

## Notas Científicas

### Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo

Edson Luiz Souchie<sup>(1)</sup>, Rosario Azcón<sup>(2)</sup>, Jose Miguel Barea<sup>(2)</sup>, Orivaldo José Saggin-Júnior<sup>(3)</sup> e Eliane Maria Ribeiro da Silva<sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup>Centro Federal de Educação Tecnológica, Caixa Postal 66, CEP 75901-970 Rio Verde, GO. E-mail: esouchie@yahoo.com.br <sup>(2)</sup>Estación Experimental del Zaidín, Dep. de Microbiología y Sistemas Simbióticos, 18.008, Granada, España. E-mail: razcon@eez.csic.es, jmbarea@eez.csic.es <sup>(3)</sup>Embrapa Agrobiologia, Caixa Postal 74.505, CEP 23851-970 Seropédica, RJ. E-mail: saggin@cnpab.embrapa.br, eliane@cnpab.embrapa.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade e a eficiência de solubilização de  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{AlPO}_4$  e apatita de Araxá em meio sólido, e de  $\text{AlPO}_4$  e apatita de Araxá em meio líquido, por fungos (*Aspergillus*) e bactérias (Enterobacteriaceae) do solo. Em meio sólido, todos solubilizaram  $\text{CaHPO}_4$ , nenhum solubilizou apatita de Araxá e apenas o isolado de fungo FSF 7 solubilizou  $\text{AlPO}_4$ . Em meio líquido, todos solubilizaram  $\text{AlPO}_4$  e apatita de Araxá. A seleção de solubilizadores deve ser feita com a quantificação do potencial de solubilização em meio líquido.

Termos para indexação: *Aspergillus*, enterobactérias, fósforo, meio de cultivo, apatita.

### Phosphate solubilization in solid and liquid media by soil bacteria and fungi

Abstract – The objective of this work was to evaluate the ability and efficiency of solubilization of  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{AlPO}_4$  and Araxá apatite in solid medium, and  $\text{AlPO}_4$  and Araxá apatite in liquid medium. Soil P-solubilizing fungi (*Aspergillus*) and P-solubilizing bacteria (Enterobacteriaceae) were tested. In solid medium, all isolates solubilized  $\text{CaHPO}_4$ , not any isolate solubilized Araxá apatite, and one fungus isolate (PSF 7) solubilized  $\text{AlPO}_4$ . In liquid medium, all isolates solubilized  $\text{AlPO}_4$  and Araxá apatite. Screening of P-solubilizing microorganisms must be done by quantifying their potential of phosphate solubilization in liquid growth medium.

Index terms: *Aspergillus*, Enterobacteria, phosphorus, growth media, apatite.

O fósforo é um nutriente essencial às plantas, mas encontra-se em baixa disponibilidade em solos tropicais. Por isso são necessárias grandes doses de adubos fosfatados, para que as culturas obtenham alta produtividade, sendo comum o uso de fertilizantes de baixa solubilidade, para reduzir o custo de implantação de lavouras perenes. Esses solos, freqüentemente, apresentam alta capacidade de fixação desse nutriente, em virtude da abundância de óxi-hidróxidos de ferro e alumínio (Eijk, 1997), que formam fosfatos estáveis.

Diversos microrganismos do solo solubilizam diferentes formas de fosfatos inorgânicos. Whitelaw et al. (1999) verificaram que *Penicillium radicum* solubilizou  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{AlPO}_4$  em meio líquido. Reyes et al. (1999) encontraram correlação positiva entre a solubilização de fosfatos por *Penicillium*

*rugulosum* e a produção de ácido glucônico ou cítrico.

Estirpes dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium* estão entre as bactérias mais eficientes na solubilização de P (Rodriguez & Fraga, 1999), enquanto nas populações fúngicas destacam-se os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (Silva Filho et al., 2002).

Um maior entendimento da capacidade e da eficiência de microrganismos, em solubilizar diferentes fosfatos, pode levar à seleção de isolados com alto potencial de uso para a inoculação em plantas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes microrganismos solubilizadores, quanto à capacidade e eficiência de solubilização de diferentes fosfatos inorgânicos, em meios sólido e líquido.

A avaliação da capacidade de solubilização de fosfatos em meio sólido, por microrganismos solubilizadores, foi

realizada na Estación Experimental del Zaidín, Granada, Espanha, em 2002. Avaliaram-se quatro isolados de fungos solubilizadores de fosfato, denominados FSF 7, 9, 21 e 22, do gênero *Aspergillus*, e quatro bactérias solubilizadoras, BSF 8, 9, 50 e 56, da família Enterobacteriaceae, quanto à capacidade de solubilizar três tipos de fosfato inorgânico em meio sólido. Os isolados FSF 7, FSF 9, BSF 8, BSF 9 e BSF 50 foram obtidos do rizoplano mais rizosfera de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth., cultivada em um Argissolo coletado em área de Mata Atlântica em Paraty, RJ. Os isolados FSF 21, FSF 22 e BSF 56 foram obtidos do rizoplano mais rizosfera de *Acacia holosericea* Cunn. ex. G. Don, cultivada em um Planossolo coletado em Seropédica, RJ.

A apatita de Araxá (14 g kg<sup>-1</sup> de P) e o fosfato de alumínio (AlPO<sub>4</sub>) (16 g kg<sup>-1</sup> de P) foram acrescentados diretamente ao meio de cultura GL (glicose, extrato de levedura e ágar), na dose 3 g L<sup>-1</sup>; CaHPO<sub>4</sub> foi formado pela adição de 50 mL de solução K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10%) e 100 mL de CaCl<sub>2</sub> (10%), em cada litro de meio de cultura, conforme Katznelson & Bose (1959). O delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 9x3 (nove tratamentos de inoculação x três fontes de fosfato), com três repetições. O controle consistiu em placas de Petri com o meio de cultura e os fosfatos, sem inoculação de solubilizadores. A inoculação dos fungos solubilizadores de fosfato (FSF) foi feita, colocando-se esporos na superfície do meio GL já solidificado, utilizando-se alça de platina. A inoculação das bactérias solubilizadoras de fosfato (BSF) também foi feita sobre o meio GL solidificado, a partir de culturas crescidas em meio GL líquido (24 horas a 28°C), com 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, pipetando-se 100 µL dessa cultura por placa. As BSF e os FSF foram incubados a 28°C, em câmara escura, por três e oito dias, respectivamente. Após a incubação, avaliou-se, visualmente, a formação do halo transparente ao redor das colônias, em contraste com o meio opaco, o que indica a solubilização do fosfato adicionado ao meio de cultura, de acordo com Di Simine et al. (1998).

A eficiência de solubilização de apatita de Araxá e AlPO<sub>4</sub>, em meio líquido, por solubilizadores, também foi avaliada na Estación Experimental del Zaidín, Espanha, em 2002. Foram testados os mesmos isolados do estudo em meio sólido. Além da inoculação dos oito isolados, foi incluído um tratamento-controle sem inoculação. O delineamento foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 9x2 (nove tratamentos de inoculação x duas fontes de fosfatos), com três repetições.

A apatita de Araxá e o AlPO<sub>4</sub> foram acrescentados (3 g L<sup>-1</sup>) ao meio GL líquido (pH inicial 6,5), tendo resultado, após uma semana de incubação, em 2 e 18 mg L<sup>-1</sup> de P solúvel no meio de cultura com apatita de Araxá e AlPO<sub>4</sub>, respectivamente. Em cada Erlenmeyer (250 mL) com 50 mL de meio de cultura com os tratamentos de fosfato, foi inoculado 1 mL de cultura, que continha 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> dos isolados de BSF e FSF. Esses isolados foram incubados a 28°C, sob agitação de 190 rpm, por três e sete dias, respectivamente. A eficiência de solubilização foi determinada, tendo-se avaliado o pH e P solúvel no final do período de incubação. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Sisvar (Ferreira, 1998).

Todos os isolados apresentaram capacidade de solubilizar o precipitado de CaHPO<sub>4</sub> em meio sólido, apenas o isolado FSF 7 apresentou capacidade de solubilizar AlPO<sub>4</sub>, e nenhum isolado apresentou halo de solubilização no meio de cultura com apatita de Araxá.

Embora as respostas de solubilização de AlPO<sub>4</sub> ou apatita de Araxá, em meio sólido, tenham sido quase inexistentes, não significa que os isolados utilizados não tenham capacidade de solubilizá-los, pois demonstraram capacidade de solubilização dessas fontes de fosfato em meio de cultura líquido. Silva Filho & Vidor (2000) também detectaram baixa incidência de solubilizadores de fosfato de alumínio, entre solubilizadores de fosfato de cálcio. Esses autores sugerem que tal fato pode ser atribuído à seleção dos isolados durante o isolamento, além das características intrínsecas de solubilidade dos fosfatos. Inicialmente, os solubilizadores são isolados, utilizando-se meio de cultura com CaHPO<sub>4</sub>; só após esse primeiro estágio são testados nos outros fosfatos. Essa ordenação nos procedimentos de isolamento pode levar à seleção de microrganismos capazes de solubilizar CaHPO<sub>4</sub>, em detrimento de outros fosfatos. Este trabalho mostra que a não-solubilização de AlPO<sub>4</sub> em meio GL sólido se deve mais ao estado físico do meio ou à sua distinta composição, em relação ao meio líquido, do que à incapacidade dos isolados de solubilizar esse fosfato. A inclusão de outros fosfatos de menor solubilidade nesse meio pode exigir uma maior capacidade de solubilização dos FSF e BSF. Tal capacidade pode ser evidenciada pelo isolado FSF 7, que formou halo em meio sólido com AlPO<sub>4</sub>. Aliadas à solubilidade do fosfato, sua pureza e composição também podem afetar a avaliação visual da transparência.

Em meio líquido, os isolados de BSF, exceto BSF 8, proporcionaram maior quantidade de P solúvel com apatita de Araxá do que com  $\text{AlPO}_4$  (Tabela 1). Contrariamente, todos os isolados de FSF solubilizaram mais  $\text{AlPO}_4$  que apatita de Araxá. Os FSF, em média, aumentaram cerca de nove vezes a quantidade de P solúvel no meio com  $\text{AlPO}_4$ , em relação ao controle, e em cerca de 35 vezes o de P solúvel no meio com apatita de Araxá. Da mesma forma, as BSF aumentaram cerca de 1,3 e 13 vezes o P solúvel em meio líquido incubado com  $\text{AlPO}_4$  e apatita de Araxá, respectivamente. Os isolados de FSF apresentaram maior eficiência de solubilização de fosfatos do que as BSF, tendo solubilizado no meio com apatita de Araxá mais que o dobro do que as BSF, e mais que sete vezes no meio com  $\text{AlPO}_4$ .

Todos os isolados de BSF e FSF reduziram o pH do meio líquido com  $\text{AlPO}_4$  ou apatita de Araxá, em relação ao controle sem inoculação (Tabela 1). De modo geral, o meio com  $\text{AlPO}_4$  foi menos acidificado do que aquele com apatita de Araxá, quando se cultivaram os isolados de BSF. Os isolados de FSF acidificaram menos o meio com apatita de Araxá, embora essa menor acidificação tenha naturalmente ocorrido no tratamento-controle dessa fonte fosfatada.

A maior quantidade de P solúvel no meio com  $\text{AlPO}_4$ , em relação ao meio contendo apatita de Araxá com inoculação de FSF, sugere maior solubilidade do  $\text{AlPO}_4$  na faixa de pH obtida pelo cultivo desses solubilizadores.

**Tabela 1.** pH e P solúvel em meio líquido, após incubação de isolados de bactéria (BSF) e de fungos (FSF) solubilizadores de fosfato, em presença de fosfato de alumínio e apatita de Araxá<sup>(1)</sup>.

Isolado	pH		P solúvel (mg dm <sup>-3</sup> )	
	Fosfato de alumínio	Apatita de Araxá	Fosfato de alumínio	Apatita de Araxá
BSF 8	3,7eB	4,3bA	26aA	12bB
BSF 9	3,9cA	3,2dB	25aB	29aA
BSF 50	4,1bA	3,2cdB	23abB	30aA
BSF 56	3,8dA	3,3cB	22abB	31aA
Controle	4,9aB	5,4aA	18bA	2cB
FSF 7	3,3bB	3,6bA	165aA	65aB
FSF 9	2,8cB	3,2cA	163aA	57aB
FSF 21	2,8cB	3,3cA	169aA	78aB
FSF 22	2,7cB	3,0dA	190aA	77aB
Controle	4,6aB	5,7aA	18bA	2bB

<sup>(1)</sup>Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O fato de que no tratamento-controle haja maiores teores de P solúvel e menores valores de pH, no meio com  $\text{AlPO}_4$ , comparados aos do tratamento com fosfato de Araxá, se explica pela maior solubilidade em água do  $\text{AlPO}_4$  (Tabela 1). Com a solubilização deste fosfato, há liberação de íons  $\text{Al}^{3+}$  no meio, que contribuem para uma diminuição de pH, em consequência da reação ácida desse íon em solução aquosa.

Os isolados fúngicos promoveram o dobro da solubilização de P no meio com apatita de Araxá, em relação às bactérias e, em média, mais que sete vezes no meio com  $\text{AlPO}_4$ , o que evidencia maior produção de metabólitos ácidos por esses microrganismos (Tabela 1). Nahas et al. (1994) e Illmer & Schinner (1995) demonstraram que há uma maior capacidade de solubilização de P in vitro por fungos edáficos, comparados às bactérias. Silva Filho & Vidor (2000) sugerem que as avaliações de solubilização de P tendem a favorecer as espécies que têm alta agressividade de crescimento, como as de *Aspergillus* e *Rhizopus*, em detrimento daquelas que têm crescimento limitado, como as bactérias.

A maioria das BSF demonstrou maior habilidade em solubilizar apatita de Araxá do que  $\text{AlPO}_4$ . Isto sugere que a solubilização de  $\text{AlPO}_4$  pode ter inibido o crescimento das bactérias. O isolado BSF 8 é o que mais se diferencia dos demais isolados de bactéria quanto à acidificação do meio, pois tende a acidificar mais o meio com  $\text{AlPO}_4$  do que com fosfato de Araxá (Tabela 1). Tal comportamento, mais próximo ao dos isolados fúngicos, sugere que essa bactéria pode suportar maiores concentrações de  $\text{Al}^{3+}$  em solução. Conforme Karamushka et al. (1996), a liberação de concentrações tóxicas de alguns metais, durante a solubilização de fosfato de rocha, pode afetar o desenvolvimento, a fisiologia e o metabolismo dos fungos. Diversos autores têm descrito interações sinérgicas ou antagônicas entre metais e fungos (Krantz-Rülcker et al., 1996; Hartley et al., 1997) ou bactérias (Di Simone et al., 1998).

Futuros estudos seriam interessantes para detectar microrganismos eficientes na solubilização de distintas fontes de P e que, preferencialmente, tenham alta capacidade de tolerar elementos tóxicos, como o  $\text{Al}^{3+}$ , tanto in vitro como em sistema solo-planta.

### Agradecimentos

À Capes/PDEE, pela bolsa de estudo concedida ao primeiro autor; à Estación Experimental del Zaidín, pela infra-estrutura.

## Referências

- DI SIMINE, C.D.; SAYER, J.A.; GADD, G.M. Solubilization of zinc phosphate by a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from a forest soil. **Biology and Fertility of Soils**, v.28, p.87-94, 1998.
- EIJK, D. van der. Phosphate fixation and the response of maize to fertilizer phosphate in Kenyan soils. 1997. 186p. Dissertation (Master) - Wageningen Agricultural University, Wageningen.
- FERREIRA, D.F. **Programa Sisvar.exe**: sistema de análise de variância. Lavras: Ufla, 1998.
- HARTLEY, J.; CAIRNEY, J.W.G.; SANDERS, F.E.; MEHARG, A.A. Toxic interactions of metal ions ( $Cd^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  e  $Sb^{3-}$ ) on in vitro biomass production of ectomycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v.137, p.551-562, 1997.
- ILLMER, P.; SCHINNER, F. Solubilization of hardly-soluble  $AlPO_4$  with P-solubilizing microorganisms. **Soil Biology and Biochemistry**, v.27, p.265-270, 1995.
- KARAMUSHKA, V.I.; SAYER, J.A.; GADD, G.M. Inhibition of  $H^+$  efflux from *Saccharomyces cerevisiae* by insoluble metal phosphates and protection by calcium and magnesium: inhibitory effects a result of soluble metal cations? **Mycological Research**, v.100, p.707-413, 1996.
- KATZNELSON, H.; BOSE, B. Metabolic activity and phosphate-dissolving capability of bacterial isolates from wheat root, rhizosphere and non-rhizosphere soil. **Canadian Journal of Microbiology**, v.5, p.79-85, 1959.
- KRANTZ-RÜLCKER, C.; ALLARD, B.; SCHNÜRER, J. Adsorption of IIb-metals by three common soil fungi-comparison and assessment of importance for metal distribution in natural soil systems. **Soil Biology and Biochemistry**, v.28, p.967-975, 1996.
- NAHAS, E.M.; CENTURION, J.F.; ASSIS, L.C. Microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases de vários solos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.18, p.43-48, 1994.
- REYES, I.; BERNIER, L.; SIMARD, R.R.; ANTOUN, H. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. **FEMS Microbiology Ecology**, v.28, p.281-290, 1999.
- RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v.17, p.319-339, 1999.
- SILVA FILHO, G.N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.847-854, 2002.
- SILVA FILHO, G.N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, p.311-319, 2000.
- WHITELAW, M.A.; HARDEN, T.J.; HELYAR, K.R. Phosphate solubilization in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.31, p.655-665, 1999.

---

Recebido em 21 de dezembro de 2004 e aprovado em 11 de abril de 2005