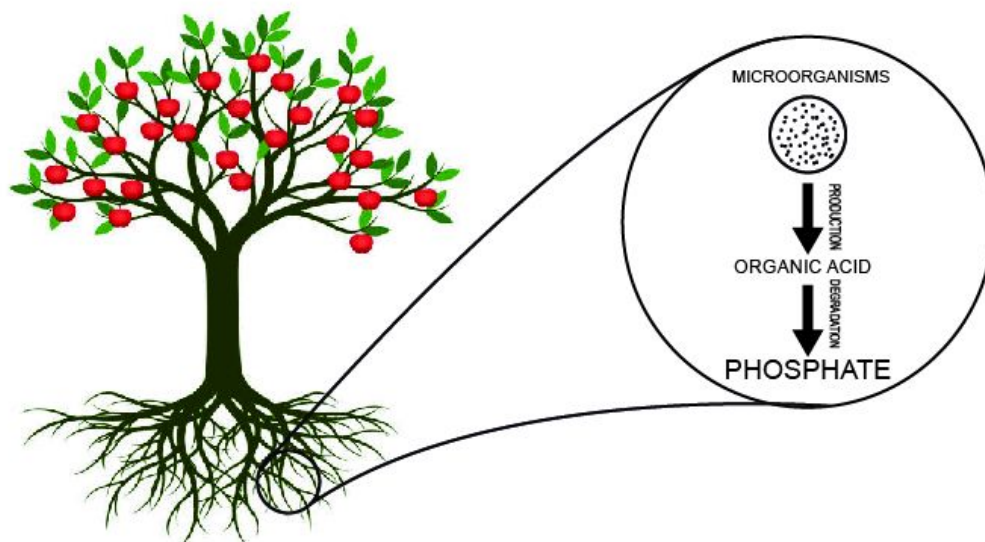


## Graphical Abstract



Phosphorus is an essential nutrient for plants. Soil microorganisms play a fundamental role in the solubilisation of the nutrient and one of the mechanisms used is the excretion of organic acids.

### SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO EM SOLO CULTIVADO COM MACIEIRA (*Malus domestica*), NO MUNICÍPIO DE SÃO JOAQUIM - SC

Brenda M. T. Gonçalves<sup>a</sup>, Fernanda S. Medeiros<sup>a,\*</sup>, Gustavo A. Dominoni<sup>a</sup>, Lara D. Sousa<sup>a</sup>, Luciano Alves<sup>b</sup>, Cláudia F. Silva<sup>b</sup>, Guilherme S. Mota<sup>b</sup>.

<sup>a</sup>Instituto Federal Catarinense - Campus Araquari, 89245-000, Araquari - SC, Brasil

( ) Manuscrito com material suplementar

(x) Manuscrito sem material suplementar

---

\*e-mail: [fernandasiilva.medeiros@gmail.com](mailto:fernandasiilva.medeiros@gmail.com)

## SELECTION OF PHOSPHATE SOLUBILIZING MICROORGANISMS IN SOIL CULTIVATED WITH *Malus domestica*, IN THE MUNICIPALITY OF SÃO JOAQUIM - SC

The low availability of phosphorus in the soils of temperate climate regions demands the utilization of high doses of soluble phosphate fertilizers in agricultural crops. In order to evaluate the potential for solubilization of phosphates by soil microorganisms, samples were collected from soil cultivated with apple trees in the municipality of São Joaquim - SC. Soil samples were diluted and inoculated in Petri dishes containing culture medium supplemented with dibasic calcium phosphate or aluminium phosphate. After 96 hours of incubation, the isolates that presented halo around the colonies were selected. After successive colony purification procedures, tests were performed to evaluate the maintenance of the solubilization capacity of the isolates and the solubilization potential, through the halo/colony ratio. Of the 37 isolates initially selected, nine maintained the ability to solubilize, all fungi, six in aluminum phosphate and three in dibasic calcium phosphate, and the values of the halo/colony ratio varied between 1.08 and 1.40.

Keywords: Solubilization; phosphate, calcium, aluminium, mineral nutrition.

## INTRODUÇÃO

A exploração comercial da macieira no estado de Santa Catarina teve início na década de 1960, contribuindo para que atualmente o estado ocupe posição de destaque na produção e comercialização da fruta, com a geração de emprego e renda (EPAGRI, 2006).

Em se tratando de nutrição mineral, a espécie apresenta alta exigência em relação ao uso de fertilizantes, sendo que nem sempre todos estes encontram-se prontamente disponíveis para as plantas (MALAVOLTA, 1980).

Dentre os nutrientes, destaque para o fósforo, essencial por atuar em uma série de processos metabólicos nas plantas, como a fotossíntese, respiração, armazenamento, transferência de energia, divisão e crescimento celular, e que encontra-se em baixa disponibilidade nos solos, visto que aproximadamente 80% do fósforo solúvel aplicado torna-se indisponível para as plantas após a sua incorporação devido à fixação com compostos de ferro e alumínio (BINI; LOPEZ, 2016; WAKELIN *et al.* 2004).

Os microrganismos do solo desempenham papel fundamental na solubilização de compostos de fósforo fixados, bem como aumentam a solubilização dos fosfatos naturais através de diferentes mecanismos, dentre eles a excreção de ácidos orgânicos (AGUIAR; SOUZA; SHIMIZU, 2014).

A inoculação de microrganismos eficientes em solubilizar fosfatos, bem como o manejo de suas populações no solo, mostra-se como uma técnica viável para otimizar o uso destas fontes de nutrientes para as plantas, contribuindo para o aumento da vida útil de nossas jazidas do fertilizante, estimadas em 100 anos (CORDELL; DRANGERT; WHITE, 2009; MAHDI *et al.*, 2011; BELTRÁN, 2014).

O objetivo deste trabalho foi o de selecionar, em solo cultivado com macieira, microrganismos eficientes na solubilização de fosfatos de cálcio dibásico e alumínio.

## **PARTE EXPERIMENTAL**

### **Coleta das amostras**

As amostras de solo foram coletadas em pomar selecionado de macieira (*Malus domestica.*), localizados no município de São Joaquim-SC, situado a uma latitude de 28°17' 38" sul e a uma longitude de 49°55' 54" oeste, em uma altitude média de 1.360 metros.

A amostragem de solo foi realizada em quadruplicata, sendo cada repetição, no pomar de maçã, composta por 10 plantas na sequência. As repetições foram tomadas ao acaso. As amostras de solo foram coletadas no terço final de projeção da copa, na profundidade de 0 a 20 cm. O conjunto das 40 subamostras foi homogeneizado e cerca de 500 g de solo foi embalada em saco plástico e transportada para o laboratório.

### **Avaliação da população de microrganismos solubilizadores de fosfatos**

Para a avaliação da população de microrganismos solubilizadores de fosfatos, foram preparadas diluições decimais em série, partindo-se de 10 g de solo diluídos em 95 mL de solução salina (0,95%) esterilizada, e submetidos a agitação mecânica por 30 minutos.

Na sequência, foram preparadas diluições de  $10^2$  a  $10^6$ , em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina esterilizada. Um mL das diluições de  $10^2$  a  $10^6$  foram transferidas para placas de Petri, sendo utilizadas três placas por diluição (repetição).

Na avaliação da atividade solubilizadora, foi utilizado o meio de cultura GEL, suplementado com fosfato de cálcio dibásico ( $\text{CaHPO}_4$ ) ou fosfato de alumínio ( $\text{AlPO}_4$ ), na proporção de 0,89 g  $\text{L}^{-1}$  de P. O fosfato de cálcio dibásico foi obtido pela adição de 1 mL de uma solução de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  a 5% e 1 mL de uma solução de  $\text{CaCl}_2$  a 10% por 10 mL de meio (Sylvester-Bradley et al., 1982). O fosfato de alumínio (fosfato de alumínio básico, p.a., Merck) foi adicionado na forma de suspensão, na proporção de 3,5 g  $\text{L}^{-1}$  de meio.

Após o período de incubação de 96 horas à temperatura de 30°C, foi realizada a contagem de colônias, observando-se a presença de um halo claro, formado ao redor das mesmas, indicando a atividade solubilizadora das fontes de fósforo adicionadas ao meio. Os isolados que apresentaram esta característica, foram selecionados para a realização dos testes do potencial de solubilização de fosfatos *in vitro*.

## Potencial de solubilização de fosfatos

A partir das culturas puras obtidas, foram feitas repicagens para tubos de ensaio contendo 2 mL de meio de cultura GEL esterilizado e inclinado, seguido de incubação a 25°C por 72 horas.

Foram preparadas placas de Petri com meio de cultura GEL (Glicose e Extrato de Levedura modificado) suplementado com fosfato de cálcio dibásico ou fosfato de alumínio nas mesmas concentrações utilizadas para o isolamento das populações em solo proveniente do cultivo de área de cultivo de maçã localizada no município de São Joaquim.

Após o período de incubação, foram adicionados, a cada tubo de ensaio contendo as culturas, 3 mL de água destilada esterilizada, seguido de agitação manual. Na sequência, com o auxílio de bastão de arame com diâmetro aproximado de 1 mm, foram repicados, em cada placa de Petri e em pontos equidistantes, cada um dos isolados obtidos, sendo na sequência, as placas invertidas e incubada a 30°C por um período de 96 horas.

Após o período de incubação, foi verificada a presença da formação do halo de solubilização ao redor da colônia. Em cada colônia que apresentou halo de solubilização, foram determinados os valores do diâmetro da colônia e diâmetro do halo, para a obtenção da relação halo/colônia.

Os resultados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade com o auxílio do software estatístico Statgraphics Centurion XV Versão 15.2.11.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Tabela 1.** Análise do solo no local de coleta.

Característica	Valor
Fosfato	10mg/L
Matéria Orgânica	2,5%
Alumínio	31,82mg/L

Fonte: Os autores (2019)

Das amostras de solo coletadas e analisadas, foram obtidos 37 isolados que apresentaram capacidade de solubilização do fosfato de cálcio dibásico ou fosfato de alumínio adicionado ao meio, sendo 29 fungos e 8 bactérias. Dos isolados selecionados inicialmente, apenas nove, sendo todos eles fungos, mantiveram a capacidade de solubilização das fontes de fósforo avaliadas, sendo seis no fosfato de alumínio e três no fosfato de cálcio dibásico (Tabela 1).

Resultados semelhantes foram encontrados por Souchie et al. (2005) e Souchie et al. (2007) que relatam maior capacidade de solubilização de fosfatos em fungos quando comparados à bactérias, sendo isto, possivelmente, devido à maior capacidade de produção de biomassa.

Em relação às fontes de fosfato avaliadas, a superioridade dos resultados em relação a capacidade em solubilizar o fosfato de alumínio adicionado ao meio pode estar relacionado à maior capacidade dos isolados em produzirem ácidos orgânicos e a de liberação de íons  $H^+$ , promovendo a acidificação do meio, sendo este dois mecanismos destacados como de importância para a solubilização do  $AlPO_4$  (CHAGAS JUNIOR et al., 2010; ILMER et al., 1995).

Outro fato a ser destacado, pode estar relacionado a questões de adaptação dos isolados, visto que em solos de regiões tropicais, que apresentam altos índices de acidez e baixa fertilidade, predominam os fosfatos de alumínio e de ferro (DA SILVA et al., 2011)

Não houve diferença estatística entre os isolados em relação aos valores da relação halo/colônia, tendo os valores variados entre 1,08 e 1,40, com um valor médio da relação halo/colônia obtido foi de 1,23, com um coeficiente de variação de 13% e com uma amplitude de 23%, caracterizando um baixo potencial de solubilização das fontes de fosfato avaliadas em comparação com outros trabalhos como de Massentini(2015)..

Vários fatores podem afetar a capacidade solubilizadora dos microrganismos do solo, dentre eles, os altos níveis de adubação fosfatada solúvel utilizados nos cultivos, bem como os altos teores de matéria orgânica encontrados no solo, situação comum observada em regiões de altitude, a exemplo da onde se localiza o município de São Joaquim.

Nestas condições, os microrganismos presentes no solo podem apresentar uma alta capacidade de produção de enzimas fosfatases, que promovem a hidrólise do fosfato, em detrimento da produção de ácidos orgânicos, transformando o fosfato orgânico em uma forma solúvel de fosfato inorgânico, explicando o baixo potencial de solubilização das fontes de

fósforo utilizadas, solubilizadas principalmente por ácidos orgânicos (LEITÃO et. al. 2010; NAUTIYAL et al., 2000).

**Tabela 2.** Medidas de parâmetros (cm), utilizados para avaliar o potencial de solubilização de fosfato de cálcio dibásico ou alumínio por microrganismos do solo.

<b>Isolado</b>	<b>Ø Colônia</b>	<b>Ø Halo solubilização</b>	<b>Relação Halo/Colônia</b>	<b>Substância do meio</b>
1	3,5	3,8	1,09 a*	Al
2	6,2	8,2	1,32 a	Ca
3	4	4,3	1,08 a	Al
4	4	5	1,25 a	Al
5	3,3	3,9	1,18 a	Ca
6	3,2	4	1,25 a	Al
7	3,1	3,5	1,13 a	Al
8	5,5	7,5	1,36 a	Ca
9	1	1,4	1,40 a	Al

\* Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Os autores (2019).

## **CONCLUSÃO**

Os isolados selecionados não apresentaram diferenças significativas em relação ao potencial de solubilização das fontes de fosfato avaliadas, sendo que do total de microrganismos selecionados inicialmente, somente cerca de 25% mantiveram a capacidade de solubilização após sucessivas repicagens.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos à T. F. Melo, técnica do laboratório de Microbiologia e Fitossanidade do Instituto Federal Catarinense - Campus Araquari, pelo auxílio nas atividades realizadas durante o projeto e a M. O. Viana, acadêmica do curso de Agronomia, pela ajuda na condução da pesquisa.

## REFERÊNCIAS

DE AGUIAR, A. V.; DE SOUSA, V. A.; JY, SHIMIZU. Espécies de Pinus mais plantadas no Brasil. 2011.

BELTRÁN PINEDA, M. E. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. Artículo de revisión de la Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria, Vol. 15, No. 1, 101-113. 2014.

BINI, D.; LOPEZ, M. V. *Microbiologia do solo* 2º ed Piracicaba, SP: ESALQ, p.159, 2016.

CHAGAS JUNIOR, Aloisio Freitas, et al. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 2010, 32.2: 359-366.

CORDELL, D.; DRANGERT, J. O.; WHITE, S. *Global Environ. Change*, 2009, 19: 292.

DA SILVA, Ana Cristina Souza, et al. Ocorrência de bactérias solubilizadoras de fosfato nas raízes de plantas de importância econômica em Manaus e Rio Preto da Eva, Amazonas. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 2011, 2.1: 37-42.

EPAGRI. A Cultura da macieira. Florianópolis, SC, 2006.

ILLMER, P.; BARBATO, A.; SCHINNER, F. Solubilization of hardly-soluble  $AlPO_4$  with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 1995, 27.3: 265-270.



LEITÃO, V.O., LIMA, R.C.M., VAINSTEIN, M.H. & ULHOA, C.J. Purification and characterization of an acid phosphatase from *Trichoderma harzianum*. *Biotechnology Letters*, 32: 1083-1088, 2010.

MAHDI, S.Sheraz, et al. Phosphorus availability issue-its fixation and role of phosphate solubilizing bacteria in phosphate solubilization. *Res. J. Agric. Sci*, 2011, 2.1: 174-179.

MALAVOLTA, Eurípedes, et al. *Elementos de nutrição mineral de plantas*. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980.

MASSESSINI, André Marcos et al. *Solubilização potencial de fosfatos mediada pela microbiota rizosférica de eucalipto cultivado em topossequência típica da Zona da Mata Mineira*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. Mv. 39, n. 3, p. 692-700, 2015.

SOUCHIE, Edson Luiz, et al. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2005, 40.11: 1149-1152.

SOUCHIE, Edson Luiz; DE SOUZA ABBOUD, Antonio Carlos. Solubilização de fosfato por microrganismos rizosféricos de genótipos de Guandu cultivados em diferentes classes de solo. *Semina: Ciências Agrárias*, 2007, 28.1: 11-18.

SYLVESTER-BRADLEY, R., et al. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amazonica*, 1982, 12.1: 15-22.

WAKELIN, Steven A., et al. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. *Biology and Fertility of Soils*, 2004, 40.1: 36-43.