

SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS INORGÂNICOS POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE MARACUJÁ AMARELO (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*)

Clayton dos Santos Silva^{1*}, Felipe Alexandre Tenorio², João Manoel da Silva³,
Érica Lívea Ferreira Guedes Celestino³, Romário Guimarães Verçosa de Araújo⁴,
Jessé Rafael Bento de Lima⁵, Yamina Coentro Montaldo⁶,
Tania Marta Carvalho dos Santos⁷

¹Autor Principal, Laboratório de Microbiologia – Centro de Ciências Agrárias/UFAL, *clayton@live.com.pt

²Mestre, Programa Fitossanitário da Soja – Luís Eduardo Magalhães BA

³Doutorando, Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO

⁴Graduando, Laboratório de Ecologia e Comportamento de Insetos – Centro de Ciências Agrárias/UFAL

⁵Graduando, Grupo Agroecológico Craibeiras – Centro de Ciências Agrárias/UFAL

⁶Doutora, Laboratório de Microbiologia – Centro de Ciências Agrárias/UFAL

⁷Professora Orientadora, Laboratório de Microbiologia – Centro de Ciências Agrárias/UFAL

Resumo-Abstract

RESUMO - O Fósforo (P) é um dos principais macronutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas, entretanto, apesar de abundante nos solos, tanto na forma orgânica quanto inorgânica, o fósforo é o segundo nutriente limitante ao crescimento de plantas. As bactérias solubilizadoras de fosfato são capazes de solubilizar formas insolúveis de fósforo, tornando-o disponível para o crescimento das culturas. Assim, objetivou-se por meio desse trabalho quantificar a solubilização de fosfatos inorgânicos por bactérias endofíticas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*). Foram inoculadas em meio líquido NBRIP, 21 estirpes bacterianas, sendo posteriormente incubadas em plena agitação por um período de 15 dias. Decorrido o tempo de incubação, 1000 µL de cada amostra foi transferida para microtubos, com a adição do reagente molibdato-vanadato para leitura em espectrofotômetro a 420 nm de densidade ótica (D.O.), classificando-as em ausente, baixa, media, alta e elevada solubilização de fósforo. Dos isolados avaliados, as maiores concentrações de P solubilizado foram encontradas nas estirpes 2 e 9, consideradas portanto, como candidatas para futuros testes de inoculação em plantas.

Palavras-chave: micro-organismos, fosfato tricálcico, fósforo solúvel, promoção de crescimento.

ABSTRACT – Phosphorus (P) is one of the main essential macronutrients for the growth and development of plants, however, although abundant in soils, both organic and inorganic, phosphorus is the second nutrient limiting the growth of plants. Phosphate solubilizing bacteria are able to solubilize insoluble forms of phosphorus, making it available for crop growth. Thus, aimed by this work to quantify the solubilization of inorganic phosphates by endophytic bacteria of passionfruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*). NBRIP, 21 bacterial strains were inoculated in liquid medium and were incubated in full agitation for 15 days. After the incubation time, 1000 µL of each sample was transferred to microtubes, with the addition of molybdate-vanadate reagent for spectrophotometer reading at 420 nm, classifying them as absent, low, medium, high and high solubility of phosphorus. Of the isolates evaluated, the highest concentrations of solubilized P were found in strains 2 and 9, therefore considered as candidates for future inoculation tests in plants.

Keywords: microorganisms, tricalcium phosphate, soluble phosphorus, growth promotion

Introdução

O fósforo (P) é um dos principais macronutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas devido à sua atuação em processos biológicos, tais como metabolismo energético, biossíntese de fosfolipídios e ácido nucléico, transdução de sinal e regulação de atividade enzimática (ROCHA et al., 2007).

Apesar de abundante nos solos, tanto na forma orgânica quanto inorgânica, o fósforo é o segundo nutriente limitante ao crescimento de plantas no solo. A baixa disponibilidade de P, principalmente nos solos ácidos das regiões tropicais e subtropicais, é um dos fatores limitantes para a produção de culturas vegetais. Sendo necessária altas dosagens de adubos fosfatados para a obtenção de alta produtividade (RAIJ, 1991).

O maracujazeiro é originário da América Tropical, com mais de 150 espécies dentro da família Passifloraceae utilizadas para consumo humano. No Brasil as espécies de maracujá mais cultivadas são o azedo ou amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), maracujá-roxo (*P. edulis*) e o maracujá-doce (*P. alata*) (LIMA et al., 2009).

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá com produção de 920 mil toneladas por ano, em uma área de 62 mil hectares, sendo os maiores produtores são os estados da Bahia, Ceará, Espírito Santo, Sergipe, Pará, Minas Gerais e São Paulo (IBGE, 2012). Aproximadamente 97% da área cultivada no Brasil é com o maracujazeiro azedo (FERRAZ; LOTT, 2006), e 60% desta produção é destinada ao consumo in natura e o restante destinado industrialização (MELETTI, 2011).

Os micro-organismos associados às plantas são considerados endofíticos, quando habitam o interior da planta sem causar danos aparentes ao hospedeiro (HALLMANN et al., 1997).

Vários são os exemplos da aplicação de micro-organismos endofíticos na produção agrícola, onde a capacidade de estimular o crescimento vegetal apresentada pelos micro-organismos endofíticos tem sido atribuída a mecanismos indiretos como antagonismo a fitopatógenos e diretos, tais como fixação do nitrogênio, produção de fitohormônios e a solubilização de fosfatos inorgânicos, que proporcionarão uma maior resistência das plantas a condições de estresse (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002; LUZ et al., 2006).

Os micro-organismos solubilizadores de fosfatos desempenham importante papel na disponibilização de formas inorgânicas de fosfatos (Ca-P, Al-P e Fe-P), considerando o aumento do teor de fósforo na solução, que propicia melhor crescimento e maior rendimento das culturas (CHABOT et al., 1993).

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou quantificar o fósforo solúvel a partir do cultivo de bactérias endofíticas de maracujá amarelo em meio líquido acrescido de fosfato tricálcico.

Metodologia

A análise quantitativa da solubilização de fosfato de cálcio foi realizada segundo metodologia descrita por (MALAVOLTA, 1989; SILVA, 1999), com a utilização de tubos de ensaio contendo 10mL do meio líquido NBRIP foram inoculados em triplicata com 100µL de inóculo bacteriano (10^8 UFC.mL⁻¹(D.O. 550 = 0,1)), e o seu pH ajustado para 7,0 antes da autoclavagem. O controle constituiu-se de tubos com 10mL de meio NBRIP sem inóculo. Todos os tubos foram incubados por 15 dias a 28 °C em agitação a 180 rpm.

Decorrido o tempo de incubação, 1000 µL de cada amostra foi transferida para microtubos de 1,5 mL, que foram centrifugados a 10000 rpm por 5 minutos. Então, a 145µL de cada amostra foram adicionados 570µL de água destilada e

285µL do reagente molibdato-vanadato de amônio (5% molibdato de amônio e 0.25% vanadato de amônio; 1:1, v/v).

Para obtenção da curva padrão, foi preparada uma solução estoque de KH₂PO₄ (0.0875%) (0.1 mg P.mL⁻¹), de onde foram retiradas alíquotas de 1 mL até 10 mL, que foram misturadas com 2.5mL do reagente molibdato-vanadato de amônio para um volume final de 50mL. Após 10 minutos da adição do reagente, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 420nm.

Para o controle negativo em espectrofotômetro, utilizou-se a solução sem inóculo, constituída de 145µL do meio NBRIP, adicionado de 570µL de água destilada e 285µL do reagente molibdato-vanadato de amônio.

Os experimentos foram realizados em triplicata e o resultado positivo foi evidenciado pela formação de uma coloração amarelada. Os resultados obtidos em absorbância (valores de x), foram convertidos em concentração de P (µg.mL⁻¹) (y) por meio da equação $y = (0.3041x2 + 0.2566x + 0.0213) * 1000$. As estirpes foram classificadas de acordo com os seguintes índices: Ausência de solubilização (-); < 50 µg.mL⁻¹ (Baixa solubilização - +); 50-100 µg.mL⁻¹ (Média solubilização - ++); 101-500 µg.mL⁻¹ (Alta solubilização - +++); > 501µg.mL⁻¹ (Elevada solubilização - ++++) de P-Ca.

Figura 1. Concentração de Fósforo solúvel µg.mL⁻¹ em meio NBRIP líquido inoculado pelos isolados após 15 dias de cultivo.



(Foto: Yamina Coentro Montaldo).

Resultados e Discussão

A Tabela 1 apresenta a análise de variância da solubilização de fosfato em meio NBRIP líquido, em quinze dias de cultivo por isolados de bactérias o valor de cada ponto representa média de nove repetições subtraindo-se a média do P solubilizado do tratamento sem inoculação. Os isolados bacterianos constituíram o único fator estatisticamente significativo (teste F, P < 0,01) na solubilização de fosfato inorgânico em meio NBRIP líquido, não foram detectados efeito do tempo de incubação ou da interação.

Tabela 2. Análise de variância da solubilização de fosfato em meio NBRIP líquido, em quinze dias de cultivo por isolados de bactérias.

FV	G	SQ	QM	F
	L			
Isolados (I)	20	330194.8675	16509.7433	150.5017**
Tempo (T)	4	512.84681	128.21170	1.1688 ^{ns}
Int. IxT	80	9684.36385	121.05455	1.1035 ^{ns}
Resíduo	210	23036.58688	109.69803	
Total	314	363428.6650	5	
CV%	15			

** significativo p < .01; ^{ns} não significativo p > = .05.

Na tabela 2 estão apresentados os resultados da análise quantitativa em µg.mL⁻¹, a solubilização do P se manteve constante no período avaliado solubilização para todos os isolados. A quantidade média de fósforo solúvel ao final do ensaio variou de 29,87 a 178,68 µg.mL⁻¹. As maiores concentrações de P solubilizado foi encontrado no isolado 2 e 9 (178,68 e 128,49 respectivamente).

Tabela 3. Solubilização de fosfato em meio NBRIP líquido, em quinze dias de cultivo por isolados de bactérias. Média de três repetições subtraindo-se a média do P solubilizado do tratamento sem inoculação.

Isolados	P solubilizado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	59.68555 f
2	178.68391 a
3	66.24181 e
4	63.72014 e
5	45.10922 g
6	71.32624 d
7	50.55755 g
8	31.83141 h
9	128.49432 b
10	55.94659 f
11	35.94825 h
12	75.40514 d
13	29.87807 h
14	76.90032 d
15	68.16181 e
16	61.23695 f
17	56.64159 f
18	93.05402 c
19	58.80900 f
20	82.40914 d
21	77.10923 d

Colunas - letras minúsculas

Linhas - letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott 01 =< p < .05.

Dos 21 isolados, 14,28% apresentaram concentração de fósforo solúvel abaixo de $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ (baixa solubilização), 76,19% entre $50-100\mu\text{g.mL}^{-1}$ (média solubilização) e 9,52% entre $101-500\mu\text{g.mL}^{-1}$ (alta solubilização). Os micro-organismos solubilizadores de fosfato são capazes de solubilizar formas insolúveis de fósforo, tornando-o disponível para o crescimento das culturas sendo uma característica exibida por muitos micro-organismos do solo ou em associação epifítica ou endofítica com plantas.

Esses micro-organismos mobilizam fosfatos inorgânicos insolúveis, a partir de uma matriz mineral do solo, de forma que possa ser absorvido pelas raízes da planta. As bactérias solubilizadoras de fosfato solubilizam o fosfato insolúvel pela produção de ácidos orgânicos no meio em que o micro-organismo se desenvolve, cuja ação tem sido atribuída às suas propriedades quelantes, possibilitando a formação de complexos estáveis com os íons Ca^{+2} , Fe^{+3} e Al^{+3} (VENIERAKI et al,2010). Com esta síntese, o pH do solo é reduzido, sendo posteriormente o fósforo orgânico mineralizado por meio de fosfatases ácidas (KHAN et al., 2009).

Portanto, a utilização de bactérias que possuam capacidade de solubilização de fósforo no meio líquido em um intervalo de tempo reduzido, é uma característica essencial para a seleção de isolados para a produção de inoculantes (MONTALDO, 2016), diminuindo a utilização de fertilizantes químicos pelos produtores rurais incrementando e aumentando a absorção do fósforo presente no solo pelas plantas cultivadas.

Conclusões

Todos os isolados foram capazes de solubilizar fosfato cálcico em meio líquido.

Agradecimentos

Agradecemos ao Centro de Ciências Agrárias e a Universidade Federal de Alagoas pela estrutura e pelo comprometimento com o ensino, a todo corpo do Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências Agrárias/UFAL, representado na pessoa da minha Digníssima Orientadora Prof^{fa}. Dr^a. Tania Marta Carvalho dos Santos, exemplo ímpar de apoio, dedicação e amor à pesquisa científica, ao Grupo Agroecológico Craibeiras/UFAL e a todos que sonham com uma sociedade

agroecológica, mais justa e igualitária para os povos tradicionais, camponeses e urbanos.

Referências

CHABOT, R.; ANTOUN, H.; CESCAS, M. P. Stimulation de La croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 941-947, 1993.

FERRAZ, J. V.; LOT, L. **Fruta para consumo in natura tem boa perspectiva de renda**. In: HARADA, E.; FERRAZ, J. V.; SILVA, M. L. M. da. *Agriannual 2006 – Anuário da Agricultura Brasileira*. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2006.

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895-914, 1997.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Banco de dados agregados: SIDRA**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 05 de Abril de 2018.

KHAN, A. A. et al. Phosphorus solubilizing bacteria: Occurrence, mechanisms and their role in crop production. **Journal of Agricultural and Biological Science**, v. 1, n. 1, p. 48 – 58, 2009.

LIMA, C. S. M. et al. Germinação de Sementes e Crescimento de Maracujá em Diferentes Concentrações do Ácido Giberélico, Tempos de Imersão e Condições Experimentais. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 15, n. 1-4, p. 43-48, 2009.

LUZ, J. S. et al. Atividade enzimática de fungos endofíticos e efeito na promoção do crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo. **Revista Caatinga**, v. 19, n. 2, p. 128-134, 2006.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; DE OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado**

nutricional das plantas: Princípios e Alipcações. Piracicaba: POTAFOS, 1989.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, n. spe1, p. 83-91, 2011.

MONTALDO, Y. C. **Bioprospecção e isolamento de bactérias associadas à cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) com características para a promoção de crescimento vegetal**. 2016. 101 f. Tese (Doutorado em Rede Nordeste de Biotecnologia) - Instituto de Química e Biotecnologia, Programa de Pós Graduação em Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2016.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Micro-organismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 62-77, 2002.

RAIJ, B. VAN. **Fertilidade do solo e adubação**. Fertilidade do solo e adubação, Ceres: Piracicaba, 1991.

ROCHA, F. R. et al. Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. **BMC genomics, BioMed Central Ltd**, v. 8, n. 1, 2007.

SILVA, J. R. **Propagação Sexuada**. In: RUGGIERO, C. (Ed.) 5º Simpósio Brasileiro sobre a cultura do maracujazeiro. Anais. Jaboticabal, FUNEP, 1999.

VENIERAKI, A. et al. The genetic diversity of culturable nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of wheat. **Microbial Ecology**, v. 61, n. 2, p. 277-285, 2010.