

50

Circular
TécnicaRio de Janeiro, RJ
Outubro, 2017**Autores****Bianca Braz Mattos**, bióloga,
mestre em Microbiologia,
Analista da Embrapa Solos,
Rio de Janeiro, RJ.**Christiane Abreu Oliveira
Paiva**, agrônoma, doutora em
Biologia Vegetal, pesquisadora
da Embrapa Milho e Sorgo,
Sete Lagoas, MG.**Ivanildo Evodio Marriel**,
agrônomo, doutor em
Agronomia, pesquisador da
Embrapa Milho e Sorgo, Sete
Lagoas, MG.**Flavia Cristina dos Santos**,
agrônoma, doutora em
Agronomia, pesquisadora da
Embrapa Milho e Sorgo, Sete
Lagoas, MG.**Aline Martineli Batista**,
agrônoma, mestranda em
Solos e Nutrição de Plantas na
ESALQ/USP, bolsista de Iniciação
Científica do CNPq, 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 Cesar 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.**Embrapa**

Sobrevivência de Microrganismos Solubilizadores de Fósforo em Fertilizantes Organominerais Granulados

Introdução

A cama de frango serve como piso para os sistemas de avicultura, sendo enriquecida com a ração excedente dos comedouros e com o próprio dejetos dos animais. Devido aos teores de nitrogênio, potássio, fósforo e outros nutrientes, a cama de frango pode ser utilizada como fertilizante (AVILA et al., 1992).

O baixo nível de fósforo (P) disponível no solo é um dos fatores limitantes para a produção de grãos em regiões tropicais (LOPES, 1983). Para alcançar uma produtividade de grãos satisfatória, é necessário corrigir a carência de P por meio da utilização de fertilizantes que são, na sua maioria, importados. Entre as opções de fonte de P disponíveis no mercado, os fertilizantes fosfatados totalmente acidulados ocupam posição de destaque, sendo frequentemente utilizados para a correção do solo (PROCHNOW et al., 2004), entretanto, a eficiência do uso de fertilizantes fosfatados por plantas é baixa, da ordem de 10% - 30% (SHEN et al., 2011).

Em virtude disso, tem aumentado a busca por produtos sustentáveis que proporcionem à agricultura brasileira maior autonomia no mercado de insumos. A utilização de resíduos agrícolas com a finalidade de reduzir o uso de fertilizantes provenientes de fontes não renováveis na agricultura é uma alternativa bastante atraente, uma vez que seria uma forma sustentável de destinação dos resíduos agrícolas (HIGASHIKAWA et al., 2010).

Além disso, a adição de resíduos orgânicos ao solo, como na forma de esterco animal, ocasiona, de forma geral, diminuição da adsorção de P, conseqüentemente, um aumento na sua disponibilidade para as plantas (NOVAIS et al., 2007).

Comparativamente com os fertilizantes fosfatados totalmente acidulados, os fosfatos naturais são insolúveis em água, apresentando menor eficiência em curto prazo (KORNDOFER, 1978). No entanto, em função do processo industrial oneroso envolvido na produção de fertilizantes solúveis, a utilização de fosfatos naturais tem se tornado uma alternativa atrativa pelo baixo custo do produto final, apesar de apresentarem menor eficiência agrônômica.

O uso de microrganismos solubilizadores e/ou mineralizadores de fosfatos tem sido apontado como alternativa promissora para a produção de fertilizantes organominerais a partir de fosfatos naturais (VASSILEVA et al., 2010; ALMEIDA et al., 2016).

Os microrganismos são reconhecidos por sua habilidade em promover transformações bioquímicas dos nutrientes e por sua importância em prover os elementos nutritivos de interesse às plantas, principalmente nitrogênio, fósforo e enxofre (PAUL; CLARK, 1989; SINGH; REDDY, 2011).

Com relação aos compostos fosfatados, os microrganismos apresentam dois mecanismos de liberação de P solúvel: as reações de (1) solubilização do fósforo inorgânico e as de (2) mineralização do fósforo orgânico (GOMES et al., 2014;

OLIVEIRA et al., 2009; RICHARDSON; SIMPSON, 2011; VASSILEV et al., 2014).

No entanto, para que os microrganismos selecionados para a produção dos fertilizantes organominerais granulados sejam capazes de tornar o P presente nos fosfatos naturais, disponível para a planta, é necessário que eles sobrevivam nos fertilizantes, permanecendo viáveis durante o processo de armazenamento.

Diante desse cenário, o objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de MSP em formulações de fertilizantes granulados produzidos a partir de fosfato natural e/ou cama de frango e enriquecidas com estirpes bacterianas com potencial de mineralização e solubilização de P, após um período de armazenamento de seis meses, com a finalidade de avaliar o potencial dessas estirpes para a produção de fertilizantes organominerais granulados.

Material e Métodos

Os fertilizantes utilizados foram granulados no Laboratório de Tecnologia de Fertilizantes da Embrapa Solos, RJ, em uma mistura de cama de frango moída, fosfato natural com inoculantes turfosos. Os inoculantes foram preparados pela Embrapa Milho e Sorgo a partir de microrganismos solubilizadores e mineralizadores de P pré-selecionados e pertencentes à Coleção de Culturas de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF).

Para o preparo dos fertilizantes, as matérias-primas (fosfato natural, cama de frango e turfa) foram moídas e peneiradas em peneira com malha de 500 µm. Após essa etapa, as matérias-primas foram misturadas em proporção massa:massa, para definir os tratamentos de acordo com a Tabela 1. As misturas foram homogeneizadas e submetidas à granulação em disco pelotizador com velocidade e inclinação constantes com adição manual de água por borrifamento.

Após a granulação, os fertilizantes foram peneirados para separação dos grânulos com diâmetro entre 2 mm e 4 mm que foram secados em estufa de circulação forçada de ar a 40 °C, até massa constante.

A avaliação da sobrevivência de microrganismos

nos grânulos foi feita aos seis meses após a produção dos fertilizantes, sendo realizada a contagem da população microbiana nas dez formulações granuladas (quatro organominerais, quatro minerais e duas orgânicas) (Tabela 1).

Tabela 1. Matérias-primas e inoculantes utilizados para preparo de fertilizantes granulados.

Tratamento	Cama de frango (CF)	Fosfato natural (FN)	Inoculante microbiano turfoso
1	x	x	B1
2	x	x	B2
3	x	x	Mix
4	x	x	-
5	-	x	B1
6	-	x	B2
7	-	x	Mix
8	-	x	-
9	x	-	B1
10	x	-	-

B1 – Inoculante turfoso preparado com isolado bacteriano pertencente à Coleção de Culturas de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF).

B2 – Inoculante turfoso preparado com isolado bacteriano pertencente à Coleção de Culturas de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF).

Mix – Inoculante turfoso preparado com consórcio bacteriano pertencente à Coleção de Culturas de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF).

Para a contagem de microrganismos viáveis, os microrganismos foram extraídos dos fertilizantes com solução salina na proporção 1:10 (m/v), em frasco de 50 mL com tampa contendo 5 g de amostra de cada fertilizante com agitação de 120 RPM por 30 minutos, em temperatura ambiente, em meio de cultura ágar batata dextrose, contendo antifúngico (nistatina) (bactérias totais) (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1960); meio de cultura Martin (fungos) (MARTIN, 1950) e meio de cultura Fitato (MSP) (GARGOVA, 1997), com seis repetições para cada diluição.

As placas foram incubadas em temperatura ambiente, em bancada, por 3 e 7 dias para visualização do crescimento bacteriano e fúngico, respectivamente, e as unidades formadoras de colônias foram contadas manualmente (Figura 1).

Para a determinação dos microrganismos solubilizadores de fosfato (MSP) viáveis em meio fitato, foram contadas as colônias que possuíam halo translúcido em torno da colônia, indicativo da solubilização de P (Figura 2).

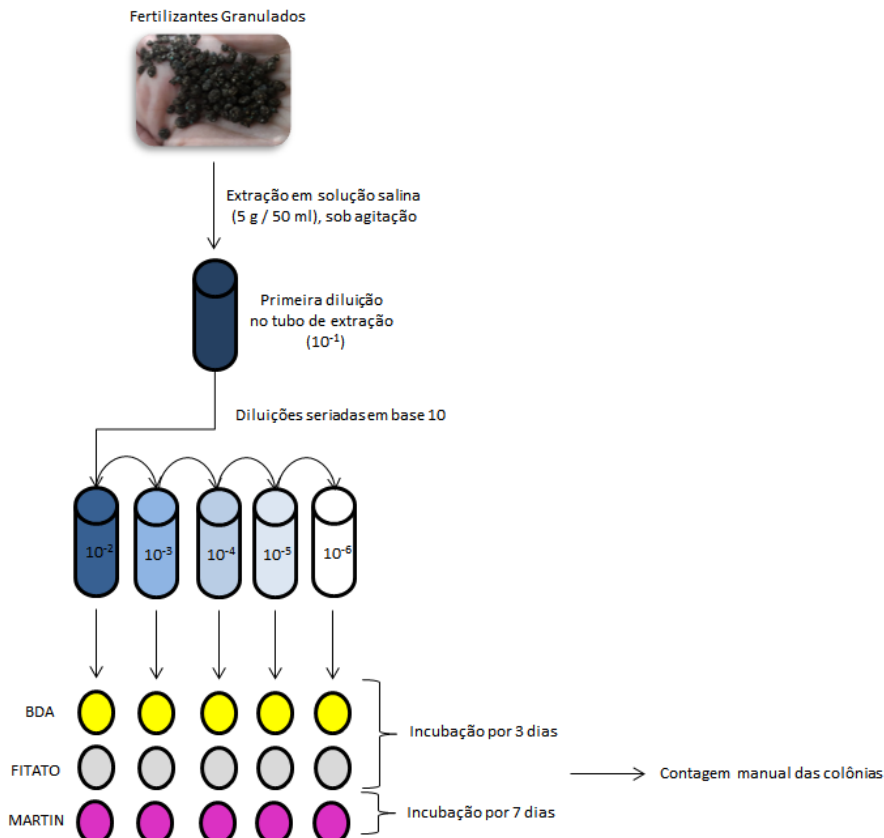
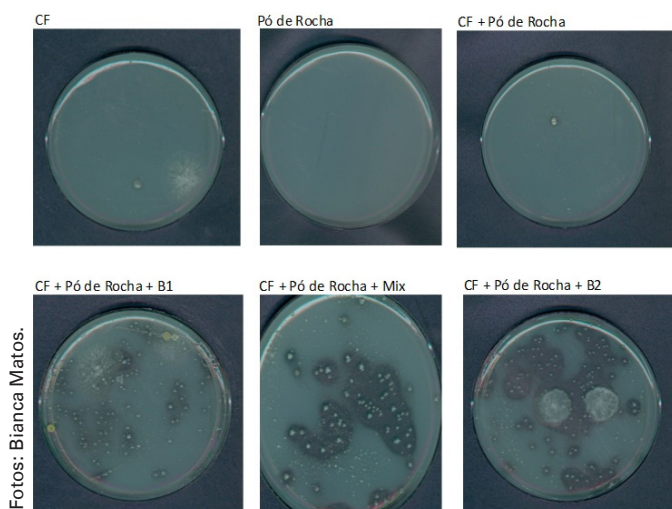


Figura 1. Representação da metodologia utilizada para extração e contagem de microrganismos viáveis nos fertilizantes. BDA, meio de cultura ágar batata dextrose; Fitato: meio de cultura contendo fitato de sódio como fonte exclusiva de P; Martin: meio de cultura para contagem dos fungos viáveis



Fotos: Bianca Matos.

Figura 2. Visualização dos halos indicativos da solubilização de fósforo (P) em torno das colônias dos microrganismos crescidos em meio contendo fitato de sódio como fonte exclusiva de P, após três dias de incubação.

CF: cama de frango; B1, B2 e Mix: Inoculantes turfosos preparados com isolados bacterianos ou mistura de isolados pertencentes à Coleção de Culturas de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF).

O resultado da contagem dos microrganismos viáveis presentes nos fertilizantes, após seis meses de armazenamento, foi transformado para Log de unidades formadoras de colônias (CFU). Esses dados foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) e em seguida ao teste de Tukey ($P < 0,05$) para comparação das médias.

Resultados e Discussão

Após seis meses de armazenamento em prateleira, foi avaliada a população de bactérias totais em meio de cultura BDA (Figura 3A), total de fungos (Figura 3B) e total de microrganismos solubilizadores de fosfato (Figura 3C) nos fertilizantes organominerais enriquecidos ou não com microrganismos. A população total de bactérias viáveis foi maior que a quantidade inicial utilizada para o preparo dos tratamentos (10^8 células g^{-1}) nos fertilizantes organominerais granulados CF+PR; CF+PR+B1; CF+PR+B2 e CF+PR+Mix. Como esse total ocorreu também nos tratamentos contendo cama de frango e sem inoculação, sugere-se que os microrganismos presentes na cama de frango compunham a população microbiana viável nos fertilizantes (Figura 3A). A população fúngica encontrada, crescida em meio Martin, está relacionada à CF, uma vez que só foi possível efetuar sua contagem nos tratamentos contendo CF, mantendo sua população acima de 10^3 células g^{-1} em todos os tratamentos (Figura 3B).

Aos seis meses, a contagem de MSP nos fertilizantes organominerais foi significativamente maior nos granulados suplementados com os microrganismos mantendo-se na faixa de 10^5 a 10^6 células g^{-1} , dependendo do microrganismo

utilizado na suplementação (Figura 3C). Esse dado confirma que os MSP provenientes da inoculação foram capazes de se estabelecer nos fertilizantes mesmo com a pressão competitiva dos microrganismos da cama de frango. É importante que as estirpes adicionadas aos organominerais granulados sejam capazes de competir com os microrganismos do substrato base, como ocorre na prática agrícola de inoculação nas sementes ou no sulco de plantio, onde esse substrato é o solo ou a própria planta. Sobre a influência do substrato, o bioinoculante encontra resposta imediata em seu estabelecimento da microflora nativa de cada um, como da cama de frango e minerais. Essas respostas variam dependendo das bactérias utilizadas, a sua densidade, tipo de substrato ou solo e também das condições ambientais (BASHAN, 1998). Esses fatores podem resultar em rápida baixa na população de inoculantes (PATIL et al., 2016). Como proposto por Stephens e Rask (2000), para que se possa formular e produzir comercialmente os inoculantes, é necessária a integração dos parâmetros físicos, químicos e biológicos, permitindo assim elevadas populações do microrganismo alvo e maior tempo de sobrevivência. O fator mais importante para a qualidade é um elevado número de microrganismos vivos, e nenhuma ou mínima contaminação por

microrganismos não prejudiciais para a cepa elite ou o agente patogênico para plantas e seres humanos.

Já nos fertilizantes granulados minerais, houve perda da viabilidade dos microrganismos totais e MSP (Figuras 3A e C). Isso pode ter ocorrido devido à ausência de uma fonte de carbono para ser utilizada como substrato pelos (ou pela liberação de) minerais tóxicos presentes nas rochas que possam apresentar efeito negativo sobre os microrganismos avaliados (SILVA et al., 2014). Aparentemente, a estirpe microbiana utilizada para o preparo do inoculante turfoso B2 foi mais sensível à incubação com o fosfato natural, não havendo diferença significativa entre a contagem de unidades formadoras de colônia do fertilizante PR + B2 e a do fosfato natural puro (PR). O produto que continha o fosfato natural e o inoculante B1 (PR + B1), apesar de apresentar uma contagem de unidades formadoras de colônia inferior à contagem de inoculação (próxima a 10^4), foi o que apresentou a maior contagem de MSP viáveis na ausência da cama de frango, sugerindo que essa estirpe é mais adaptada às condições adversas oferecidas pelo fosfato natural (baixo teor de carbono e possível efeito tóxico).

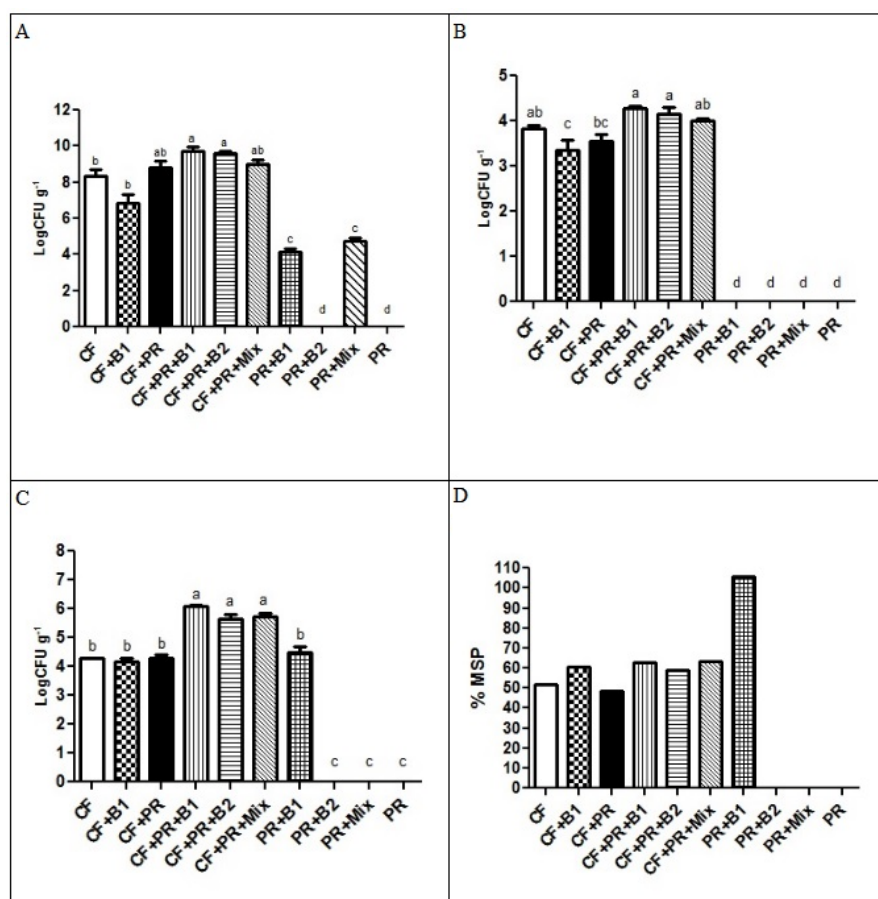


Figura 3. Contagem dos microrganismos viáveis presentes em formulações de fertilizantes granulados, após seis meses de armazenamento à temperatura ambiente. Avaliação do número de UFC.g⁻¹ nos meios BDA, MARTIN e Fitato. A) Microrganismos totais (BDA); B) Fungos filamentosos (MARTIN); C) MSP (Fitato); D) Porcentagem de MSP em relação à população total de microrganismos viáveis nos fertilizantes granulados. Resultados expressos em Log de unidades formadoras de colônias por grama de fertilizante (CFU.g⁻¹). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos por meio do teste de ANOVA, seguido pelo teste de Tukey (P<0,05). CF: cama de frango; PR: pó de rocha; B1, B2 e Mix: microrganismos.

A suplementação com MSP foi capaz de aumentar a população de mineralizadores de P em até 10% quando comparado ao granulado contendo apenas cama de frango e o fosfato natural (CF+PR) (Figura 3D). Já no granulado mineral contendo apenas pó de rocha e o inoculante contendo a estirpe B1, toda a população de microrganismos viáveis e cultiváveis correspondeu ao inoculante.

Conclusões

A composição dos granulados afeta a viabilidade dos microrganismos.

A combinação da cama de frango com a rocha fosfatada, base dos fertilizantes organominerais, favoreceu a população de MSP, garantindo a sobrevivência dos microrganismos durante o período de seis meses de armazenamento.

Os organominerais contendo MSP apresentam maior potencial de mineralização de P do que os não suplementados, apresentando uma recuperação de MSP superior aos demais.

O total de células viáveis também foi afetado pela composição do fertilizante, sugerindo que a escolha das matérias-primas a serem utilizadas e sua compatibilidade com os microrganismos utilizados são fatores importantes para a estabilidade do produto.

Todos os microrganismos-teste mostraram-se promissores para a produção de fertilizantes organominerais granulados contendo cama de frango e fosfato natural, mas não para a produção de fertilizantes minerais contendo apenas fosfato natural, já que não foi possível detectar microrganismos viáveis nessas formulações.

Referências

- ALMEIDA, C. N. S.; SANTOS, F. C.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; FREITAS, A.; PAIVA, C. A. O. **Adubação organomineral em associação com microrganismos solubilizadores de fósforo no milho**. Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2016. 38 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 147).
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. 11th ed. New York: Apha, 1960.
- AVILA, V. S.; MAZZUCO, H.; FIGUEIREDO, E. A. P. **Cama de aviário**: materiais, reutilização, uso como alimento e fertilizante. Concórdia, SC: EMBRAPA-CNPASA, 1992. 38 p. (EMBRAPA-CNPASA. Circular Técnica, 16).
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Proposal for the division of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) and PGPB. **Soil Biology and Biochemistry**, Philadelphia, v. 30, n. 8/9, p. 1225-1228, 1998.
- GARGOVA, S.; ROSHKOVA, Z.; VANCHEVA, G. Screening of fungi for phytase production. **Biotechnology Techniques**, Philadelphia, v. 11, n. 4, p. 221-224, 1997.
- GOMES, E. A.; SILVA, U. C.; MARRIEL, I. E.; PAIVA, C. A. O.; LANA, U. G. P. Rock phosphate solubilizing microorganisms isolated from maize rhizosphere soil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, MG, v. 13, n. 1, p. 69-81, 2014.
- HIGASHIKAWA, F. S.; SILVA, C. A.; BETTIOL, W. Chemical and physical properties of organic residues. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 34, n. 5, p. 1743-1752, 2010.
- KORNDORFER, G. H. **Capacidade de fosfatos naturais e artificiais fornecerem fósforo para plantas de trigo**. 1978. 61f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- LOPES, A. S. **Solos sob "cerrado"**: características, propriedades e manejo. Piracicaba, SP: Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1983. 162 p.
- MARTIN, J.P. Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. **Soil Science**, Maynard, v. 69, n. 3, p. 215-232. 1950.
- NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J.; NUNES, F. N. Fósforo. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 471-537.
- OLIVEIRA, C. A.; ALVES, V. M. C.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; SCOTTI, M. R.; CARNEIRO, N. P.; GUIMARAES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; SÁ, N. M. H. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, Philadelphia, v. 41, n. 9, p. 1782-1787, 2009.

PATIL H. J. Microbial inoculant: modern era of fertilizers and pesticides. In: PRATAP, D.; BAHADUR, H. **Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity**. New Delhi: Springer, v. 1, p. 319-343.

PAUL, E. A.; CLARK, F. E. **Soil Microbiology and Biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1989. 254 p.

PROCHNOW, L. I.; ALCARDE, J. C.; CHIEN, S. H. Eficiência agrônômica dos fosfatos totalmente acidulados. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. S. **Fósforo na agricultura brasileira**. Piracicaba, SP: Potafos, 2004. p. 605-663.

RICHARDSON, A. E.; SIMPSON, R. J. Soil microorganisms mediating phosphorus availability. **Plant Physiology**, Philadelphia, v. 156, n. 3, p. 989-996, 2011.

SHEN, J.; YUAN, L.; ZHANG, J.; LI, H.; BAI, Z.; CHEN, X.; ZHANG, W.; ZHANG, F. Phosphorus dynamics: from soil to plant. **Plant Physiology**, Philadelphia, v. 156, n. 3, p. 997-1005, 2011.

SILVA, U. C.; MENDES G. O.; SILVA, N. M. R. M.; DUARTE, J. L.; SILVA, I. R.; TOTOLA, M. R.; COSTA, M. D. Fluoride-Tolerant Mutants of *Aspergillus niger* Show Enhanced Phosphate Solubilization Capacity. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 10, p. 1-9, 2014.

SINGH, H.; REDDY, M.S. Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. **European Journal of Soil Biology**, Philadelphia, v. 47, n. 1, p. 30-34, 2011.

STEPHENS, H.; RASK, H. M. Inoculant production and formulation. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, 249-258, 2000.

VASSILEV, N.; MENDES, G.; COSTA, M.; VASSILEVA, M. Biotechnological tools for enhancing microbial solubilization of insoluble inorganic phosphates. **Geomicrobiol Journal**, Abingdon, v. 31, n. 9, p. 751-763, 2014.

VASSILEVA, M.; SERRANO, M.; BRAVO, V.; JURADO, E.; NIKOLAEVA, I.; MARTOS, V.; VASSILEV, N. Multifunctional properties of phosphate-solubilizing microorganisms grown on agro-industrial wastes in fermentation and soil conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Philadelphia, v. 85, n. 5, p. 1287-99, 2010.

Circular Técnica, 50

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Solos
Endereço: Rua Jardim Botânico, 1024. Bairro Jardim Botânico, 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 (2017)

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Solos
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Comitê de publicações

Presidente: José Carlos Polidoro
Secretário-Executivo: 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 S. Rezende Mattos
Revisão de texto: Marcos Antônio Nakayama
Editoração eletrônica: Moema de A. Batista
Normalização: Enyomara Lourenço Silva