



Métodos para avaliar a solubilização de fosfatos por bactérias⁽¹⁾.

Clayton Albuquerque de Sousa⁽²⁾; Mario de Andrade Lira Junior⁽³⁾; Fernando José Freire⁽⁴⁾; Júlia Kuklinsky Sobral⁽⁵⁾.

⁽¹⁾Trabalho executado com recursos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq.

⁽²⁾Professor; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba; Princesa Isabel, PB; clayton.sousa@ifpb.edu.br;

⁽³⁾Professor; Universidade Federal Rural de Pernambuco; Recife, PE; mario.lira@depa.ufrpe.br;

⁽⁴⁾Professor; Universidade Federal Rural de Pernambuco; Recife, PE; f.freire@depa.ufrpe.br;

⁽⁵⁾Professor; Universidade Federal Rural de Pernambuco; Garanhuns, PE; jksobral@uag.ufrpe.br

RESUMO: Microrganismos solubilizadores de fosfato aumentam a disponibilidade do fósforo e podem aumentar a eficiência de uso de fertilizantes fosfatados. Este trabalho avaliou métodos utilizados na seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato. Isolados obtidos de cana de açúcar foram testados, utilizando meios de cultura sólidos com diferentes fontes de fósforo. Três isolados que apresentaram os maiores resultados para o índice de solubilização, três pouco solubilizadores, um isolado não solubilizador, e a estirpe padrão *Pseudomonas fluorescens* (R-243) foram testados em dois meios líquidos para avaliar modificação do pH e solubilização de P. A avaliação em meio líquido é o método mais confiável para indicar a solubilização de fosfato bicálcico por bactérias, que não está relacionado apenas com a redução do pH.

Termos de indexação: metodologia, meio de cultura, BPCP.

INTRODUÇÃO

As bactérias são um grupo de microrganismos que estão entre os principais responsáveis pelo mecanismo de solubilização de fosfatos em solos (Gull et al., 2004). Os gêneros bacterianos com o maior potencial para utilização como inoculantes para as culturas são *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Aereobacter* e *Flavobacterium* (Rodríguez & Fraga, 1999).

Em virtude desta grande variedade de organismos, a utilização de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico (BSFI) depende do conhecimento de suas características, entre as quais, a capacidade de solubilização, que varia com o microrganismo e as condições do ambiente (Silva Filho & Vidor, 2000).

Para avaliação desta capacidade, ensaios preliminares para seleção de BSFI são conduzidos em condições de laboratório, pela seleção dos microorganismos capazes de produzir um halo claro em placas de petri contendo meio de cultura sólido

com fonte de fósforo com baixa solubilidade, e aparência leitosa. Este halo é formado devido à produção de ácidos orgânicos no meio circundante (Katznelson et. al., 1962). O tipo e a concentração dos ácidos orgânicos produzidos pelos microrganismos são influenciados pela composição e concentração de substratos no meio de crescimento (Whitelaw, 2000; Pradhan & Sukla, 2005; Nahas, 2007). No entanto, a confiabilidade desta técnica é questionada porque muitos isolados que não produzem qualquer halo claro visível em placas de petri, podem solubilizar várias formas insolúveis de fosfatos inorgânicos em meio líquido (Louw & Webley, 1959; Gupta et. al., 1994).

Diante disto, a proposta do trabalho foi selecionar um meio de cultura e um método de avaliação da solubilização de fosfato inorgânico para isolados bacterianos.

MATERIAL E MÉTODOS

Solubilização de fosfato bicálcico em meios de cultura sólidos

Foram utilizados dois meios de cultura sólidos. 1) Meio VERMA e 2) Meio NBRIP, ambos modificados pela utilização do fosfato bicálcico (CaHPO_4), visando manter a mesma quantidade de P de suas formulações padrão.

Os meios de cultura foram autoclavados, distribuídos em placas de Petri de 10 cm.

Vinte isolados bacterianos previamente selecionados como solubilizadores de fosfato inorgânico (Silva et al., 2009; Barbosa et al., 2009) foram multiplicados em 50 mL de meio TS. Usando o método da gota ("drop plate") cada placa foi inoculada individualmente com 7 μL de inóculo de cada isolado (Alikhani et al., 2006).

Aos 17 dias após a inoculação (DAI) foi determinado o Índice de Solubilização (IS) (Berraquero et al., 1976):

Os dados do IS aos 17 dias após inoculação foram submetidos a ANOVA e teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade através do programa



SAS, considerando o delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 20x3 (vinte isolados x três meios) com três repetições. O experimento foi repetido para confirmação dos resultados. Os dados do experimento 1 foram transformados por $1/\sqrt{(x+1)}$ e do experimento 2 transformados por $(x+1)^{-3,3}$, conforme indicado pelo Guided Data Analysis Procedure do SAS (Sas Institute Inc, 1999).

Solubilização de fosfato em meio de cultura líquido

Para esta etapa foram selecionados três isolados que apresentaram os maiores resultados absolutos para o IS, três considerados pouco solubilizadores, um isolado considerado não solubilizador, além da estirpe padrão *Pseudomonas fluorescens* (R-243), multiplicados em meio líquido Trypticaseína de Soja, em agitador rotativo a 120 rpm por 72h.

Os meios de cultura NBRIP e VERMA foram modificados conforme etapa anterior, sem a adição de ágar. Um volume de 30 mL dos meios de cultura foi distribuído em frascos de penicilina com capacidade de 50 mL e autoclavados.

Os meios foram inoculados com 300 μL de suspensão bacteriana (5×10^8 ufc mL^{-1}) e incubados em agitador rotativo (120 rpm) à 28° C. Aos 2, 4, 6, 8, 12 e 17 dias de incubação, três frascos de cada combinação isolado e meio foram retirados do agitador.

Foi retirada uma alíquota de 10 mL do meio de cada frasco. O meio líquido foi separado das células bacterianas através de filtro de seringa com membrana 0.22 μm . O filtrado foi usado para determinação do pH e do P solúvel liberado na solução, de acordo com o método do fósforo solúvel em água (Embrapa, 1999).

O experimento foi conduzido no delineamento em blocos casualizados em arranjo fatorial 8x2x6 (sete isolados selecionados ou *Pseudomonas fluorescens* x dois meios x seis datas de avaliação), com três repetições. Quando o tempo de incubação foi significativo, foi analisado por regressão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Solubilização de fosfato bicálcico em meios de cultura sólidos

Para os meios com fosfato bicálcico, a maioria dos isolados teve comportamento semelhante nos dois experimentos para um mesmo meio, como por exemplo, os isolados UAGC 7, 17 e 46, que obtiveram IS que não diferiram, demonstrando

consistência nos resultados obtidos, principalmente no meio NBRIP (Tabela 1).

Tabela 1. Índice de Solubilização (IS) de 20 isolados bacterianos inoculados em meios de cultura NBRIP e VERMA sólidos

Isolado	Experimento 1		Experimento 2	
	Meio NBRIP	Meio VERMA	Meio NBRIP	Meio VERMA
	-----IS-----			
UAGC5	1,00 eA	0,67 eA	1,03 fA	1,10 cdeA
UAGC7	1,10 deA	1,73 abcdeA	1,36 cdeA	1,17 cdeA
UAGC8	2,22 abcdeA	1,06 cdeA	1,42 bcdA	1,21 cdeA
UAGC9	1,00 eA	1,00 deA	1,53 bcA	1,00 eB
UAGC15	1,95 abcdeA	2,37 abcA	2,07 abA	2,61 aA
UAGC16	1,39 bcdeA	0,00 fB	1,21 cdefA	0,00 fB
UAGC17	2,96 abA	2,44 abA	3,02 aA	2,06 abA
UAGC18	1,77 abcdeA	1,55 abcdA	2,66 aA	2,19 aA
UAGC19	4,06 aA	2,76 aA	3,01 aA	2,43 aA
UAGC23	1,25 cdeA	1,00 deA	1,24 cdefA	1,08 deA
UAGC26	1,05 deA	0,00 fB	1,14 defA	1,21 cdeA
UAGC29	1,00 eA	1,00 deA	1,04 efA	0,00 fB
UAGC46	1,53 bcdeA	1,09 bcdeA	1,40 bcdA	1,28 cdA
UAGC47	1,31 bcdeA	0,00 fB	0,00 gA	0,00 fA
UAGC51	1,77 abcdeA	1,53 abcdA	2,60 aA	1,40 cdB
UAGC55	2,87 abcA	1,00 deA	3,25 aA	1,10 cdeB
UAGC57	2,52 abcdA	1,08 bcdeA	3,20 aA	1,00 eB
UAGC62	1,21 cdeA	0,00 fB	1,20 cdefA	1,13 cdeA
UAGC65	3,68 aA	2,25 abcA	4,51 aA	2,08 abA
UAGC70	1,19 cdeA	1,41 abcdA	1,11 defA	1,42 bcA
CV (%)	6,7		6,8	

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, na coluna compara isolados e na linha os meios. Experimentos 1 e 2 analisados separadamente

De forma geral, o meio NBRIP proporcionou maiores IS's que o meio VERMA nos dois experimentos. Este resultado confirma que a capacidade de solubilização de fosfato por bactérias pode ser influenciada pela composição do meio (Nautiyal et al., 2000; Silva Filho & Vidor, 2001; Dave & Patel, 2003; Ahuja et al., 2007).

O melhor potencial do meio NBRIP para demonstrar a solubilização de fosfato em comparação a outros meios foi observada por Nautiyal (1999), trabalhando com várias estirpes eficientes. O autor verificou um melhor efeito sinérgico sobre a atividade de solubilização de



fosfato com $MgCl_2$ adicionado na presença de $MgSO_4$. Estes dois compostos fazem parte do meio NBRIP, enquanto o meio VERMA só contém $MgSO_4$.

De forma geral, a diferença para o IS entre os meios tornou-se mais evidente para os isolados pouco solubilizadores. Isto indica que a diferença de composição do meio de cultura afeta mais negativamente o comportamento dos isolados que não são bons solubilizadores, chegando a inibir completamente esta atividade, como aconteceu com os isolados UAG's 16 e 29.

Solubilização de fosfato em meio de cultura líquido

No meio NBRIP, a solubilização do P pelos isolados UAGC 17, 19 e 26 se manteve constante no período avaliado. Os isolados UAGC 17 e 19 solubilizaram no meio NBRIP, quantidades médias superiores aos da estirpe padrão. A ausência de regressão significativa para os isolados UAGC's 17 e 19 no meio NBRIP é positivo, e significa que o meio apresentou fósforo solúvel já no 2º dia após inoculação, e manteve os teores estáveis até o 17º dia após inoculação (Figura 1).

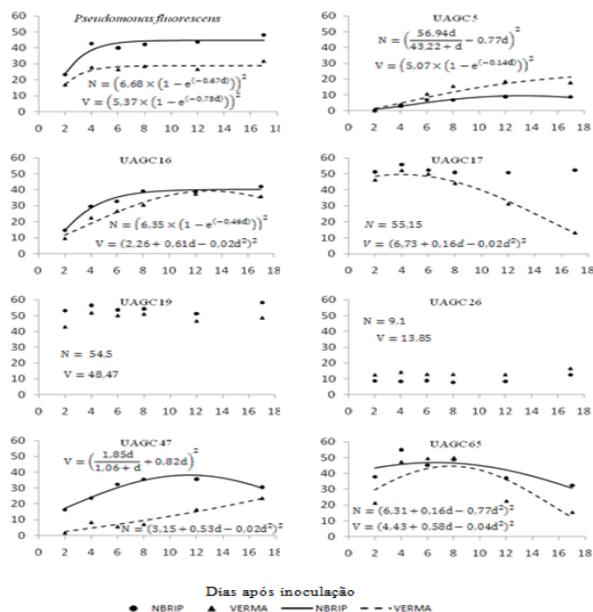


Figura 1 – Fósforo solubilizado no meio de cultura NBRIP (N) e VERMA (V) durante 17 dias de incubação com bactérias solubilizadoras de fosfato. Valor de cada ponto representa média de três repetições subtraindo-se a média do P solubilizado do tratamento sem inoculação. d=dias após inoculação

No meio VERMA estes dois isolados demonstraram comportamento diferentes, com o UAG 17 apresentando regressão significativa, enquanto o UAG 19 não. O meio de cultura possivelmente influenciou este resultado, e para o isolado UAG 17, o meio VERMA não proporcionou a mesma condição para este isolado manter níveis constantes de P solubilizado durante o período avaliado.

Além do isolado UAGC 19, citado acima, os isolados UAGC's 16, 17 e 65 solubilizaram mais P que a estirpe padrão quando inoculados no meio VERMA, porém a máxima quantidade de P no meio de cultura foi encontrada em períodos diferentes, respectivamente aos 13, 4 e 8 dias após inoculação.

O estado físico do meio de cultura, a agitação e o próprio método utilizado podem ser fatores que influenciaram esses resultados, já que no meio sólido, a medição do diâmetro do halo de solubilização não permite quantificar o que foi solubilizado, enquanto em meio líquido, a determinação do teor de P solúvel no meio é uma medida que demonstra mais fielmente a capacidade solubilizadora do isolado (Gupta et al., 1994; Nautiyal, 1999; Alikhany et al., 2006).

Embora a magnitude da acidificação promovida por cada isolado tenha sido distinta entre os dois meios, o comportamento geral foi semelhante em cada isolado (Figura 2).

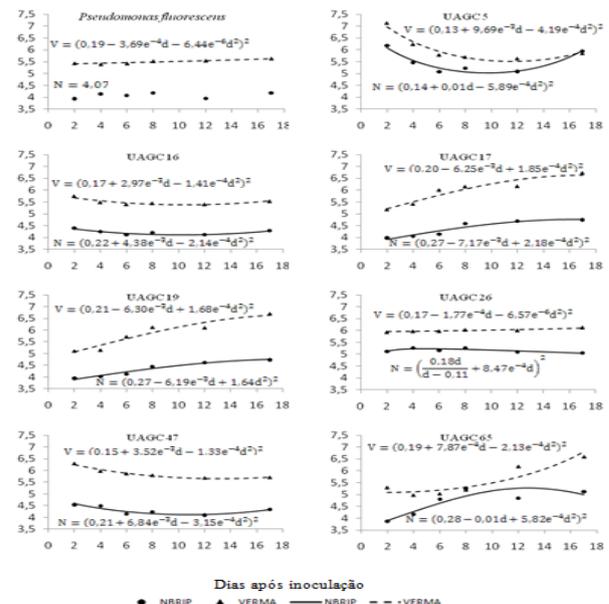


Figura 2 – Evolução do pH do meio de cultura NBRIP (N) e VERMA (V) durante 17 dias de incubação com bactérias solubilizadoras de fosfato.



Valor de cada ponto representa média de três repetições subtraindo-se a média da redução do pH no tratamento sem inoculação. d=dias após inoculação.

Os isolados UAGC 17, 19, 65 e a estirpe padrão promoveram maior acidificação aos 2 dias após inoculação, com tendência de redução da acidificação nas datas seguintes nos dois meios, com exceção da estirpe padrão no meio NBRIP, que manteve o pH em 4,0 até o 17º dia após inoculação. Estes isolados foram os que mais solubilizaram o P nos meios de cultura, demonstrando que, para alguns isolados, a acidificação do meio pode ser a etapa inicial de todo o processo de solubilização e que, com o passar do tempo, este processo pode ser maximizado, minimizado ou permanecer estável, de acordo com outras características intrínsecas ao metabolismo de cada microrganismo.

No meio NBRIP, os isolados UAGC 16 e 47 acidificaram os meios a níveis semelhantes aos dos isolados citados acima, mas apenas aos 11 dias após a inoculação, quando se observou também a máxima solubilização de P destes isolados neste meio. Este fato demonstra um processo mais lento de acidificação e de solubilização do P, mas que pode atingir níveis semelhantes ao demonstrado pela estirpe padrão.

Estes mesmos isolados tiveram comportamentos diferentes no meio VERMA. Este resultado demonstra que, provavelmente, existem outros fatores além da acidificação, associados ao processo de solubilização de fosfatos por bactérias (Siqueira & Franco, 1988; Silva Filho & Vidor, 2000).

Além disto, como um grupo de isolados tem maior capacidade de solubilizar o P, superando a estirpe padrão, outras características devem estar presentes para uma recomendação de bactérias para utilização como inoculantes. A exemplo da estirpe padrão, uma destas características é a manutenção do pH em níveis estáveis e que provavelmente manterá o P solubilizado também em níveis constantes ao longo do tempo. Trabalhos que avaliaram solubilização de fósforo por estirpes padrão demonstraram este comportamento constante dos níveis de pH (Illmer & Schinner, 1995; Alikhany et al., 2006; Narsian et al., 2008)

De forma geral, o meio NBRIP apresentou maior acidificação que o meio VERMA. Apesar de no início do experimento seu pH já ser 0,2 pontos menor que o pH do VERMA, este fato pode ter influenciado pouco, visto que ao final do experimento, a diferença entre o pH dos dois meios

inoculados com o mesmo isolado foi em alguns casos maior que 1 ponto.

CONCLUSÕES

A avaliação em meio líquido é o método mais confiável para indicar o potencial de solubilização de fosfato bicálcico por bactérias.

REFERÊNCIAS

GULL, M.; HAFEEZ, F.Y.; SALEEM, M.; MALIK, K.A. Phosphorus uptake and growth promotion of chickpea by co-inoculation of mineral phosphate solubilising bacteria and a mixed rhizobial culture. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, v. 44, n.6, p.623-628, 2004.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Org. Fabio Cesar da Silva. Brasília. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. 1999. 370p.

