7ª JORNADA CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DO IFSULDEMINAS
4º SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO
12 de novembro de 2015 | Poços de Caldas - MG

BIOSSOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO *in vitro* POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

Flávia R. C. SOUZA[1]; Ligiane A. FLORENTINO[2]; Adauton V. REZENDE[3]; José R. MANTOVANI[4]

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial de solubilização de fosfato natural Gafsa e Arad por estirpes de bactérias fixadoras de N_2 (BFN). Estas foram cultivadas em meio de cultura líquido por 7 dias. Foi utilizado o DIC em esquema fatorial 8X2 com 4 repetições. A estirpe UNIFENAS 100-16 apresentou maior capacidade de solubilização em ambas as fontes de P. Foi verificado que a maior solubilização de P está diretamente relacionada ao abaixamento do pH da suspensão.

INTRODUÇÃO

O fósforo (P) constitui-se num elemento fundamental para o metabolismo dos vegetais, limitando o desenvolvimento e a produtividade das plantas (GRANT et al., 2001). Os fertilizantes fosfatados são basicamente classificados em fontes solúveis e insolúveis. As solúveis, representadas pelos adubos industrializados, quando adicionadas ao solo, aumentam rapidamente a concentração do elemento P na solução do solo. No entanto, possuem sua eficiência reduzida ao decorrer do tempo ocasionado pelo processo chamado de "adsorção" ou "fixação" de P. Segundo Volkweiss e Rail (1977), este processo se explica através das características físico-químicas do solo. No Brasil, por exemplo, devido à baixa fertilidade natural e aos minerais, caracterizados, predominantemente, pela presença de cargas de superfície variáveis que em condições de reação ácida a moderadamente ácida são capazes de reter íons fosfatos (KAMPRATH, 1977; VOLKWEISS; RAIJ, 1977; HEDLEY et al., 1990; NOVAIS et al., 1991).

[1] Graduanda em Agronomia pela Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS – Campus Alfenas. Alfenas/MG – Email: flavia_romam@hotmail.com
[2,3,4] Docentes da Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS – Campus Alfenas. Alfenas/MG - Email: ligiane.florentino@unifenas.br ; adauton.rezende@unifenas.br ; mantovanijr@yahoo.com

Já as fontes insolúveis, caracterizadas pelos fosfatos naturais, possuem como principal característica, a lenta dissolução no solo, apresentando a tendência de aumentar a disponibilidade do P para as plantas ao longo do tempo. Os fosfatos naturais, em geral, oferecem menor eficiência em relação aos fosfatos solúveis a curto prazo, entretanto a longo prazo seu efeito residual é geralmente maior, apresentando maior viabilidade de utilização em culturas perenes (KORNDORFER, 1978).

As rochas fosfáticas de origem ígnea, como a maioria das rochas brasileiras (Araxá, Catalão), são distinguidas por sua pequena reatividade para aplicação direta como fertilizante. Já as rochas de origem sedimentar podem ser reativas ou não, dependendo do grau de substituição isomórfica. As rochas de alta eficiência são aquelas provenientes, por exemplo, da Tunísia (fosfato natural de Gafsa) e Israel (fosfato natural de Arad) (LÉON et al., 1986). Os fosfatos naturais brasileiros visto serem estes, por natureza geológica, de baixa reatividade, variando de 23 a 42 %, em comparação com o valor de 60% a 97% dos fosfatos naturais da Tunísia e Israel podem ter sua eficiência acrescida associadas à micro-organismos.

No entanto, considerando o fósforo um recurso finito e insubstituível, uma vez que as reservas do Brasil e do mundo em geral vêm se esgotando e que o processo de extração desse elemento é oneroso e complexo (POTAFOS, 2004), são necessárias novas formas alternativas para suprir a necessidade desse elemento e/ou aumentar sua disponibilidade no solo. Uma das alternativas seria a utilização de inoculantes de microrganismos benéficos, como bactérias diazotróficas solubilizadoras de fosfato (SILVA FILHO; VIDOR, 2000).

Estes microrganismos além de solubilizarem fosfatos através da liberação de ácidos orgânicos, resultante de seu metabolismo, favorece o desenvolvimento vegetal (GULL et al., 2004). Também podem atuar em sinergia com rizóbios, beneficiando a nodulação, já que disponibilizam P para a planta, visto que a fixação biológica de N_2 é um processo exigente em P. Justificam-se então estudos visando maximizar a solubilização de fosfatos naturais através de microrganismos, diminuindo assim, o custo de produção e suprindo a necessidade de fontes alternativas para adubação fosfatada, visto que os adubos fosfatados solúveis são finitos.

Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial de solubilização de fósforo de duas fontes de fosfatos natural, Gafsa e Arad, por estirpes de bactérias fixadoras de N_2 (BFN).

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Agrícola da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS).

Foram selecionadas sete estirpes de bactérias diazotróficas pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia Agrícola da UNIFENAS provenientes de solos rizosféricos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, dos municípios de Alfenas e Machado, Sul de Minas Gerais (tabela 1). Essas bactérias foram isoladas em quatro meios de cultura semi-sólido e semi-seletivo: JMV (REIS et al., 2004), JNFb, LGI e NFb (DOBEREINER et al., 1995).

Tabela 01. Identificação, local de isolamento, concentração de fósforo nos solos de origem, meio utilizado para isolamento das bactérias e características morfológicas das estirpes cultivadas em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) contendo azul de bromotimol como indicador de pH.

Estirpes	Fósforo disponível dos solos de origem ($mg.dm^{-3}$)	Meio de cultivo de origem	Características morfológicas em meio de cultura BDA		
			pH	Cor	EPS[(1)]
Isoladas no município de Alfenas, MG					
UNIFENAS 100-01	0,5	JNFb	Ácido	Amarela	Baixa
UNIFENAS 100-16	1,0	JMV	Ácido	Amarela	Baixa
UNIFENAS 100-39	0,5	JNFb	Ácido	Amarela	Média
UNIFENAS 100-40	0,5	JNFb	Ácido/alcalino	Amarela	Baixa
Isoladas no município de Machado, MG					
UNIFENAS 100-10	1,0	JNFb	Ácido	Amarela	Alta
UNIFENAS 100-13	0,5	JNFb	Ácido	Amarela	Alta
UNIFENAS 100-27	0,5	LGI	Ácido	Amarela	Média

[(1)]EPS - produção de exopolissacarídeos

As estirpes bacterianas foram cultivadas em meio batata líquido até a fase log de crescimento e posteriormente 15 µL de cada suspensão bacteriana foram inoculadas em frascos contendo 50 mL de meio NBRIP modificado (L^{-1}): 10 g de glicose; 0,5 g de extrato de levedura; 0,2 g $MgSO_4$; 0,02 g $CaCl_2$; 0,1 g NaCl; 0,1 g KNO_3; 4 mL $FeCl_3$; 2 mL de solução de micronutrientes e 10 g do fosfato natural de Arad ou Gafsa.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 8 x 2, sendo sete tratamentos inoculados com as estirpes bacterianas e um tratamento sem inoculação e duas fontes de fosfato natural (Arad e Gafsa). Foram utilizadas quatro repetições. As amostras foram incubadas durante 7 dias a 25 C°. Após esse período, foi realizada a centrifugação (5.000 rpm, 10 min., 4 C°) para retirada do sobrenadante, o qual foi utilizado para análise do P disponível em espectrofotômetro com comprimento de onda de 660 nm e análise do valor do pH.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise do teor de P disponível no sobrenadante, foi observada uma significativa taxa de solubilização de P pelas estirpes bacterianas testadas, quando comparado ao controle sem inoculação (tabela 2).

A estirpe UNIFENAS 100-16 apresentou maior capacidade de solubilização dos fosfatos naturais quando comparada as outras estirpes bacterianas. No entanto, observa-se maior valor de P disponível quando esta estirpe foi cultivada na presença do fosfato natural Arad (tabela 2).

É importante destacar o nível de reatividade, que pode variar de acordo com o grau de substituição isomórfica. Sendo assim, de acordo com a tabela 2 pode-se observar que o fosfato natural de Arad possui maior reatividade e consequentemente maior eficiência quando comparado ao fosfato natural de Gafsa.

Tabela 2. Valores de fósforo residual (P) (mg dm^3) em meio de cultura NBRIP suplementado com duas fontes de fosfato natural distintas, incubado por sete dias[(1)].

Tratamentos/Fontes de P	Fosfato Natural de Arad	Fosfato Natural de Gafsa
Controle	0,00 G a	0,0 E a
UNIFENAS 100-01	2,48 C a	1,77 B b
UNIFENAS 100-10	1,65 D a	1,27 C b
UNIFENAS 100-13	3,14 B a	1,43 C b
UNIFENAS 100-16	4,89 A a	3,77 A b
UNIFENAS 100-27	0,90 E a	0,38 D b
UNIFENAS 100-39	0,45 F a	0,18 E b
UNIFENAS 100-40	0,31 F a	0,05 E b

[(1)]Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Uma das condições para a solubilização do fosfato natural é a existência de condições ácidas no solo (NOVAIS; SMITH, 1999). Desse modo, de acordo com a tabela 3, a estirpe bacteriana UNIFENAS 100-16 apresentou maior acidificação do meio e maior poder de acidificação no fosfato natural de Arad, quando comparada as outras estirpes e quando comparada entres os dois fosfatos naturais testados, respectivamente.

Sendo assim, estes micro-organismos, através da liberação de ácidos orgânicos (SOUCHIE et al, 2005) resultante de seu metabolismo, são capazes de solubilizar o P favorecendo o desenvolvimento vegetal de acordo com a relação das tabelas 2 e 3.

Tabela 3. Valores de pH final do meio de cultura NBRIP suplementado com duas fontes de fosfato natural distintas, incubado por sete dias[(1)].

Tratamentos/Fontes de P	Fosfato Natural de Arad	Fosfato Natural de Gafsa
Controle	6,00 A a	5,89 A a
UNIFENAS 100-01	4,22 C a	3,75 C b
UNIFENAS 100-10	4,26 C a	3,70 C b
UNIFENAS 100-13	3,90 D a	3,57 C a
UNIFENAS 100-16	3,40 E b	3,93 C a
UNIFENAS 100-27	5,40 B a	5,17 B a
UNIFENAS 100-39	5,13 B a	3,62 C b
UNIFENAS 100-40	5,70 A a	5,65 A a

[(1)]Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade

CONCLUSÕES

As estirpes apresentaram comportamentos diferenciados quanto à capacidade de solubilizar fósforo dos fosfatos naturais de Gafsa e Arad, destacando-se a estirpe UNIFENAS 100-16.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA PESQUISA DA POTASSA E DO FOSFATO (Brazil). **Fósforo na Agricultura Brasileira**. Piracicaba-SP: Potafos, 2004. 726 p.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. & BALDANI, V. L. D. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas.** Brasília, Embrapa-SPI. Itaguaí, Embrapa- CNPAB, 1995. 60p.

GRANT, C.A.; PLATEN, D.N.; TOMAZIEWICZ, D.J.; SHEPPARD, S.C. **A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta**. Informações Agronômicas, Piracicaba, n.95, 2001

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**, Collingwood, v.44, n.6, p.623-628, 2004

HEDLEY, M.J.; HUSSIN, A.; BOLAN, M.S. New approaches to phosphoruus fertilization. In: SYMPOSIUM OF PHOSPHORUS REQUIREMENTS FOR SUSTAINABLE AGRICULTURE IN ASIA AND OCEANIA, 1, 1990, Los Banos. **Proceedings…**Manila: IRRI, 1990. p.125-142.

KAMPRATH, E. J. Phosphorus fixation and availability in highly weathered soil. In: FERRI, M. G. (Coord.). SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO: BASES PARA UTILIZAÇÃO AGROPECUÁRIA, 4., 1977, Belo Horizonte. **Anais...** São Paulo: Universidade de São Paulo, 1977. p.333-347.

KORNDÖRFER, G.H. **Capacidade de fosfatos naturais e artificiais foenecerem fósforo para plantas de trigo**. Porto Alegre, 1978. 66p. Tese (Mestrado)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

LÉON, L.A.; FENSTER, W.E.; HAMMOND, L.L Agronomic Potencial of Eleven Phosphate Rocks from Brazil, Colombia, Perú and Venezuela. **Soil Science Society of America Journal**, v.50, p.798-802, 1986.

NOVAIS, F.R.; SMYTH, T.J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais.** Viçosa: UFV, 1999. 399p

NOVAIS, R.F.; NEVES, J.C.L.; BARROS, N.F. Aspectos físicoquímicos envolvidos na fixação do fósforo no solo. In: ENCONTRO NACIONAL DE ROCHA FOSFÁTICA, 5., 1991. São Paulo. **Anais...** São Paulo: 1991. p. 133-177.

REIS JUNIOR, F. B.; SILVA, M. F.; TEIXEIRA, K. R.; URQUIAGA, S. and REIS V. M. Identification of Azospirillum amazonense isolates associated to Brachiaria spp. at different stages and growth conditions, and bacterial planthormone production. Rev. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, nº1, p.103-113, 2004.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v.24, n.2, p.311-319, 2000.

SOUCHIE, E. L. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Revista Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.40, n.11, p.1149-1152, nov. 2005

VOLKSWEISS, S.; RAIJ, B. van. Retenção e disponibilidade de fósforo em solos. In: FERRI, M. G., (Coord.) SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO: BASES PARA UTILIZAÇÃO AGROPECUÁRIA, 4., 1977, Belo Horioznte. **Anais...** São Paulo: Universidade de São Paulo, 1977. p. 317-332.