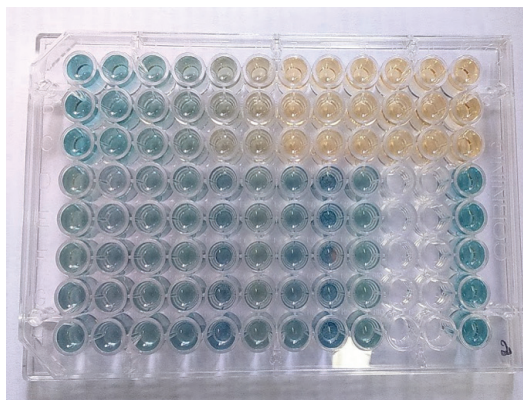
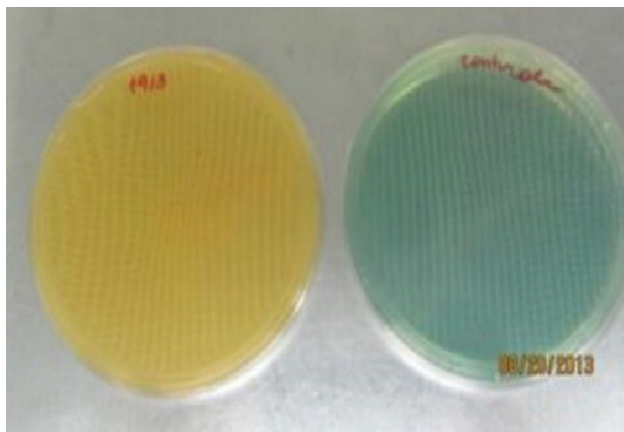


Potencial de Microrganismos Rizosféricos e Endofíticos de Milho em Solubilizar o Fosfato de Ferro e Produzir Sideróforos



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
166**

**Potencial de Microrganismos Rizosféricos
e Endofíticos de Milho em Solubilizar o
Fosfato de Ferro e Produzir Sideróforos**

Fernanda de Cássia Batista
Thabata Alvares Fernandes
Crisia Santos de Abreu
Maycon Campos de Oliveira
Vitória Palhares Ribeiro
Eliane Aparecida Gomes
Ubiraci Gomes de Paula Lana
Ivanildo Evódio Marriel
Christiane Abreu de Oliveira Paiva

***Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2018***

Esta publicação está disponível no endereço:

<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
www.embrapa.br/fale-conosco/sa

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Sidney Netto Parentoni

Secretário-Executivo
Elena Charlotte Landau

Membros
*Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia
Maria Borges Damasceno, Maria Lúcia
Ferreira Simeone, Roberto dos Santos
Trindade e Rosângela Lacerda de Castro*

Revisão de texto
Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica
Rosângela Lacerda de Castro (CRB 6/2749)

Tratamento das ilustrações
Tânia Mara Assunção Barbosa

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Tânia Mara Assunção Barbosa

Foto da capa
*Vitória Palhares Ribeiro (2015)
Fernanda de Cássia Batista (2017)*

1ª edição
Formato digital (2018)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Nome da unidade catalogadora

Potencial de microrganismos rizosféricos e endofíticos de milho em solubilizar o
fosfato de ferro e produzir sideróforos / Fernanda de Cássia Batista ... [et al.].
– Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2018.
21 p. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo,
ISSN 1679-0154; 166).

1. Microbiologia do solo. 2. Bactéria. 3. Inoculante. 4. Solubilização. I. Batista,
Fernanda de Cássia. II. Fernandes, Thabata Álvares. III. Abreu, Crisia Santos de.
IV. Oliveira, Maycon Campos de. V. Ribeiro, Vitória Palhares. VI. Gomes, Eliane
Aparecida. VII. Lana, Ubiraci Gomes de Paula. VIII. Marriel, Ivaniildo Evódio. IX.
Paiva, Christiane Abreu de Oliveira. X. Série.

CDD 631.46 (21. ed.)

Sumário

Resumo4

Abstract6

Introdução.....8

Material e Métodos9

Resultados e Discussão11

Conclusões.....17

Agradecimentos.....17

Referências17

Potencial de Microrganismos Rizosféricos e Endofíticos de Milho em Solubilizar o Fosfato de Ferro e Produzir Sideróforos

Fernanda de Cássia Batista¹

Thabata Alvares Fernandes²

Crisia Santos de Abreu³

Maycon Campos de Oliveira⁴

Vitória Palhares Ribeiro⁵

Eliane Aparecida Gomes⁶

Ubiraci Gomes de Paula Lana⁷

Ivanildo Evódio Marriel⁸

Christiane Abreu de Oliveira Paiva⁹

Resumo – Os solos tropicais das áreas agrícolas do Brasil geralmente apresentam condição ácida e predomínio de fosfato de ferro (P-Fe), o que resulta em baixa disponibilidade de fósforo (P) para as plantas e reduz a produtividade das culturas. Para suprir essa carência é necessária a aplicação de grandes quantidades de fertilizantes fosfatados. Alternativamente, alguns microrganismos presentes no solo ou que habitam o interior das

¹ Acadêmica de Engenharia Ambiental, Centro Universitário de Sete Lagoas (UNIFEMM) - Sete Lagoas, MG.

² Acadêmica de Engenharia Ambiental, Centro Universitário de Sete Lagoas (UNIFEMM) - Sete Lagoas, MG.

³ Mestrado em Ciências Agrárias/UFSJ, doutoranda em Microbiologia/UFGM, Belo Horizonte, MG.

⁴ Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica)/USP, Analista B Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

⁵ Graduada em Ciências Biológicas (Licenciatura), Mestranda em Bioengenharia Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

⁶ Bióloga, D.Sc. em Genética, Pesquisadora em Microbiologia na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

⁷ Químico, D.Sc. em Genética, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

⁸ Eng.-Agrôn., D.Sc. em Biologia Celular, Pesquisador em Microbiologia da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG

⁹ Eng.-Agrôn., D.Sc. em Biologia Vegetal, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

plantas são capazes de solubilizar formas não disponíveis de P, como os P-Fe. Neste caso, pouco se conhece sobre os mecanismos envolvidos na solubilização do fosfato de ferro e quais seriam as substâncias produzidas pelos microrganismos neste processo. Existem pesquisas que indicam os ácidos orgânicos e os sideróforos, que são moléculas orgânicas de baixo peso molecular com altíssima afinidade por ferro. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial de rizobactérias e endofíticos na solubilização de fosfato de ferro (P-Fe) e quantificar sua produção de sideróforos, visando obter isolados eficientes para utilização futura como inoculantes na agricultura. Foram reativados em meio BDA a 28 °C, trinta isolados de microrganismos mantidos na Coleção de Microrganismo Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF). Os microrganismos foram avaliados quanto à capacidade de solubilização de fosfatos em meio de cultura líquido contendo fosfato de ferro, e também tiveram sua produção de sideróforos quantificada. Os isolados mais eficientes na solubilização de fosfato de ferro foram as bactérias B1924 (*Klebsiella pneumoniae*), B1917 (*Enterobacter*) e B1926 (bactéria não identificada) que solubilizaram entre 231,72 mg P. L⁻¹ a 182,58 mg P. L⁻¹ e promoveram uma variação do pH do meio de 6,80 para 3,96; 6,80 para 4,04; 6,80 para 4,38, respectivamente. Esta variação do pH do meio indica que pode ter ocorrido a produção de ácidos orgânicos como o principal mecanismo de solubilização de P. A maior produção de sideróforos foi obtida utilizando um tempo de cultivo de 72 h, com destaque para as bactérias B1928 (*Burkholderia gladioli*), B2081 (*Bacillus cereus*), B2106 (*Bacillus megaterium*) e B2103 (*Pantoea ananatis*) que produziram mais de 20 µM de sideróforos neste tempo de cultivo. E 82% dos isolados que solubilizaram o P-Fe produziram sideróforos. Estas rizobactérias e microrganismos endofíticos são potenciais candidatos para serem utilizados em experimentos futuros de campo e casa de vegetação, visando uma maior absorção de fosfato pela cultura de milho em solos tropicais com altas concentrações de fosfato de ferro.

Termos para indexação: biossolubilização de fósforo, inoculantes, mecanismos de solubilização de fosfato ferro

Potential of Rhizospheric and Endophytic Corn Microorganisms in Solubilizing Iron Phosphate and Producing Siderophores

Abstract – Brazilian tropical soils usually present acidic condition and predominance of iron phosphate (Fe_3PO_4), which results in low availability of phosphorus (P) for the plants and reduces crops productivity. As a result, large quantities of phosphate fertilizers are normally used to increase P availability in the soil. Alternatively, some rhizosphere and endophytic microorganisms are able to solubilize insoluble forms of P. These microorganisms may solubilize iron phosphate, for example, by the production of siderophores, which are low molecular weight organic compounds having high affinity for iron. The aim of this study was to assay the siderophores production and iron phosphate solubilization by rhizobacteria and endophytic microorganisms, in order to obtain efficient P-solubilizing isolates to be applied as biofertilizers in agriculture. Thirty isolates of microorganisms from the Embrapa Milho e Sorgo institutional culture collection (CMMF – Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos) were activated by plating on potato dextrose agar (PDA) and incubated at 30 °C for 1-2 days. Soluble phosphate was determined in the supernatant after growth in liquid culture containing iron phosphate as unique source of P. Siderophores production was estimated by the Chrome Azurol S (CAS) liquid assay after growth in TSB at 30 °C for 72h. The most efficient strains in solubilizing iron phosphate were B1924 (*Klebsiella pneumoniae*), B1917 (*Enterobacter*) and B1926 (unidentified bacteria). The amount of P solubilized by these strains varied from 231,7 mgP.L⁻¹ to 182,58 mgP.L⁻¹ and the P solubilization was coupled with a decrease in pH values. The highest production of siderophores occurred after 72h of culture, where more than 20 µM siderophores were estimated for the isolates B1928 (*Burkholderia gladioli*), B2081 (*Bacillus cereus*), B2106 (*Bacillus megaterium*) and B2103 (*Pantoea ananatis*). Although the isolate B1924 showed both high P solubilization and siderophores production, in generally, there was no significant correlation between iron phosphate solubilization and siderophores production. The rizobacterias and endophytic microorganisms reported in this study represent potential candidates for biofertilizers development. However,

greenhouse and field experiments are needed to test whether, in fact, these microorganisms can contribute to phosphate uptake by.

Index terms: Siderophores; Rizobacterias; Solubilization of iron phosphate

Introdução

Os solos tropicais das áreas agrícolas do Brasil geralmente apresentam condições ácidas e predomínio de fosfato de ferro (P-Fe), o que resulta em baixa disponibilidade de fósforo (P) para satisfazer as necessidades das plantas (Novais; Smyth, 1999). A baixa disponibilidade deste nutriente no solo é um dos fatores que mais comprometem o crescimento dos vegetais (Barroso; Nahas, 2005). Com intuito de minimizar este problema, é necessária a aplicação de elevadas quantidades de fertilizantes fosfatados, método que onera os custos de produção, comprometendo a sustentabilidade e competitividade do agronegócio brasileiro (Rodrigues et al., 2015). Além disso, a maioria dos fertilizantes fosfatados, como os superfosfatos ou fosfatos de amônio, é obtida quimicamente a partir de rocha de fosfato extraída em minas, que envolve gastos significativos de energia provenientes de fontes não renováveis para seu processamento, seu transporte e sua distribuição. Por isso, tem-se buscado estratégias alternativas para o aumento da eficiência da adubação fosfatada do solo (Khan et al., 2010).

No solo, o P pode ser encontrado na forma orgânica e forma inorgânica em rochas e fosfatos precipitados no solo (Souza et al., 2004). O P é um elemento subordinado a inúmeros processos biogeoquímicos que alteram sua disponibilidade. Dentre esses processos destaca-se a dissolução de fosfatos, que o torna disponível para as plantas (Whitelaw, 2000; Goldstein et al., 2003; Oliveira et al., 2009). Os microrganismos encontrados na rizosfera e os endofíticos como Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCP) têm despertado interesse entre os pesquisadores, uma vez que podem promover o crescimento das plantas (Araújo et al., 2000; Rosenblueth; Martinez-Romero, 2006; Hamayun et al., 2009; Montañez et al., 2012), através de mecanismos como fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato inorgânico, produção de fito-hormônios e sideróforos (Shahab et al., 2009; Vasconcellos et al., 2010).

As bactérias solubilizadoras de fosfato contribuem ativamente no ciclo do fósforo, aumentando assim a biodisponibilidade deste elemento para absorção pelas plantas (Mardad et al., 2013). Os microrganismos utilizam mecanismos diferentes para converter formas pouco solúveis de fosfato em solúveis, como processos de acidificação, quelação e reações de troca, mas o mecanismo fundamental de solubilização é a liberação de metabólitos como

os ácidos orgânicos (Hameeda et al., 2008; Young et al., 2013). Os ácidos orgânicos secretados pelos microrganismos podem dissolver diretamente os metais dos fosfatos, que atuam como agentes quelantes liberando fosfato solúvel ou podem reduzir o pH do meio (Salih et al., 1989; Nahas, 1991) para a solução do solo (Whitelaw, 2000).

Outro mecanismo provável de solubilização de P é a produção de sideróforos. Os sideróforos são compostos do metabolismo secundário produzidos por algumas espécies de microrganismos, cuja função principal é complexar metais, em especial ferro em estado insolúvel. Existem relatos de microrganismos do solo que solubilizam formas não disponíveis de P fixado em moléculas de ferro por meio da utilização de sideróforos (Sharma et al., 2013; Santos et al., 2014). Além da captação de P complexado a Fe no solo, estas substâncias orgânicas também podem atuar no biocontrole de patógenos (Barroso; Nahas, 2005). No entanto, pouco se conhece sobre a participação desta substância como mecanismo de solubilização dos fosfatos de ferro.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial biotecnológico de rizobactérias e endofíticas na solubilização de fosfato de ferro (P-Fe) e quantificar a produção de sideróforos, visando entender os mecanismos envolvidos na biossolubilização deste fosfato e obter isolados eficientes para utilização como inoculantes na agricultura.

Material e Métodos

Foram utilizados trinta microrganismos rizosféricos e endofíticos de milho, mantidos na Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF) e avaliados previamente quanto a solubilização de fosfato de cálcio e identificados geneticamente (Oliveira et al., 2009; Abreu et al., 2017; Ribeiro et al., 2015). Os microrganismos foram reativados em meio de cultura BDA a uma temperatura de 28 °C.

Eficiência de rizobactérias e microrganismos endofíticos solubilizadoras de fosfato de ferro em meio líquido

As culturas reativadas foram incubadas em meio TSB (*Trypticase Soy Broth*) por 4 dias a 28 °C e sob agitação constante de 96 rpm. Após esse período, a turbidez de cada cultura foi ajustada para uma unidade de densidade ótica a 540 nm.

Alíquotas de 100 µL de cada suspensão de células padronizadas foram transferidas para um tubo falcon de 50 ml contendo 20 ml de meio NBRIP líquido, contendo fosfato de ferro como única fonte de P e com modificações na concentração de glicose para 40 g/L⁻¹. Após o período de incubação de (0,3,6 e 9 dias), sob agitação, a 30 °C de temperatura, determinou-se o pH do meio e os teores de P liberado no sobrenadante. Para a determinação do P solúvel, as amostras foram centrifugadas (5.000 xg x 10 minutos), o sobrenadante foi filtrado por um papel filtro Whatman nº 42 e o P solúvel do sobrenadante foi quantificado em espectrofotômetro com o comprimento de onda de 725 nm, utilizando o método colorimétrico de Murphy e Riley (1962).

Eficiência de rizobactérias e microrganismos endofíticos produtores de sideróforos

Os microrganismos foram reativados em BDA e crescidos por 72 horas a 28 °C. Posteriormente foram preparadas suspensões bacterianas com uma densidade ótica igual a 0,5 (DO = 0,5 a 540 nm) em solução salina 0,85%. Os ensaios de quantificação de sideróforos foram realizados em microplacas de 96 poços. Vinte microlitros de cada suspensão bacteriana foram inoculados (com três repetições) em 1 mL de meio de cultura caldo nutriente (Nutrient Broth). As placas foram incubadas por tempos diferentes (24 h, 48 h e 72 h) a 28 °C, sob agitação de 200 rpm.

Após cada intervalo de tempo, as placas foram centrifugadas durante 10 minutos a 6.000 rpm e 150 µL do sobrenadante de cada cultura foram coletados e transferidos para outra microplaca onde se acrescentaram 150 µL do reagente CAS (Schwyn; Neilands, 1987), como descrito a seguir: 1,2 g/L cromo azurol; 0,27g/L cloreto de ferro III (FeCl₃.6H₂O) diluído em 0,84 mL/L de HCl; 0,876 g/L brometo de cetil trimetil amônio (CTAB) e 23,6g/L tampão succinato de sódio com pH-5,6; modificado por (Pérez-Miranda et

al., 2007). Após um período de 20 minutos, as microplacas foram analisadas utilizando-se um espectrofotômetro (630 nm).

A quantidade de sideróforos produzida por cada cultura foi estimada por meio da utilização de uma curva padrão contendo 0 a 30 μM de EDTA. Como controle, foram utilizados meios de culturas sem inóculo. Toda as vidrarias utilizadas nas análises de produção de sideróforos foram tratadas com ácido HCl 6 M para a remoção de resíduo de ferro.

Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados segundo o delineamento inteiramente casualizado com três repetições por amostras, sendo submetidos à análise de variância utilizando-se o programa Sisvar 5.3 (Ferreira, 2010) e, quando ocorreu diferença significativas pelo teste F ($p \leq 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As análises de correlação de Pearson foram realizadas utilizando o programa EXCEL a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Ocorreu diferença significativa ($p < 0,05$) na solubilização de fósforo dos microrganismos testados em meio de cultura líquido contendo como única fonte de P o fosfato de ferro. Dentre as 30 estirpes avaliadas, as bactérias B1924 (*Klebsiella pneumoniae*), B1917 (*Enterobacter*) e B1926 (bactéria não identificada) apresentaram os maiores valores da liberação total de P solúvel aos 9 dias de cultivo, que variou de 182 a 232 mg de P.L^{-1} (Figura 1).

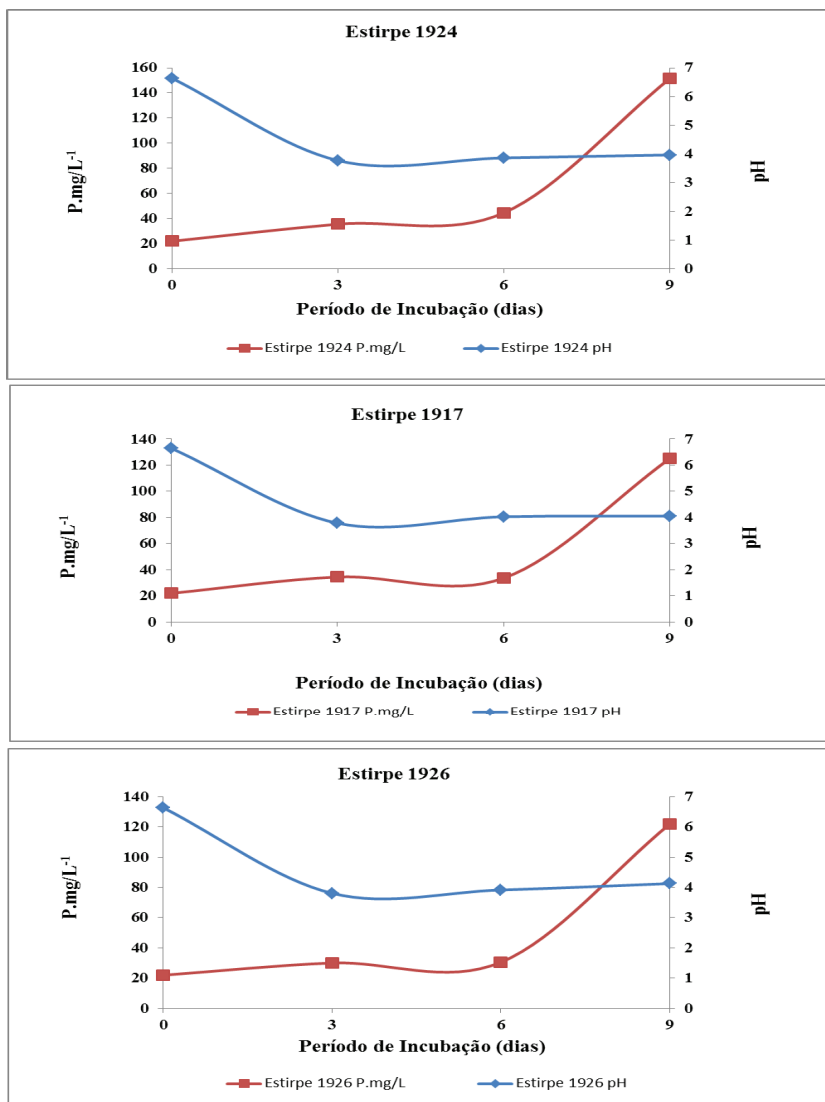


Figura 1. Evolução da solubilização de fósforo (mg.L^{-1}) e pH pelas bactérias 1924, 1917 e 1926 aos 3, 6 e 9 dias de crescimento em meio de cultura líquido contendo fosfato de ferro. Estas bactérias foram as mais eficientes na solubilização de P-Fe.

Observou-se redução significativa ($p < 0,05$) para os valores de pH entre os microrganismos testados aos 9 dias de cultivo (Tabela 1).

Tabela1. Identificação molecular, quantidade de fósforo liberado (mg. L⁻¹) no tempo, pH final do meio de cultura e produção de sideróforos por bactérias endofíticas e rizobactérias de milho

Estirpe	Identificação Genética (%)	3 Dias			6 Dias			9 Dias			Total	
		P-Fe (mg. L ⁻¹) [†]	pH	P-Fe (mg. L ⁻¹) [†]	pH	P-Fe (mg. L ⁻¹) [†]	pH	P-Fe (mg. L ⁻¹) [†]	pH	P-Fe (mg. L ⁻¹) [†]	Sideróforos (µM) 72h	
Controle	-	7,91 b	6,64 b	6,11 b	6,56 c	7,61 b	5,17 a	21,94 b	0,56 a			
1915	<i>Bacillus pumilus</i> (99)	21,27 e	3,83 a	23,77 d	3,90 b	47,14 g	3,71 a	92,18 g	11,84 d			
1917	<i>Enterobacter</i> (99)	34,40 h	3,77 a	33,53 e	4,02 b	124,95 l	4,04 a	192,88 j	9,76 d			
1918	<i>Bacillus subtilis</i> (99)	9,63 b	3,62 a	11,06 c	3,28 a	29,02 e	3,32 a	46,47 d	7,45 c			
1920	<i>Bacillus subtilis</i> (100)	2,23 a	3,84 a	1,23 a	3,83 b	1,34 a	3,87 a	4,96 a	-			
1923	<i>Bacillus pumilus</i> (99)	44,36 i	3,86 a	40,21 e	4,09 b	46,08 g	3,90 a	130,66 h	0,62 a			
1924	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (99)	35,56 h	3,77 a	44,60 f	3,86 b	151,56 m	3,96 a	231,72 k	10,03 d			
1926	<i>Uncultured bacteria</i> (100)	30,04 g	3,81 a	30,53 e	3,91 b	122,01 l	4,13 a	182,58 i	0,66 a			
1928	<i>Burkholderia gladioli</i> (99)	17,99 e	3,61 a	24,43 d	3,84 b	38,48 f	3,76 a	80,91 f	24,75 g			
1931	<i>Pantoea ananatis</i> (99)	15,54 d	3,74 a	16,41 c	3,82 b	63,69 i	3,68 a	95,63 g	6,49 c			
1932	<i>Pantoea ananatis</i> (99)	1,94 a	3,48 a	1,07 a	3,66 b	0,66 a	3,60 a	3,68 a	11,24 d			
1935	<i>Bacillus subtilis</i> (99)	12,55 c	3,70 a	13,32 c	4,36 b	54,40 h	4,38 a	80,27 f	9,24 d			
1982	<i>Bacillus subtilis</i> (99)	4,16 a	3,70 a	1,62 a	3,96 b	1,73 a	3,91 a	7,51 a	0,69 a			
2008	<i>Pantoea ananatis</i> (100)	18,08 e	3,59 a	22,33 d	3,87 b	84,58 j	3,89 a	124,99 h	1,49 a			
2009	<i>Bacillus subtilis</i> (99)	1,73 a	2,98 a	7,28 b	3,15 b	6,97 b	3,49 a	15,97 b	12,11 c			
2081	<i>Bacillus thuringiensis</i> (99)	17,30 e	3,63 a	22,54 d	3,80 b	91,84 k	3,80 a	131,68 h	23,01 g			
2084	<i>Bacillus subtilis</i> (99)	12,56 c	3,60 a	13,69 c	3,64 b	57,33 h	3,70 a	83,58 f	0,59 a			
2088	<i>Bacillus subtilis</i> (99)	12,66 c	3,86 a	46,12 f	3,93 b	36,15 f	4,02 a	94,94 g	9,79 d			
2096	<i>Pseudomonas</i> sp. (99)	14,83 d	3,60 a	12,26 c	3,80 b	12,89 c	3,77 a	39,98 c	3,51 b			

Tabela1 cont. Identificação molecular, quantidade de fósforo liberado (mg. L⁻¹) no tempo, pH final do meio de cultura e produção de sideróforos por bactérias endofíticas e rizobactérias de milho

Estirpe	Identificação Genética (%)	3 Dias		6 Dias		9 Dias		Total	
		P-Fe (mg. L ⁻¹) [†]	pH	P-Fe (mg. L ⁻¹) [†]	pH	P-Fe (mg. L ⁻¹) [†]	pH	P-Fe (mg. L ⁻¹) [†]	Sideróforos (µM) 72h
2097	Uncultured bacteria (99)	0,34 a	4,07 a	0,00 a	4,00 b	0,00 a	4,01 a	0,34 a	9,17 d
2099	Bacillus subtilis (99)	17,88 e	3,72 a	25,42 d	3,74 b	87,30 j	3,75 a	130,60 i	5,74 c
2106	Bacillus megaterium (95)	23,47 f	4,78 a	31,90 e	3,78 b	37,69 f	3,91 a	93,06 g	25,69 g
2109	Uncultured bacteria (99)	19,31 e	3,63 a	24,31 d	3,80 b	57,03 h	3,71 a	100,65 g	15,81 f
2112	Serratia marcescens (99)	12,12 c	3,87 a	15,81 c	3,53 b	20,46 d	3,60 a	48,39 d	14,28 e
B32	Bacillus pumilus	5,58 b	3,72 a	13,32 c	3,72 b	52,69 h	3,42 a	71,59 e	10,32 c
B70	Bacillus sp	0,00 a	3,29 a	1,57 a	3,26 a	13,82 c	3,25 a	15,40 b	16,82 f
B119	Bacillus megaterium	8,47 b	3,78 a	9,99 c	3,86 b	21,07 d	4,00 a	39,52 c	8,130d

Médias seguidas da mesma letra, para cada parâmetro, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Somatória do valor absoluto de P solubilizado pelos microrganismos durante 9 dias de incubação.

Verificou-se que, para as três estirpes mais eficientes na solubilização de P, houve uma redução significativa de pH, sugerindo a produção e liberação de ácidos, como mecanismo de solubilização do fosfato de ferro. Ao final da incubação, houve uma variação do pH de 6,80 para 3,96; 6,80 para 4,04; 6,80 para 4,38 nos cultivos com as bactérias B1924, B1917 e B1926, respectivamente. Alguns autores relatam que um dos mecanismos desenvolvidos pelos microrganismos solubilizadores de P é liberar metabólitos capazes de acidificar o meio de cultivo (Richardson et al., 2001). Entretanto, neste estudo, para todos os isolados testados, não foi observada correlação (Pearson, $p > 0,05$) entre a liberação de fósforo e os valores de pH. Esses resultados também foram encontrados em outros trabalhos (Barroso; Nahas, 2005), em se avaliaram a solubilização de P-Fe e a correlação com o abaixamento do pH. Neste caso, outros mecanismos podem estar envolvidos na solubilização do P-Fe e ou abaixamento do pH.

Considera-se que substâncias orgânicas liberadas por microrganismos podem de forma indireta reduzir a adsorção de fósforo às partículas do solo, disponibilizando o fosfato solúvel para as raízes (Barroso; Nahas, 2005). Neste trabalho, foi investigada a produção de sideróforos em relação à solubilização de fosfato de ferro dos isolados. Os sideróforos são peptídeos de síntese não ribossômica produzidos por microrganismos, que apresentam altíssima afinidade por ferro (Simionato et al., 2010; Benite et al., 2012). Ao quelarem o ferro, o fósforo ficaria disponível para as plantas. A produção de sideróforos pelos microrganismos solubilizadores de fosfato variou significativamente entre os isolados, sendo que 77% dos isolados apresentaram produção significativamente superior ao controle sem microrganismos e, 18 isolados (82%), dentre os 22 que solubilizaram o P-Fe, produziram sideróforos. Em trabalhos de Ghosh et al. (2016), também ocorreu alta produção de sideróforos por três estirpes de *Burkholderia* que solubilizaram fosfato, quando o fosfato de ferro era a única fonte de P. Entretanto, neste trabalho, não ocorreu correlação significativa entre a solubilização de P e a maior produção de sideróforos ($r = 0,203$).

Para todos os isolados, a maior produção de sideróforos ocorreu após 72 horas de cultivo (Figura 2, Tabela 1). Dos 30 microrganismos avaliados para a produção de sideróforos, após 72 horas de cultivo, observou-se que os mais eficientes nessas características foram as estirpes B2081 (*Bacillus cereus*), B1928 (*Burkholderia gladioli*), B2106 (*Bacillus megaterium*) e B2103

(*Pantoea ananatis*) com uma produção de sideróforos de 23,02; 24,75; 25,70 e 29,16 μM , respectivamente (Figura 3). Estes resultados delimitam o potencial desses microrganismos endofíticos para a aplicação biotecnológica e/ou uso como bioinoculantes na agricultura, por apresentarem mais de uma característica desejável para o incremento da bioassolubilização de fósforo. Além disso, produzir substâncias quelantes de ferro endogenamente à planta, ou seja, em ambiente protegido como o interior da planta, pode ser uma vantagem, visto que estas substâncias podem ser exsudadas via raiz em condição de estresse mineral, facilitando a dissolução e absorção de P do solo, na região rizosférica da planta.

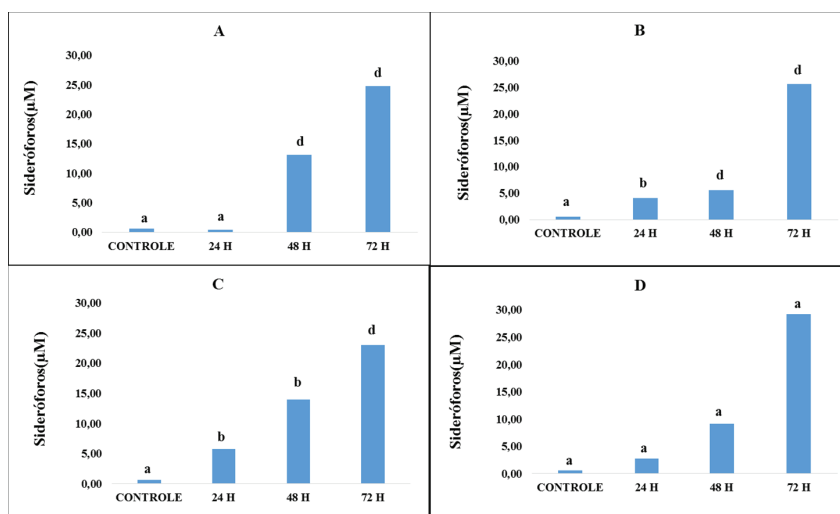


Figura 2. Média da produção de sideróforos (μM) pelas bactérias A (1928), B (2081), C (2106) e D (2103) (maiores produtoras) nos intervalos de tempo de 24, 48 e 72 horas em relação ao controle sem microrganismos. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knot, $p > 0,05$.

Neste trabalho foi possível selecionar alguns microrganismos solubilizadores de P-Fe e produtores de sideróforos para estudos posteriores na planta em condições controladas e em campo, visando a seleção de microrganismos para a produção de bioinoculantes que garantam uma maior absorção de fosfato pela cultura de milho em solos tropicais, onde os solos apresentam altas concentrações de fosfato de ferro.

Conclusão

Os microrganismos testados, provenientes da rizosfera e da microbiota endofítica de milho, apresentam variações quanto a sua capacidade de solubilização de fosfato de ferro e produção de sideróforos.

As estirpes B1924, B1917 e B1926 apresentaram maior potencial solubilizador de fosfato de ferro. As estirpes B1928, B2106 e B2103 foram as mais eficientes para a produção de sideróforos. E 82% dos isolados que solubilizaram o P-Fe produziram sideróforos.

Agradecimentos

À Fapemig, pelo financiamento do projeto, ao CNPq (MPCPAgro CNPq 465133/2014-4, Fundação Araucária-STI, Capes) e à Embrapa.

Referências

- ABREU, C. S. de; FIGUEIREDO, J. E. F.; OLIVEIRA, C. A.; SANTOS, V. L. dos; GOMES, E. A.; RIBEIRO, V. P.; BARROS, B. de A.; LANA, U. G. de P.; MARRIEL, I. E. Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 16, n. 1, p. 1-13, 2017.
- ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. C.; AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 43, p. 447-451, 2000.
- BARROSO, C. B.; NAHAS, E. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 29, p. 73-83, 2005.
- BENITE, A. M.; MACHADO, S. P.; MACHADO, B. C. Sideróforos: uma resposta dos microrganismos. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6B, p. 1155-1164, 2002.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR - Sistema de análise de variância**: versão 5.3. Lavras: UFLA, 2010.

GOLDSTEIN, A.; LESTER, T.; BROWN, J. Research on the metabolic engineering of the direct oxidation pathway for extraction of phosphate from ore has generated preliminary evidence for PQQ biosynthesis in *Escherichia coli* as well as a possible role for the highly conserved region of quinoprotein dehydrogenases. **Biochemistry et Biophysics Acta**, Amsterdam, v. 1647, p. 266-271, 2003.

GHOSH, R.; BARMAN, S.; MUKHERJEE, R.; MANDAL, N. C. Role of phosphate solubilizing *Burkholderia* spp. for successful colonization and growth promotion of *Lycopodium cernuum* L. (Lycopodiaceae) in lateritic belt of Birbhum district of West Bengal, India. **Microbiological Research**, Jena, v. 183, p. 80-91, 2016.

HAMAYUN, M.; KHAN, S. A.; KIM, H. Y.; CHAUDHARY, M. F.; HWANG, Y. H.; SHIN, D. H.; KIM, I. K.; LEE, B. H.; LEE, I. J. Gibberellin production and plant growth enhancement by newly isolated strain of *Scolecobasidium tshawytschae*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 19, n. 6, p. 560-565, 2009.

HAMEEDA, B.; HARINI, G.; RUPELA, O. P.; WANI, S. P.; REDDY, G. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. **Microbiological Research**, Jena, v. 163, n. 2, p. 234-242, 2008.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; AHMED, M.; OVES, M.; WANI, P. A. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi: current perspective. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 56, n. 1, p. 73-98, 2010.

MARDAD, I.; SERRANO, A.; SOUKRI, A. Solubilization of inorganic phosphate and production of organic acids by bacteria isolated from a moroccan mineral phosphate deposit. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 8, p. 626-635, 2013.

MONTAÑEZ, A.; BLANCO, A. R.; BARLOCCO, C.; BERACOCHEA, M.; SICARDI, M. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 58, p. 21-28, 2012.

MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 27, p. 31-36, 1962.

NAHAS, E. **Ciclo do fósforo**: transformações microbianas. Jaboticabal: FUNEP, 1991. 67 p.

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 399 p.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. 40 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 161).

OLIVEIRA, C. A.; ALVES, V. M.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; MUZZI, M. R. S.; CARNEIRO, N. P.; GUIMARÃES, 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**, Elmsford, v. 41, p. 1782-1787, 2009.

PÉREZ-MIRANDA, S.; CABIROL, N.; GEORGE-TÉLLEZ, R.; ZAMUDIO-RIVERA, L. S.; FERNÁNDEZ, F. J. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 70, p. 127-131, 2007.

RIBEIRO, V. P.; GOMES, E. A.; MARRIEL, I. E.; ABREU, C. S. de; LANA, U. G. de P.; PAIVA, C. A. O. **Potencial biotecnológico de bactérias endofíticas de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2015. 27 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 132).

RICHARDSON, A. E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 28, p. 897-906, 2001.

RODRIGUES, R. B.; OZORIO, L. M.; PINTO, C. L. B.; BRANDÃO, L. E. T. Opção de troca de produto na indústria de fertilizantes. **Revista de Administração**, São Paulo, v. 50, n. 2, p. 129-140, 2015.

ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, p. 827-837, 2006.

SANTOS, S.; NETO, I. F. F.; MACHADO, M. D.; SOARES, H. M. V. M.; SOARES, E. V. Siderophore production by *Bacillus megaterium*: effect of growth phase and cultural conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 172, p. 549-560, 2014.

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.

SHARMA, S. B.; SAYYED, R. Z.; TRIVEDI, M. H.; GOBI, T. A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus**, v. 2, p. 587, 2013.

SCHWYN, B.; NEILANDS, B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 160, p. 46-56, 1987.

SHAHAB, S.; AHMED, N.; KHAN, N. S. Indole acetic acid production and enhanced plant growth promotion by indigenous PSBs. **African Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 11, p. 1312-1316, 2009.

SIMIONATO, A. V. C.; SILVA-STENICO, M. S.; TSAI, S. M.; CARRILHO, E. Evidences of siderophores synthesis by grapevine *Xylella fastidiosa*, causal agent of pierce's disease, through instrumental approaches. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 21, p. 635-641, 2010.

SOUZA, D. M. G. de; LOBATO, E.; REIN, T. A. Adubação com fósforo. In: SOUZA, D. M. G.; LOBATO, E. (Ed.). **Cerrado: correção do solo e adubação**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 147-168.

VASCONCELLOS, R. L. F.; SILVA, M. C. P.; RIBEIRO, C. M.; CARDOSO, E. J. B. N. Isolation and screening for plant growth-promoting (PG) actinobacteria from araucaria angustifolia Rhizosphere Soil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 67, n. 6, p. 743-746, 2010.

WHITELAW, M. A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 69, p. 99-151, 2000.

YOUNG, L. S.; HAMEED, A.; PENG, S. Y.; SHAN, Y. H.; WU, S. P. Endophytic establishment of the soil isolate Burkholderia sp. CC-A174 enhances growth

and P-utilization rate in maize (*Zea mays* L.). **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 66, p. 40-47, 2013.



Milho e Sorgo

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

Governo
Federal