BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS COM POTENCIAL DE DISPONIBILIZAR FÓSFORO MEDIANTE FERTILIZANTES FOSFATADOS

Vinicius de Souza Monteiro, Eduarda Salgado de Melo, Jaziel Rocha Almeida, Natália Coelho Ferreira, Irislene da Silva Lima, Ricardo Jair de Oliveira, Thalia dos Anjos.

Universidade Federal do Espírito Santo – Campus Alegre/Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Alto Universitário, S/N, Guararema – 29500-000 – Alegre - ES, Brasil, viniciusmonteiro.15@hotmail.

Resumo

A baixa disponibilidade de fósforo (P) em solos tropicais limita a produtividade agrícola, tornando os microrganismos solubilizadores de fósforo uma alternativa sustentável para aumentar o aproveitamento desse nutriente. Este trabalho teve como objetivo isolar microrganismos com potencial de solubilização de P, utilizando meios seletivos modificados com fontes comerciais de fosfato de baixa solubilidade. As amostras foram coletadas em três zonas na entrelinha da lavoura: região do colo (RC), região de matéria orgânica (RMO) e região de borda (RB). O solo coletado foi submetido a diluições seriadas e inoculado em meio NBRIP padrão e modificado com fosfatos naturais reativos, termofosfatos e fosfato natural não reativo. Foram obtidas 73 colônias bacterianas, selecionadas com base em características macroscópicas distintas. O maior número de isolados ocorreu na RB, com 35 colônias. Entre as fontes, os termofosfatos proporcionaram o maior quantitativo de microrganismos. Os resultados evidenciam que o solo abriga bactérias capazes de crescer na presença de fertilizantes fosfatados insolúveis, com maior densidade na região de borda e nos tratamentos com termofosfato.

Palavras-chave: Termofosfato. Bactéria. Solo. Solubilização.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas / Microbiologia.

Introdução

A baixa disponibilidade de nutrientes solúveis no solo constitui um dos principais fatores limitantes para o estabelecimento e crescimento da vegetação em regiões tropicais. O fósforo é um dos elementos essenciais, porém, por apresentar alta estabilidade química no perfil do solo, sua solubilidade é extremamente baixa, o que o torna o fator nutricional mais restritivo para as plantas nessas áreas (Sylvester-Bradley *et al*., 1982).

Os microrganismos rizosféricos auxiliam na solubilização desse nutriente, tornando-o disponível para as plantas. Tais microrganismos são de grande importância para qualidade do solo e a saúde vegetal (M. Tahat *et al*., 2020). A comunidade bacteriana do solo é diversa e pode ser influenciada por condições ambientais, diversidade de culturas e práticas de manejo, fatores que contribuem diretamente para a fertilidade do solo (Mejía-Alvarado *et al*., 2021). De acordo com Owen *et al*. (2015), no processo de ciclagem de nutrientes, os microrganismos são agentes essenciais na transformação de fósforo insolúvel em formas solúveis e, consequentemente, acessíveis às plantas.

Segundo Amri *et al.* (2023), a região rizosférica é o habitat ideal para a ocorrência de maior atividade e densidade de microrganismos. As rizobactérias promotoras do crescimento vegetal constituem um grupo capaz de colonizar a superfície radicular, favorecendo o desenvolvimento da planta e influenciando a diversidade do microbioma rizosférico (Pino; Espinosa; Cabrera, 2023). Nesse contexto, destacam-se os microrganismos solubilizadores de fósforo (MSF), cujo manejo e inoculação vêm ganhando relevância como estratégias para mitigar a dependência de fertilizantes fosfatados químicos, otimizando o aproveitamento tanto das reservas naturais do solo quanto das fontes adicionadas via adubação fosfatada (Nunes *et al*., 2024).

Esse estudo tem como objetivo isolar microrganismos com potencial de solubilizar fósforo em meios de cultura seletivos modificados.

Metodologia

O solo utilizado para a experimentação foi coletado no Sítio Rossmann, localizado no município de Santa Maria de Jetibá, Espírito Santo (20°02'15.6"S 40°46'56.4"W). A área foi escolhida por adotar o sistema de agricultura orgânica, devidamente certificada pelo Instituto Chão Vivo, como também, caracterizam-se pela agricultura familiar com ênfase na produção de café arábica (*Coffea arabica*) e a aplicação de fertilizante mineral.

As coletas de solos foram de forma aleatória, abrangendo três diferentes áreas da propriedade, sendo a amostragem realizada nas entrelinhas do pé de café: a região do colo (próxima ao colo), região de matéria orgânica (≈ 30cm de distância do colo e com alta presença de material orgânico) e região de borda (≈ 60cm do colo).

Em seguida, um pouco das amostras coletadas na mesma área foram misturadas e levadas para realização de exame químico no Laboratório de Análise de Solos e Plantas da Universidade Federal do Espírito Santo (Ufes), campus de Alegre e o restante das amostras foram homogeneizadas de acordo com a região de origem, acondicionadas em sacos plásticos estéreis e transportadas para o Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Espírito Santo (Ufes), campus de Alegre, onde foram submetidas a um processo de diluição: 1 g de solo misturado com 9 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85%) e homogeneizada em agitador. A partir da suspensão inicial, foram realizadas diluições seriadas até a concentração de 10^{-5}. Posteriormente, as diluições foram inoculadas pelo método de semeadura por espalhamento em seis meios de cultura, com três repetições cada, utilizando o meio ágar NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate), conforme a metodologia descrita por Nautiyal (1999), com a intenção de filtrar os microrganismos com maior afinidade com o fósforo. Dos seis meios utilizados, um correspondeu ao NBRIP padrão, contendo fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$), enquanto os cinco demais foram modificados substituindo esse composto por fontes de fertilizantes fosfatados de baixa solubilidade encontradas no mercado. As fontes utilizadas foram classificadas em fosfato natural reativo (OCP Phosactiv e Heringer), termofosfato (OrgLab e Yoorin Mg) e fosfato natural não reativo (Gefoscal). Após o plaqueamento, as placas foram incubadas a 28 °C por 24 h para o crescimento das colônias bacterianas.

Posteriormente, as colônias foram diferenciadas e repicadas em novas placas contendo o meio de cultura de origem, de acordo com suas características macroscópicas: forma, elevação, margem, pigmento e brilho (Naligama; Weerasinghe; Halmillawewa, 2022). A purificação foi realizada repetidamente até que colônias com características morfológicas distintas fossem isoladas e contadas.

Resultados

Conforme a Tabela 1, a análise química das amostras de solo demonstrou baixa variabilidade do pH, com média de 7,02, desvio padrão (DP) de 0,12 e coeficiente de variação (CV) de 1,65%, que indica condições próximas à neutralidade e pouca diferença entre as amostras avaliadas. Para o fósforo disponível, foi observada média de 1.013,90 mg/dm³, com DP de 88,01 mg/dm³ e CV de 8,68%. Embora tenha sido observada maior variabilidade para o teor de fósforo em comparação ao pH, os valores permaneceram relativamente próximos entre as amostras, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultado de análise química do solo. Sendo: DP = Desvio padrão e CV = Coeficiente de variação.

Parâmetros	Média	DP	CV (%)	Mínimo	Máximo
pH H_2O	7,02	0,12	1,65	6,95	7,15
P Melich (mg/dm³)	1013,90	88,01	8,68	921,40	1096,60

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A análise dos meios de cultura contendo diferentes fontes de fósforo resultou no isolamento de 73 colônias bacterianas distribuídas entre as três regiões de coleta avaliadas região do colo (RC) região de matéria orgânica (RMO) e região da borda (RB), conforme Tabela 2. A maior quantidade de colônias foi observada na RB, com 35 isolados, correspondendo a 47,9% do total, seguida pelas regiões RC, com 21 isolados (28,8%), e RMO, com 17 isolados (23,3%).

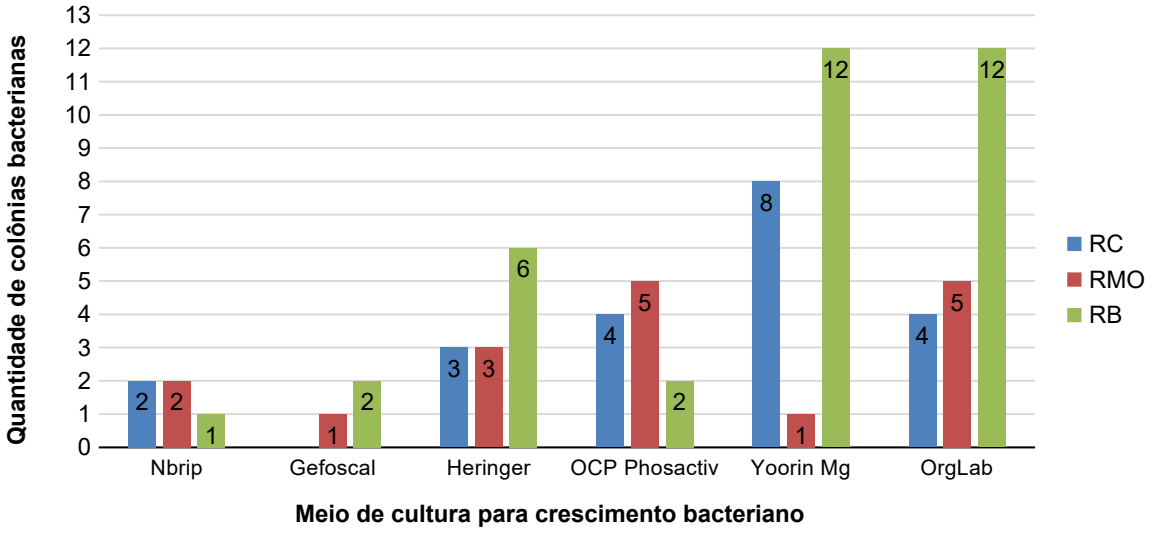
Tabela 2 – Número de colônias por região e meio de cultura. REF: referência; FNNR: fosfato natural não reativo; FNR: fosfato natural reativo; TMF: termofosfato; RC: colo; RMO: matéria orgânica; RB: borda.

Fonte/Fosfato	REF	FNNR	FNR		TMF		
	Nbrip	Gefoscal	Heringer	OCP Phosactiv	Yoorin Mg	OrgLab	**Total**
RC	2	0	3	4	8	4	**21**
RMO	2	1	3	5	1	5	**17**
RB	1	2	6	2	12	12	**35**
Total	**5**	**3**	**12**	**11**	**21**	**21**	**73**

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Entre as fontes de fósforo avaliadas, os meios contendo Yoorin Mg e OrgLab apresentaram as maiores quantidades de colônias, com 21 isolados cada, representando individualmente 28,8% do total obtido. Além disso, em ambos termofosfatos, a região de borda apresentou maior número de colônia bacteriana encontrada, 12 cada. Já o meio modificado contendo Gefoscal apresentou a menor quantidade de isolados, com três colônias, enquanto o meio de referência Nbrip padrão resultou em cinco colônias (Figura 1).

Figura 1 - Número de colônia por região. Sendo: RC = região do colo; RMO = região de matéria orgânica; região da borda.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Discussão

O elevado teor de fósforo observado (Tabela 1) indica alta disponibilidade do nutriente no solo. Esse acúmulo pode estar associado ao efeito residual da aplicação de fosfato de rocha em anos anteriores, cuja liberação ocorre de forma gradual ao longo do tempo (Chien *et al*., 2011), bem como à atividade de microrganismos solubilizadores de fósforo, que aumentam a disponibilidade desse elemento no solo (Barea *et al*., 2005). O valor de pH (Tabela 1) indica que o solo apresenta reação próxima à neutralidade, condição considerada adequada para a maioria das bactérias (Madigan *et al*., 2016). Assim, ambos os parâmetros podem favorecer a atividade microbiana no solo.

As três regiões avaliadas (RC, RMO e RB) situam-se na zona de influência do sistema radicular, o que pode favorecer maior atividade e ocorrência de rizobactérias (Ondieki *et al*., 2017). Na cultura de café a região próxima ao colo da planta, predomina a raiz pivotante, cuja função principal está relacionada à sustentação e à estruturação vegetal. À medida que se distancia do colo, aproximadamente entre 30 e 70 cm no sentido horizontal, ocorre maior desenvolvimento de raízes secundárias e terciárias, que apresentam importante participação na absorção de água e nutrientes, proporcionando condições favoráveis à colonização por microrganismos (Covre *et al.,* 2015; Pino;

Espinosa; Cabrera, 2023). Dessa forma, a maior quantidade de colônias observada na região de borda pode estar associada à maior densidade dessas raízes mais finas e, consequentemente, à maior colonização microbiana.

A baixa quantidade de colônias no meio Nbrip padrão pode estar relacionada ao caráter seletivo do meio, que foi desenvolvido especificamente para testar a capacidade de microrganismos solubilizarem fontes insolúveis de fósforo, e não para favorecer o crescimento generalizado da comunidade bacteriana (Nautiyal, 1999). Já os meios modificados possivelmente favoreceram o crescimento bacteriano em razão da utilização de diferentes fontes de fertilizantes fosfatados, especialmente o termofosfato. Esse fertilizante geralmente apresenta maior fração de fósforo solúvel em ácido cítrico a 2%, embora os fosfatos naturais possam apresentar teores de fósforo total (P2O5) superiores (Faria *et al*., 2006). Além disso, os fosfatos naturais reativos apresentam maior solubilidade a curto prazo quando comparados aos não reativos (Brasil; Muraoka, 1997). Dessa forma, a maior disponibilidade de fósforo nessas fontes pode ter facilitado sua assimilação pelos microrganismos, exigindo menor gasto energético da cepa bacteriana no processo de solubilização e favorecendo o seu crescimento.

Conclusão

O isolamento nos meios de cultura Nbrip padrão e modificado permitiu a obtenção de 73 colônias bacterianas.

A maior quantidade de isolados ocorreu na região da borda (RB) e nos meios contendo termofosfatos (Yoorin Mg e OrgLab).

Para estudos futuros, recomenda-se uma maior amostragem das regiões avaliadas e a realização de testes quantitativos ou qualitativos para confirmar e mensurar a eficiência de solubilização das cepas isoladas, como também, verificar se haverá disponibilidade extra de P com os meios modificados em campo.

Referências

AMRI, Marwa *et al.* Isolation, Identification, and Characterization of Phosphate-Solubilizing Bacteria from Tunisian Soils. **Microorganisms**, v. 11, n. 3, 1 mar. 2023.

BAREA, José-Miguel *et al.* Microbial co-operation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 417, p. 1761–1778, 1 jul. 2005.

BRASIL, E. C.; MURAOKA, T. Avaliação agronômica de fertilizantes fosfatados em solos do Estado do Pará. **EMBRAPA-CPATU. Boletim de pesquisa**, v. 171, 1997.

CHIEN, S. H. *et al.* Agronomic and environmental aspects of phosphate fertilizers varying in source and solubility: an update review. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 89, n. 2, p. 229–255, 28 mar. 2011.

COVRE, André Monzoli *et al.* Distribuição do sistema radicular de cafeeiro conilon irrigado e não irrigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 11, p. 1006–1016, nov. 2015.

FARIA, Clementino Marcos Batista de *et al.* Efeito de fosfatos naturais em plantas de melão cultivadas em vasos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 6, p. 1083–1091, dez. 2006.

M. TAHAT, Monther *et al.* Soil Health and Sustainable Agriculture. **Sustainability**, v. 12, n. 12, p. 4859, 15 jun. 2020.

MADIGAN, M. T. *et al*. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. 2016.

MEJÍA-ALVARADO, Fernan Santiago *et al.* Structure and Dynamics of the Gut Bacterial Community Across the Developmental Stages of the Coffee Berry Borer, Hypothenemus hampei. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 1 jul. 2021.

NALIGAMA, Kishani N.; WEERASINGHE, Kavindi E.; HALMILLAWEWA, Anupama P. Characterization of Bioactive Actinomycetes Isolated from Kadolkele Mangrove Sediments, Sri Lanka. **Polish Journal of Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 191–204, 11 jun. 2022.

NAUTIYAL, C. Shekhar. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 265–270, jan. 1999.

NUNES, Jenifer *et al.* Produção forrageira e fósforo na parte aérea da alfafa (*medicago sativa*) inoculada com bactérias solubilizadoras de fosfato. **Scientia Agraria**, v. 20, n. 1, 1 jun. 2024.

ONDIEKI, Damaris K. *et al.* Morphological and Genetic Diversity of Rhizobia Nodulating Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) from Agricultural Soils of Lower Eastern Kenya. **International Journal of Microbiology**, v. 2017, p. 1–9, 2017.

OWEN, D. *et al.* Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphrous acquisition. **Applied Soil Ecology**, v. 86, p. 41–54, fev. 2015.

PINO, Andrés Felipe Solis; ESPINOSA, Zuly Yuliana Delgado; CABRERA, Efren Venancio Ramos. Characterization of the rhizosphere bacterial microbiome and coffee bean fermentation in the Castillo-Tambo and bourbon varieties in the Popayán-Colombia Plateau. **BMC Plant Biology**, v. 23, n. 1, p. 217, 2023.

SYLVESTER-BRADLEY, Rosemary *et al*. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 12, n. 1, p. 15-22, 1982.