

49

Circular
TécnicaRio de Janeiro, RJ
Dezembro, 2016

Autores

Bianca Braz MattosBióloga, mestre em Microbiologia,
analista da Embrapa Solos, Rio de
Janeiro, RJ.**Christiane Abreu de O. Paiva**Agrônoma, doutora em Biologia
Vegetal, pesquisadora da Embrapa
Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.**Ivanildo Evódio Marriel**Agrônomo, doutor em Agronomia,
pesquisador da Embrapa Milho e
Sorgo, Sete Lagoas, MG.**Flávia Cristina dos Santos**Agrônoma, doutora em Agronomia,
pesquisadora da Embrapa Milho e
Sorgo, Sete Lagoas, MG.**Jean Marcel Rodrigues de Pinho**Farmacêutico, doutor em
Bioquímica, analista de Embrapa
Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.**Eliane Aparecida Gomes**Bióloga, doutora em Genética
e Melhoramento, pesquisadora
da Embrapa Milho e Sorgo, Sete
Lagoas, MG.**Paulo César Teixeira**Agrônomo, doutor em Agronomia,
pesquisador da Embrapa Solos, Rio
de Janeiro, RJ.**Vinicius de Melo Benites**Agrônomo, doutor em Agronomia,
pesquisador da Embrapa Solos, Rio
de Janeiro, RJ.

Efeito da Temperatura de Secagem na Sobrevivência de Microrganismos Solubilizadores de Fosfato em Fertilizantes Organominerais Granulados Fosfatados

Introdução

Desde 2004, o Brasil tem sido apontado como um dos líderes mundiais na exportação de carne de frango (BRASIL, 2014). A atividade avícola está atrelada à geração elevada de resíduos, como a cama de frango. Este resíduo, composto por dejetos de aves, penas, restos de ração e substrato vegetal utilizado para forrar o piso dos galpões, apresenta carga elevada de nutrientes com potencial de uso na adubação (MARTIN; McCANN, 1998). Como a avicultura é um setor em expansão, a busca por soluções sustentáveis para o destino desse resíduo é de extrema importância.

Os fertilizantes organominerais, compostos por resíduos agrícolas (farinha de ossos, cama de aviário e composto suíno), além de representarem fonte de carbono para o solo, podem minimizar as perdas por lixiviação e garantir melhor efeito residual, apesar de possuírem teores de nutrientes solúveis normalmente mais baixos do que os encontrados em diversos fertilizantes minerais (ABOU EL-MAGD et al., 2006; SHARMA; MITTRA, 1991).

A aplicação de fertilizante organomineral na forma de frações orgânica e mineral em um único grânulo, ou em mistura farelada, é uma tecnologia promissora, pois facilita a estratégia no momento do manejo da fertilidade do solo (AKANDE et al., 2003).

A associação desses fertilizantes com microrganismos solubilizadores de fosfato (MSP) pode aumentar as taxas de fósforo (P) disponível para as plantas, seja pela facilitação da mineralização do P orgânico, através da indução das enzimas fosfatases (alcalina ou ácida), ou pela solubilização do P inorgânico, por meio da produção de ácidos orgânicos (MARRA et al., 2012). Esses microrganismos também poderão ser carregados via grânulos para o enriquecimento do solo e região da rizosfera, estimulando o crescimento e a aquisição de outros nutrientes pela planta.

O processo de produção de fertilizantes granulados é realizado por via úmida, ou seja, depende da adição de água à mistura das matérias-primas para que ocorra a formação dos grânulos no disco pelletizador. O disco pelletizador inclinado é mantido em rotação constante e alimentado com a mistura de pós-finos das matérias-primas, recebendo jatos de água que unem as partículas sólidas molhadas, formando núcleos que crescem por rolamento pela adição de mais partículas. O grânulo consolidado é descarregado para a fase de secagem, para a eliminação da água adicionada durante o processo de granulação (Figura 1).



Fotos: Bianca Braz Mattos.

Figura 1. A e B) Fertilizantes organominerais preparados pelo processo de granulação. C) Disco pelletizador utilizado para a produção de fertilizantes em pequena escala (bancada).

A secagem dos fertilizantes granulados é uma das mais importantes operações do processo de produção devido ao seu alto custo. O tempo de secagem é também um fator limitante na escala produtiva e o ideal é que seja o mais breve possível de forma a permitir o escoamento da produção. Além disso, um processo de secagem mal executado pode causar empedramento dos grânulos nos armazéns ou nos sacos de embalagens, desintegração dos grãos devido à falta de dureza, entupimento de telas de peneiras, incrustações nos equipamentos de transporte (correias e elevadores) e deposição de material em excesso nos moinhos.

Quando o processo de secagem envolve fertilizantes suplementados com microrganismos, o processo de secagem é ainda mais crítico, pois a temperatura de secagem deve ser compatível com a temperatura de tolerância apresentada pelos microrganismos utilizados na formulação.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da temperatura de secagem na sobrevivência de quatro estirpes de microrganismos solubilizadores de fosfato em fertilizantes organominerais (FOM) fosfatados granulados.

Material e Métodos

Este estudo foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Fertilizantes da Embrapa Solos e no Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Milho e Sorgo. O ensaio foi instalado em esquema fatorial $4 \times 3 + 3$, sendo quatro inoculantes turfosos

preparados com estirpes bacterianas pertencentes à Coleção de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo (identificadas como B1, B2, B3 e B4) e três temperaturas de secagem (30 °C, 80 °C e 120 °C) além de três tratamentos controle sem a adição de inoculante (B0), em cada temperatura de secagem (n=8) (Tabela 1).

Tabela 1. Microrganismos e temperatura de secagem utilizados para produção de fertilizantes organominerais granulados a partir da mistura de cama de frango e rocha fosfática.

| Tratamentos | Microrganismo | Temperatura de secagem (°C) | Tempo de secagem |
|-------------|---------------|-----------------------------|------------------|
| 1 | | 30 | 6 dias |
| 2 | | 80 | 17 h |
| 3 | | 120 | 1h e 30 min |
| 4 | | 30 | 6 dias |
| 5 | B1 | 80 | 17 h |
| 6 | B1 | 120 | 1h e 30 min |
| 7 | | 30 | 6 dias |
| 8 | B2 | 80 | 17 h |
| 9 | B2 | 120 | 1h e 30 min |
| 10 | | 30 | 6 dias |
| 11 | B3 | 80 | 17 h |
| 12 | B3 | 120 | 1h e 30 min |
| 13 | | 30 | 6 dias |
| 14 | B4 | 80 | 17 h |
| 15 | B4 | 120 | 1h e 30 min |

Para o preparo dos inoculantes, os microrganismos solubilizadores e mineralizadores de P pré-selecionados, preservados em ágar-batata sólido, imersos em óleo mineral estéril na Coleção de Culturas de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo (CMMS), foram reativados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA: batata (200 g L⁻¹), dextrose (20 g L⁻¹) e ágar (15 g L⁻¹), utilizando-se o método de estrias para obtenção de colônia pura dos isolados. Posteriormente, cada estirpe foi transferida para cultivo em caldo de soja trip-caseína, durante 72 h, à temperatura de 29 °C, sob agitação constante de 350 RPM. Após uma semana de crescimento, os inóculos foram centrifugados por 10 minutos, a 6000 g. As suspensões, ressuspensas em solução salina [0,85% (m/v) NaCl], foram ajustadas para a absorbância igual ou superior a 1, em comprimento de onda de 550 nm. Após esse processo, a suspensão de microrganismos foi adicionada à turfa estéril de forma a preparar o inoculante turfoso utilizado na produção dos fertilizantes.

Para o preparo dos FOMs fosfatados, as matérias-primas (pó de rocha fosfática, cama de frango e o inoculante turfoso) foram moídas e peneiradas em malha de 500 µm. Após essa etapa inicial, foram preparadas as misturas das matérias-primas em proporção massa: massa, de acordo com formulações preestabelecidas. As misturas foram novamente peneiradas em malha de 500 µm e os grânulos foram produzidos em disco pelletizador com velocidade e inclinação constantes, por via úmida.

Após a granulação, os grânulos produzidos foram secados em estufa de circulação forçada de ar em diferentes temperaturas (30 °C, 80 °C e 120 °C).

Para a determinação do tempo necessário para a secagem dos materiais nas diferentes temperaturas, foi realizado um ensaio preliminar no qual a secagem dos produtos granulados foi acompanhada por meio da perda de massa de água até estabilização das massas. Para a realização desse teste, os fertilizantes foram distribuídos em bandeja de forma a formar uma camada de aproximadamente 1 cm para que a massa total de fertilizante secada não influenciasse no tempo de secagem.

Os tempos de secagem utilizados para os testes foram de seis dias para secagem a 30 °C, 17 horas para 80 °C e uma hora e 30 minutos para 120 °C.

Após o preparo final de cada uma das formulações de fertilizantes correspondentes aos tratamentos da Tabela 1, foi avaliado o teor de P no produto final. O teor de fósforo dos fertilizantes produzidos foi determinado pelo método gravimétrico do Quimociac, conforme descrito no Manual de Métodos Analíticos Oficiais para Fertilizante e Corretivos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) (BRASIL, 2014).

Os fertilizantes produzidos foram armazenados na Embrapa Milho e Sorgo por nove meses, em temperatura ambiente. A contagem de microrganismos viáveis, após nove meses de armazenamento dos fertilizantes organominerais granulados, foi realizada na Embrapa Milho e Sorgo por plaqueamento em meio fitato (GARGOVA et al., 1997), que é seletivo e diferencial para a população de MSP, utilizando o método da microgota (SIEUWERTS et al., 2008). Os resultados obtidos foram transformados em Log de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de fertilizante.

Os resultados foram submetidos à análise de variância, seguidos pelo teste F.

Resultados e Discussão

Na Tabela 2, observa-se que a temperatura de secagem não influenciou o teor de P dos FOMs. Esse resultado já era esperado, pois perdas do fósforo presente nos fertilizantes não são comuns.

Tabela 2. Teor médio de fósforo total dos fertilizantes determinado pelo método gravimétrico do Quimociac. (n=3).

| Temperatura de Secagem (°C) | P ₂ O ₅ total (%) ^{1/} |
|-----------------------------|---|
| 30 | 17,54 ± 0,24 |
| 80 | 17,77 ± 0,44 |
| 120 | 16,86 ± 0,23 |

^{1/} Obtido conforme Brasil (2014).

Por meio da contagem de microrganismos viáveis (UFC g⁻¹) presentes nos fertilizantes granulados, foi possível observar que a sobrevivência dos MSPs é dependente da temperatura de secagem e da estirpe utilizada no preparo do fertilizante (Figura 2). De acordo com a análise de variância, verificou-se também diferença significativa para a interação temperatura e a estirpe microbiana testada (p<0,05) pelo teste F. Há que se ressaltar que, atualmente, não existe estabelecido um valor mínimo de UFC a ser encontrado nos fertilizantes/inoculantes contendo MSPs. Para inoculantes formulados com bactérias associativas e microrganismos promotores de crescimento de plantas, que abrange os MSPs, a concentração de células viáveis deve ser informada no processo de registro do produto, de acordo com a recomendação específica emitida por órgão brasileiro de pesquisa científica oficial ou credenciado pelo Mapa, obtida através da realização de ensaios de eficiência agrônômica, conforme exigência do Mapa (BRASIL, 2014).

No tratamento B0, sem a adição de MSP, só foi possível observar o crescimento microbiano nos fertilizantes que sofreram secagem a 30 °C. No entanto, essa população não pode ser detectada após secagem envolvendo temperaturas mais elevadas (80 °C e 120°C), sugerindo que os MSPs presentes na cama de frango são termossensíveis. É preciso lembrar que a técnica utilizada neste trabalho permite apenas a visualização dos microrganismos viáveis e cultiváveis em condições de cultivo específicas, o que pode subestimar o número real de

microrganismos presentes na cama de frango.

Lu et al. (2003) caracterizaram a população microbiana presente na cama de frango utilizando técnicas de cultivo e ferramentas moleculares. A contagem de microrganismos aeróbicos em meio BHI permitiu estimar que a cama de frango utilizada neste estudo continha cerca de 10^9 células cultiváveis por grama de material. Esse valor se aproxima ao encontrado após plaqueamento dos fertilizantes contendo apenas cama de frango e secados na temperatura de 30 °C em meio fitato, utilizados no presente estudo (8,2 UCF por grama de material). As ferramentas moleculares utilizadas por Lu et al. (2003) permitiram a identificação de uma população predominante de bactérias Gram positivas incluindo decompositores dos gêneros *Arthobacter*, *Brevibacterium* e *Cellulomonas*. Além da identificação de microrganismos decompositores, foram identificadas sequências homólogas a microrganismos potencialmente patogênicos para humanos e animais, como *Bordetella* spp., *Clostridium* spp. e *Staphylococcus*. No entanto, provavelmente essas espécies estão relacionadas a estirpes que causam doenças subclínicas ou a espécies não caracterizadas, uma vez que as amostras de cama de frango utilizadas no trabalho eram oriundas de fazendas sem relato de casos de doenças nas aves e/ou as sequências de DNA encontradas apresentavam baixo grau de homologia com patógenos, segundo o banco de dados utilizado no estudo.

Nos fertilizantes suplementados com os microrganismos B1, B2 e B4, foi possível observar maior sobrevivência dos MSPs, os quais mantiveram contagens acima de 10⁶ microrganismos por grama de fertilizantes nas temperaturas de 30 °C e 80 °C (Figura 2). Tal dado sugere que esses microrganismos possuem tolerância maior a variações de temperatura, sendo mais promissores para produção de fertilizantes organominerais granulados suplementados com microrganismos, pois permitem a redução do tempo de secagem dos produtos pela elevação da temperatura de secagem, tornando mais viável a sua produção em larga escala. Essas características também podem facilitar a eliminação ou redução da população de possíveis patógenos presentes na cama de frango, aumentando a segurança do uso dos produtos contendo cama de frango, já que estes estão susceptíveis à infecção com microrganismos patogênicos, como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* e *Campylobacter* (MARTIN; McCANN,

1998). A estirpe B3 apresentou comportamento semelhante ao observado para a população da cama de frango, não sendo indicada a sua utilização para o preparo de fertilizantes em condições de secagens superiores a 30 °C (Figura 2). De forma geral, os fertilizantes preparados com a estirpe B2 se destacaram por apresentar maior sobrevivência nas temperaturas de 30 °C e 80 °C, chegando a apresentar contagens superiores a 10^9 UFC por grama de fertilizante. Mesmo sendo termossensível, B2 foi a estirpe com maior contagem de MSP em meio fitato, aos nove meses após a secagem no ensaio realizado. Isso demonstra a preservação da habilidade de solubilização de fosfato dos microrganismos, pois eles foram capazes de crescer em meio contendo formas insolúveis de fósforo (meio fitato). Não houve sobrevivência de MSP em nenhuma das formulações de fertilizantes após a secagem em 120 °C.

A sensibilidade de bioinoculantes fosfatados a variações na temperatura de secagem descritas neste trabalho corroboram os dados descritos em estudo realizado por Pinho et al. (2016), onde foi avaliada a atividade enzimática do solo adubado para cultivo de milho com fertilizantes organominerais com diferentes condições de secagem. Neste trabalho, os autores sugerem haver dependência da atividade enzimática diante da temperatura de secagem dos granulados. As atividades das enzimas de fosfatase alcalina, urease e arginase não foram influenciadas pela temperatura de secagem dos fertilizantes. No entanto, a atividade da enzima fosfatase ácida e a contagem de MSP sofreram redução significativa após a secagem dos produtos em altas temperaturas.

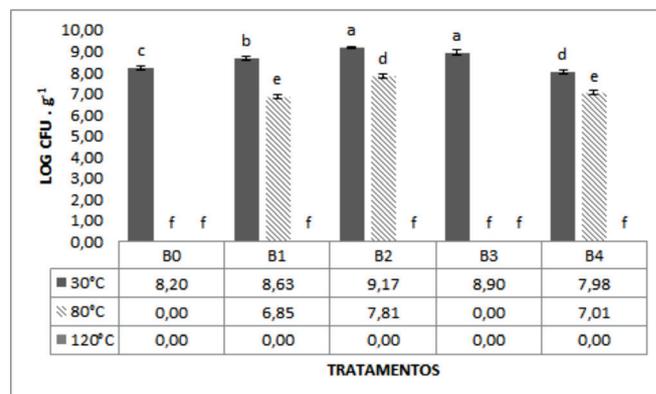


Figura 2. Contagem da população de microrganismos solubilizadores de fosfato, em meio fitato, nos fertilizantes organominerais granulados que sofreram secagem em diferentes temperaturas (30 °C, 80 °C e 120 °C). B0 representa o fertilizante produzido sem a adição de inoculante; B1, B2, B3 e B4, os fertilizantes produzidos com a adição de inoculantes preparados com estirpe B1; B2; B3 e B4, respectivamente. As barras representam o erro padrão.

Conclusões

A sobrevivência dos microrganismos solubilizadores de fosfato é dependente da temperatura de secagem e da estirpe utilizada no preparo do fertilizante.

Após nove meses de armazenamento, algumas estirpes se mantiveram viáveis nos fertilizantes organominerais granulados, mesmo com redução significativa da população, após procedimento de secagem até 80 °C. No entanto, nenhuma estirpe foi capaz de permanecer viável após secagem a 120 °C.

Referências

ABOU EL-MAGD, M. M.; EL-BASSIONY, A. M.; FAWZY, Z. F. Effect of organic manure with or without chemical fertilizers on growth, yield and quality of some varieties of Broccoli plants. **Journal of Applied Sciences Research**, Pakistan, v. 2, n. 10, p. 791-798, 2006.

AKANDE, M. O.; OLUWATOYINBO, F. I.; ADEDIRAN, J. A.; BUARI, K. W.; YUSUF, I. O. Soil amendments affect the release of P from rock phosphate and the development and yield of okra. **Journal of Vegetable Crop Production**, United Kingdom, v. 9, n. 2, p. 3-9, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizante e corretivos. Brasília, DF: MAPA/DAS/CGAL, 2014. Disponível em: < http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/manual_in-5_analiticos-oficiais-para-fertilizantes-e-corretivos_com_capa_final_03.pdf >. Acesso em: 10 jan. 2014.

GARGOVA, S.; ROSHKOVA, Z.; VANCHEVA, G. Screening of fungi for phytase production. **Biotechnology Techniques**, United Kingdom, v. 11, n. 4, p. 221-224, 1997.

LU, J.; SANCHEZ, S.; HOFACRE, C.; MAURER, J. J.; HARMON, B. G.; LEE, M. D. Evaluation of broiler litter with reference to the microbial composition as assessed by using 16S rRNA and functional gene markers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 2, p. 901-908, 2003.

MARRA, L. M.; SOARES, C. R. F. S.; OLIVEIRA, S. M.; FERREIRA, P. A. A.; SOARES, B. L.; CARVALHO, R. F.; LIMA, J. M.; MOREIRA, F. M. S. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, United Kingdom, v. 357, p. 289-307, 2012.

MARTIN, S. A.; McCANN, M. A. Microbiological survey of Georgia poultry litter. **Journal of Applied Poultry Research**, Oxford, v. 7, p. 90-98, 1998.

PINHO, J. M. R.; SANTOS, F. C.; MATTOS, B. B.; GOMES, E. A.; MARRIEL, I. E.; OLIVEIRA, C. A. Atividade enzimática do solo em cultivo de milho adubado com fertilizantes organominerais enriquecidos com microrganismos e granulados sob diferentes temperaturas de secagem. In: **CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 31., 2016, Bento Gonçalves, RS. Anais...** Bento Gonçalves, RS: FEPAGRO: EMATER/RS: Embrapa Milho e Sorgo, 2016..

SHARMA, A. R.; MITTRA, B. N. Effect of different rates of application of organic and nitrogen fertilizers in a rice-based cropping system. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 117, n. 3, p. 313-318, 1991.

SIEUWERTS, S.; DE BOK, F. A. M.; MOLS, E.; DE VOS, W. M.; VAN HYLCKAMA Vlieg, J. E. T. A simple and fast method for determining colony forming units. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 47, n. 4, p. 275-278, 2008.

Circular Técnica, 48

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na: **Embrapa Solos**
Rua Jardim Botânico, 1024 Jardim Botânico,
CEP: 22460-000, Rio de Janeiro, RJ
Fone: + 55 (21) 2179-4500
Fax: + 55 (21) 2179-5291
<https://www.embrapa.br>
<https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac/>

1ª edição
On-line (2016)

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Comitê de Publicações

Presidente: José Carlos Polidoro.
Secretária-Executiva: Jacqueline S. Rezende Mattos
Membros: Ademar Barros da Silva, Adriana Vieira de C. de Moraes, Alba Leonor da S. Martins, Cesar da S. Chagas, Enyomara L. Silva, Evaldo de P. Lima, Joyce Maria G. Monteiro, Luciana S. de Araujo, Maria Regina C. Laforet, Maurício R. Coelho, Moema de A. Batista, Wenceslau G. Teixeira.

Expediente

Supervisão editorial: Jacqueline Rezende Mattos.
Revisão de texto: André Luiz da Silva Lopes.
Editoração eletrônica: Moema de A. Batista.
Normalização bibliográfica: Enyomara Lourenço Silva e Luciana Sampaio de Araujo.