

SOLUBILIZAÇÃO *IN VITRO* DE FOSFATO INORGÂNICO POR BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS

Natalia Caetano Vasques¹, Paula Cerezini², Marco Antonio Nogueira³, Mariangela Hungri^{3,4}

¹Pós-Graduada em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina – PR. Bolsista CAPES. natalia.vasques@uel.br

²Coorientadora, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA SOJA, Londrina – PR. paulacerezini@yahoo.com.br

³Pesquisadores da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA SOJA, Londrina – PR. marco.nogueira@embrapa.br; mariangela.hungria@embrapa.br

⁴Orientadora

RESUMO

O efeito de Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (BPCP) em estimular o crescimento das plantas se deve a diversos mecanismos microbianos intrínsecos de cada estirpe. Podendo estar atrelada, por exemplo, ao biocontrole, à síntese fitormônios e à disponibilização de nutrientes, como fosfatos inorgânicos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar, *in vitro*, potenciais estirpes solubilizadoras de fosfato de cálcio, a partir de 100 estirpes pré-selecionadas da “Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Soja: Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas”. Foram identificadas sete estirpes com capacidade de solubilização de fosfato de cálcio, pertencentes a quatro gêneros, com destaque para *Pseudomonas*.

PALAVRAS-CHAVE: BPCP; Microbiologia de solos; *Pseudomonas*.

1 INTRODUÇÃO

Como modelo de promoção do desenvolvimento vegetal tem-se a associação de diversas espécies de plantas a Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (BPCP). O efeito de BPCP em estimular o crescimento das plantas se deve a características intrínsecas de cada estirpe incluindo, por exemplo, a produção de fitormônios (ARSHAD; FRANKENBERGER, 1997), a disponibilização de nutrientes, como a produção de sideróforos (CROWLEY *et al.*, 1991), a solubilização de fosfato inorgânico (REYES *et al.*, 1999), mecanismos de tolerância a estresses, como a produção de ACC-deaminase (ACCD) (GLICK; PENROSE; LI, 1998). Outros mecanismos que podem ser citados são a atividade de enzimas fibrolíticas, como a celulase e protease (CELESTINO, 2019; ŠTURSOVÁ *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2020) e a produção de exopolissacarídeos (EPS) e biofilme (CHANG *et al.*, 2007). Há, ainda, mecanismos relacionados ao biocontrole, com atividade antagônica contra fitopatógenos, via indução de resistência sistêmica na planta (NAIK *et al.*, 2019).

Dentre os nutrientes que podem ser disponibilizados através da ação de BPCP, têm-se o fósforo, considerado um elemento essencial ao ciclo metabólico das plantas e particularmente pobre em solos brasileiros. No entanto, é facilmente retido devido características intrínsecas de solos tropicais.

Bactérias solubilizadoras de fosfato podem contribuir no ciclo do fósforo, convertendo fosfatos pouco solúveis em formas solúveis e, portanto, assimiláveis às plantas. Tal conversão pode ocorrer por diversas vias, sendo que a liberação de metabólitos, como os ácidos orgânicos, tem sido considerada como a principal (YOUNG *et al.*, 2013). Ou seja, através da redução do pH do meio, ocorre a solubilização das fontes pouco solúveis, permitindo a assimilação pelas plantas (SALIH *et al.*, 1989; NAHAS, 1991).

O objetivo da presente pesquisa foi caracterizar potenciais estirpes solubilizadoras de fosfato inorgânico *in vitro*, a partir de 100 estirpes pré-selecionadas da “Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Soja: Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas”, através de análises laboratoriais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A análise para identificação de microrganismos solubilizadores de fosfato inorgânico foi realizada através do método proposto por Sylvester-Bradley (1982). Após autoclavagem por 20 minutos a 121 °C do meio de cultura citado pela autora mencionada, este foi enriquecido com uma solução preparada com 4,93 g de $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ diluídos em 100 mL de água destilada e, então, autoclavada por 20 minutos a 121 °C.

O meio enriquecido foi distribuído em placas de Petri e foram inoculadas as 100 suspensões bacterianas da “Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Soja: Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas” ($\text{DO}_{600} = 0,6$) em gotas de 10 uL. Após a incubação por 3, 7 e 12 dias a 28 °C, foi aferida a presença ou ausência de halo transparente ao redor da colônia e, quando presente, foi medida sua extensão com o auxílio de um paquímetro digital (king tools).

O delineamento utilizado foi o inteiramente ao acaso, com três repetições por tratamento. As médias foram comparadas através de teste de Scott-Knot a 5 %.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A capacidade de solubilizar fosfato de cálcio, com halo de degradação ao redor da colônia (Figura 1) foi confirmada por sete estirpes. Quatro destas pertencem ao gênero *Pseudomonas*, e as outras três aos gêneros *Pantoea*, *Bacillus* e *Gluconacetobacter*. O halo foi medido, de forma a classificar o potencial de solubilização destas estirpes com a obtenção da relação halo x colônia e os resultados obtidos após 3, 7 e 12 dias de incubação, podem ser visualizados na Figura 1, com as diferenças estatísticas constatadas pelo teste Scott-Knott a 5%.

Vale ressaltar que a maioria das colônias mostraram uma relação crescente entre halo e colônia no decorrer dos dias, com exceção de uma única estirpe (Estirpe 5), que mostrou um crescimento não proporcional do halo em relação à colônia nos períodos sucessivos de avaliações, ou seja, o halo de degradação estabilizou e a colônia continuou a se expandir.

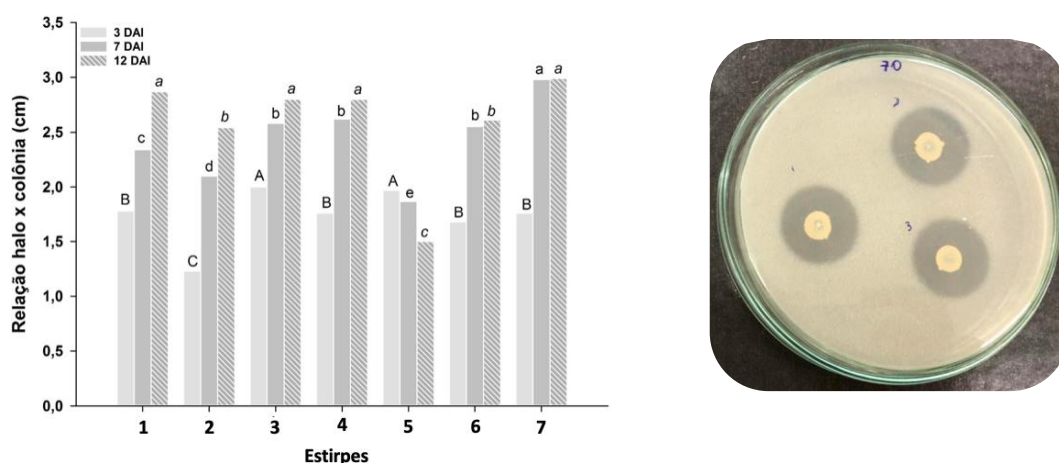


Figura 1: Relação halo x colônia das estirpes que apresentaram atividade solubilizadora de fosfato de cálcio. Média de 3 repetições. Letras maiúsculas comparam a relação halo x colônia avaliada 3 dias após a inoculação, letras minúsculas comparam tal relação 7 dias após inoculação, letras minúsculas itálicas foram utilizadas para a comparação da avaliação 12 dias após; letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Ao lado, foto do halo de degradação formado por estirpes solubilizadoras de fosfato inorgânico.

Portanto, tais cepas classificadas como solubilizadoras de fosfato inorgânico de Ca se mostram promissoras para o uso como BPCP, uma vez que o P é reconhecido como o

segundo nutriente mais limitante ao crescimento de plantas (MEHRVARZ; CHAICHI; ALIKHANI, 2008). Contudo, são necessários estudos subsequentes sobre possíveis associações das estirpes com as culturas, visando confirmar o potencial biotecnológico.

4 CONCLUSÕES

Conclui-se que o número de estirpes solubilizadoras de fosfato pode ser baixo, comparado ao número de espécies promotoras do crescimento de plantas estudadas neste trabalho (100). Os resultados sugerem que o gênero *Pseudomonas* é o mais especializado para tal característica, uma vez que entre as sete estirpes que se mostraram positivas, quatro são pertencentes a esse gênero.

REFERÊNCIAS

- ARSHAD, M.; FRANKENBERGER JR, W. T. Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. **Advances in Agronomy**, v. 62, p. 45-151, 1997.
- CELESTINO, E. L. F. G. **Bactérias promotoras de crescimento isoladas da caatinga alagoana**. 2019. 95 f. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia, Maceió, 2019.
- CHANG, W.S.; VAN DE MORTEL, M.; NIELSEN, L.; NINO DE GUZMAN, G.; LI, X.; HALVERSON, L. J. Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n.22, p. 8290-8299, 2007.
- CROWLEY, D. E.; WANG, Y. C.; REID, C. P. P.; SZANISZLO, P. J. Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. **Iron nutrition and interactions in plants**. Dordrecht: Springer, 1991. p. 213-232.
- GLICK, B. R.; PENROSE, D. M.; LI, J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, v. 190, n. 1, p. 63-68, 1998.
- NAHAS, E. **Ciclo do fósforo: transformações microbianas**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. 67 p.
- NAIK, K.; MISHRA, S.; SRICHANDAN, H.; SINGH, P. K.; SARANGI, P. K. Plant growth promoting microbes: potential link to sustainable agriculture and environment. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, p.101326, 2019.
- MEHRVARZ, S.; CHAICHI, M.R.; ALIKHANI, H.A. Effects of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus chemical fertilizer on yield and yield components of barely (*Hordeum vulgare* L.). **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science**, Dubai, v. 3, n. 6, p. 822-828, 2008.
- OLIVEIRA, F. M.; DE FIGUEIREDO, M. P.; ROSEIRA, J. P. S.; DE FIGUEIREDO, R. M.; FERREIRA, J. Q.; DE OLIVEIRA PADRE, E. C.; BERNADINO, F. S.; DOS SANTOS LUZ, Y. Degradabilidade *in vitro* do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas

exógenas. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 3, n. 3, p. 1956-1971, 2020.

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.

SALIH, H. M.; YAHYA, A. I.; ABDUL-RAHEM, A. M.; MUNAM, B. H. Availability of phosphorus in a calcareous soil treated with rock phosphate or superphosphate as affected by phosphate-dissolving fungi. **Plant and Soil**, The Hague, v. 120, p. 181-185, 1989.

ŠTURSOVÁ, M.; ŽIFČÁKOVÁ, L.; LEIGH, M. B.; BURGESS, R.; BALDRIAN, P. Cellulose utilization in forest litter and soil: identification of bacterial and fungal decomposers. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 80, n. 3, p. 735–746, 2012.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 12, n. 1, p. 15-22, 1982.

YOUNG, L. S.; HAMEED, A.; PENG, S. Y.; SHAN, Y. H.; WU, S. P. Endophytic establishment of the soil isolate Burkholderia sp. CC-AI74 enhances growth and P- utilization rate in maize (*Zea mays* L.). **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 66, p. 40-47, 2013.