforo a partir de fontes de fosfato insolúvel, bem como a sua sobrevivência em condições de armazenamento em diferentes formulações de inoculantes com veículos de aplicação.

Material e Métodos

Os microrganismos utilizados neste trabalho fazem parte da Coleção de microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo e foram isolados a partir de áreas de cultivo de milho. A estirpe testada denominada B1 foi isolada de solo de área de cultivo de milho orgânico. Enquanto a segunda estirpe, B2, foi isolada de solo rizosférico de milho cultivado em áreas com baixa disponibilidade de fósforo por OLIVEIRA *et al.* 2009.

A capacidade de solubilização de fósforo dessas duas estirpes foi avaliada qualitativa e quantitativamente. Para a análise qualitativa, as bactérias foram crescidas em meio caldo nutriente, sob agitação, a 27°C, por 6 dias. Após este período de crescimento, uma gota das suspensões bacterianas foi inoculada em meio NIBRIP (NAUTIYAL, 1999). A sua capacidade em solubilizar fósforo foi analisada através da formação de halo, após 6 dias de crescimento em temperatura ambiente. Para a análise quantitativa, suspensões bacterianas, contendo 10^9 células mL⁻¹, foram inoculadas em meios de cultura contendo

fontes orgânicas (RICHARDSON *et al.*, 2001) e inorgânicas (NAUTIYAL, 1999) de fósforo e incubadas a 27°C, sob agitação, durante um total de 12 dias. O conteúdo de fósforo solúvel (MURPHY e RILEY, 1962) e o pH do meio de cultura foram determinados a cada intervalo de três dias.

Para a determinação da sobrevivência em condições de armazenamento em diferentes veículos de aplicação, B1 e B2 foram submetidas a um teste de sobrevivência ou teste de prateleira. Neste teste, as estirpes foram inoculadas (10^9 células ml^{-1}) em diferentes veículos (carvão, turfa, carboximetilcelulose e amido) e estocadas em condições de temperatura ambiente e sob refrigeração (4°C). A contagem dos micro-organismos viáveis foi realizada mensalmente. Para tanto, os micro-organismos foram extraídos dos veículos com solução salina (NaCl a 0,85%) e plaqueados em meio batata sólido. A contagem das colônias foi realizada após 2 dias de incubação em temperatura ambiente.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram submetidos à análise estatística através do teste de ANOVA e as médias foram comparadas utilizando o teste de Bonferroni ($P < 0,05$).

Resultados e Discussão

Na tabela 1, encontram-se os resultados da análise qualitativa da solubilização de fósforo e as características morfológicas das estirpes utilizadas no trabalho. Nesta tabela podemos perceber diferenças morfológicas entre as bactérias testadas e que ambas foram capazes de formar halo de solubilização em meio NIBRIP.

Na figura 1A, encontram-se os resultados da análise quantitativa de solubilização de fósforo. A partir desta figura, podemos afirmar que a solubilização de P é tempo dependente, sendo a B2 mais eficiente na liberação P do que a B1, atingindo, ao final dos 12 dias de incubação, uma liberação de aproximadamente $143,85\text{mg L}^{-1}$ de P, nas condições de teste.

Na figura 1B, podemos acompanhar a alteração do pH do meio NIBRIP durante o crescimento microbiano. Podemos perceber que, para as duas estirpes testadas, houve uma redução do pH, sugerindo a produção e liberação de ácidos durante o período de crescimento bacteriano. Ao final dos 12 dias de incubação, houve uma variação do pH de 5.25 para 4.86 ou para 4,9, para B1 e B2, respectivamente.

Na figura 2, podemos observar os dados de liberação de fósforo a partir da mineralização do fitato. A partir desses resultados, podemos observar que existe uma diferença significativa no perfil de mineralização das estirpes estudadas. Enquanto, a B2

apresenta uma liberação de fósforo tempo-dependente, alcançando uma liberação de $120,44\text{mg L}^{-1}$ ao final dos 12 dias, a B1, apresenta o valor máximo de liberação de $55,49\text{mg L}^{-1}$ de P após 6 dias de incubação.

Na figura 3, podemos observar os resultados obtidos a partir do teste de sobrevivência dos microrganismos nos inoculantes em diferentes condições de armazenamento. No primeiro mês, a contagem dos viáveis presentes nos inoculantes armazenados em temperatura ambiente foi maior do que nos armazenados em refrigeração para todos os veículos ($P < 0,05$), exceto para turfa. O amido apresentou a maior contagem de viáveis nas duas condições de armazenamento, para B1 e B2, atingindo contagem na casa de 10^8 células g^{-1} . Os veículos que apresentaram a menor contagem de viáveis foram o carvão e a turfa (10^6 células mL^{-1}), que não apresentaram diferença significativa entre si e nem entre as condições de experimentação. No segundo mês de contagem, o resultado manteve-se semelhante ao observado durante o primeiro mês.

Analisando os impactos e dificuldades associadas ao uso de fertilizantes químicos para a adubação fosfatada, faz-se necessário o desenvolvimento de novas técnicas para a correção de solos com baixo teor de fósforo. Neste trabalho, foi demonstrada a capacidade de duas estirpes bacterianas isoladas de áreas de cultivo de milho em liberar fósforo solúvel a partir de fontes orgânicas e inorgânicas de fósforo e sua sobrevivência durante períodos de armazenamento, visando a produção de bioinoculantes.

A liberação de fósforo a partir da produção de ácidos orgânicos por microrganismos têm sido extensivamente estudada com a finalidade de se identificar estirpes eficazes na solubilização de fósforo. Ambas as estirpes avaliadas no presente trabalho promoveram a acidificação do meio de cultura durante o seu crescimento e foram eficazes em solubilizar fósforo, sugerindo a participação de B1 e B2 na produção de ácidos orgânicos importantes para este evento. Até $143,85\text{mg L}^{-1}$ de P foram liberadas ao final de 12 dias de incubação, valor muito acima do encontrado por Zhang et al. (2012), que consideraram como solubilizadores de fósforo microrganismos eficazes aqueles capazes de liberar $57,7\text{mg L}^{-1}$ de fósforo.

Além de participar da liberação de fósforo solúvel através da produção de ácidos orgânicos, B1 e B2 se mostraram eficientes na liberação de fósforo a partir de fosfatos orgânicos, chegando a liberar valores acima de 100mg L^{-1} de fósforo, ao final do período estudado. Este dado sugere a produção de enzimas envolvidas na mineralização de fósforo, denominadas fosfatases. A participação destas enzimas na mineralização de fósforo por bactérias isoladas de rizosfera foi anteriormente descrita por Oliveira et al. (2009), onde

foram isoladas seis espécies bacterianas de solo rizosférico que apresentaram a produção das mesmas.

O uso de inoculantes, já bem estabelecido para a correção de nitrogênio, tem se mostrado uma alternativa interessante para a adubação fosfatada em diversas culturas (RAJAPAKSHA et al., 2011; HINSINGER, 2001). Para a aplicação destes inoculantes, a turfa tem sido largamente utilizada. Uma vez que a turfa é um recurso natural escasso, de difícil manuseio e composição variável, alguns trabalhos sugerem a avaliação de outros veículos a serem utilizados para a formulação de inoculantes. Neste trabalho, foram comparados turfa, carvão, CMC e amido com a finalidade de avaliar o potencial desses polímeros na formulação de inoculantes.

Os resultados obtidos a partir do teste de sobrevivência utilizando amido e CMC foram iguais ou superiores aos obtidos para a turfa e o carvão, para as estirpes testadas. Não houve diferença significativa entre os dados obtidos para carvão e para turfa, sugerindo que ambos desempenham funções semelhantes na manutenção da viabilidade dos microrganismos teste *in vitro*. Os veículos utilizados na forma de gel, CMC e amido, superaram os valores de viáveis encontrados na turfa e carvão. Estes resultados sugerem que os microrganismos testados utilizam o carbono presente nesses polímeros para o seu crescimento, aumentando o número de viáveis durante o período de armazenamento, assim como o que foi descrito por da Silva et al. (2012).

A viabilidade dos microrganismos testados manteve-se relativamente estável durante o período analisado. As maiores quedas na viabilidade foram encontradas para as bactérias inoculadas no amido sendo que para a B1 na condição de armazenamento sob refrigeração (\log de unidades formadoras de colônia (CFU) $7-5 \text{ g}^{-1}$) e para B2 em temperatura ambiente (\log CFU $8-6 \text{ g}^{-1}$). Estes resultados sugerem que, assim como foi descrito por Silva e colaboradores (2012), as condições de armazenamento variam de acordo com a estirpe a ser utilizada como inoculante.

De uma maneira geral, a bactéria isolada de rizosfera é mais promissora do que a isolada de solo para a produção de um inoculante, uma vez que esta promoveu maior liberação de fósforo a partir de fontes insolúveis e também se manteve mais estável durante os períodos de armazenamento abordados neste trabalho. Quanto aos veículos, nas condições estabelecidas neste trabalho, o amido mais eficiente na preservação uma maior quantidade de viáveis, sendo necessária avaliação em prazo maior. Com isso, podemos afirmar que os microrganismos testados são promissores para o desenvolvimento de inoculantes e apresentam uma potencial aplicação tecnológica no desenvolvimento de

sistemas de produção mais sustentáveis, no entanto, existem muitos outros aspectos a serem analisados. Futuramente, características como capacidade de adesão, colonização e produção de fitohormônios, da B1 e B2, serão avaliadas para continuar caracterizando a sua aplicação como inoculantes em cultura de milho.

Agradecimento

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro.

Literatura Citada

- HINSINGER, P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil* 237: 173–195, 2001.
- MURPHY J. & RILEY J.P. A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chem. Acta.* 27: 31-36, 1962.
- NAUTIYAL, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microb. Lett.* 170: 265-270, 1999.
- OLIVEIRA, C.A., ALVES, V.M.C., MARRIEL, I.E., GOMES, E.A., SCOTTI, M;R;., CARNEIRO, N.P., GUIMARÃES, C.T., SHAFFERT, 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.* Volume 41, Issue 9, Pp. 1782–1787, September 2009.
- RAJAPAKSHA, R. M. C. P. , HERATH, D. , SENANAYAKE, A. P. & SENEVIRATHNE, M. G. T. L. Mobilization of Rock Phosphate Phosphorus through Bacterial Inoculants to Enhance Growth and Yield of Wetland Rice. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, Volume 42, Issue 3, 2011.
- RICHARDSON, A.E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28 pp. 897–906, 2001.
- STEPHENS, J.H.G. AND RASK, H.M. Inoculant production and formulation. *Field Crops Research*, 65: 249–258. 2000.
- ZHANG, J., LIU, J. , MENG, L., MA, Z., TANG, X., CAO, Y., SUN L. Isolation and Characterization of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria from Wheat Roots by Wheat Germ Agglutinin Labeled with fluorescein Isothiocyanate. *J Microbiol.*;50(2):191-8. 2012.

Tabela 1. Descrições morfológicas das colônias dos micro-organismos selecionados como solubilizadores de P e razão halo/colônia após crescimento em meio NIBRIP.

Identificação	Cor	Opacidade	Consistência	Razão Halo/colônia
B1	Borda branca, centro amarelo	Brilhante	Úmida	2,269 ± 0,115*
B2	Branca	Brilhante	Úmida	1,952 ± 0,126*

* Erro padrão da média de três repetições.

Figura 1A

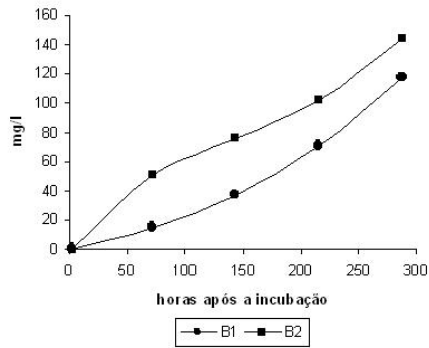


Figura 1B

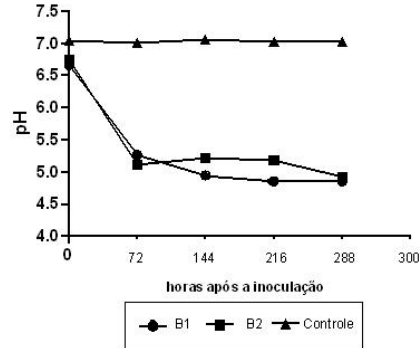


Figura 1. (A) Análise quantitativa de solubilização de fósforo. (B) Análise da alteração do pH do meio NIBRIP durante o crescimento microbiano.

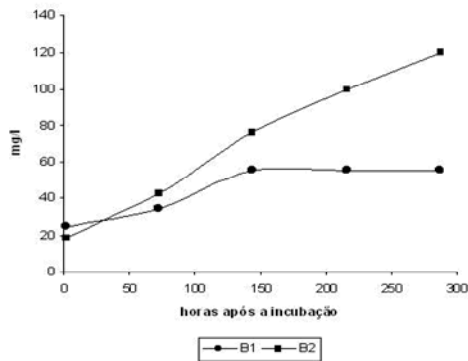


Figura 2. Análise da liberação de fósforo a partir da mineralização do fitato.

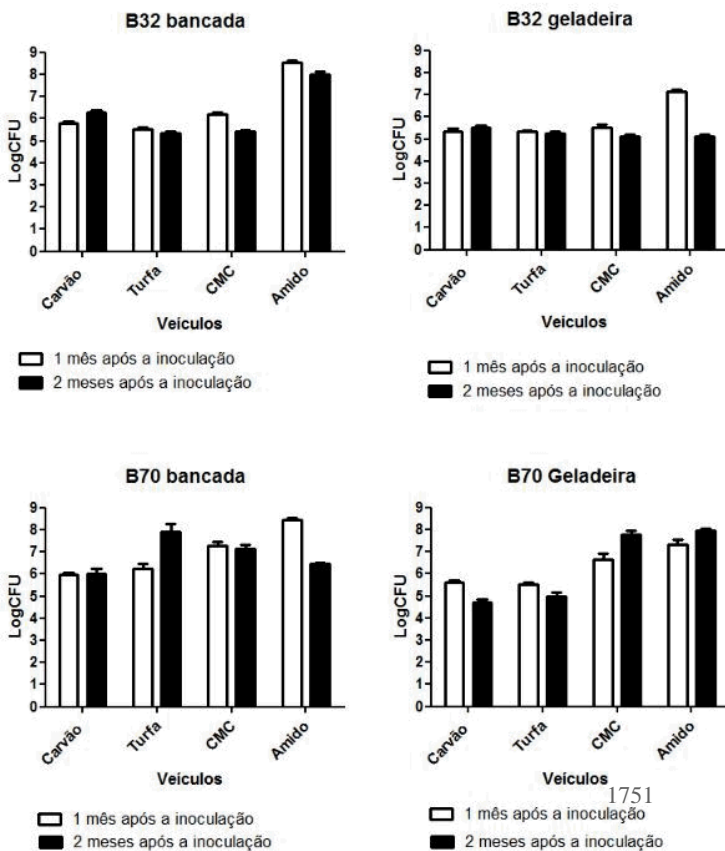


Figura 3. Teste de sobrevivência dos microrganismos em condições de armazenamento.