

Rio de Janeiro, RJ / Maio, 2024

Ajustes metodológicos para avaliação *in vitro* da bio-solubilização de rochas potássicas por diferentes espécies de bactérias associadas a plantas de interesse agrônomo

Carolina Nachi Rossi⁽¹⁾, Sandy Sampaio Videira⁽²⁾, Patricia de Medeiros Gitahy⁽¹⁾, Marcia Soares Vidal⁽³⁾ e José Ivo Baldani⁽³⁾

⁽¹⁾ Analista da Embrapa Agrobiologia, BR465, km 7, CEP 23891-000, Seropédica/RJ. E-mails: carolina.rossi@embrapa.br; patricia.gitahy@embrapa.br. ⁽²⁾ Pós-doutora do Centro de Tecnologia Mineral (CETEM), Avenida Pedro Calmon, n° 900, Cidade Universitária da Universidade Federal do Rio de Janeiro, CEP 21941-908, Rio de Janeiro/RJ. E-mail: sandyvideira@yahoo.com.br. ⁽³⁾ Pesquisador(a) da Embrapa Agrobiologia, BR465, km 7, CEP 23891-000, Seropédica/RJ. E-mails: marcia.vidal@embrapa.br; ivo.baldani@embrapa.br.

Embrapa Agrobiologia
Rodovia BR 465, km 7
CEP 23891-000 Seropédica, RJ
Caixa Postal 74.505
Fone: (21) 3441-1500
Fax: (21) 2682-1230
www.embrapa.br/agrobiologia
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente

Bruno José Rodrigues Alves

Secretário-executivo

Carmelita do Espírito Santo

Membros

Cláudia Pozzi Jantalia,
Janaina Ribeiro Costa Rouws,
Luc Felicianus Marie Rouws,
Luis Cláudio Marques de Oliveira,
Luiz Fernando Duarte de Moraes,
Márcia Reed Rodrigues Coelho,
Marta dos Santos Freire Ricci de
Azevedo e Nátia Élen Auras

Edição executiva

Cláudia Pozzi Jantalia

Revisão de texto

Luis Cláudio Marques de Oliveira

Normalização bibliográfica

Carmelita do Espírito Santo

(CRB-7/5043)

Projeto gráfico

Leandro Sousa Fazio

Diagramação

Maria Christine Saraiva Barbosa

Publicação digital: PDF

Todos os direitos reservados à Embrapa.

Resumo – Existem diversos meios de cultivo para avaliar e selecionar microrganismos solubilizadores de rochas potássicas em condições *in vitro*. Apesar de terem a sua composição modificada ao longo dos anos para aumentar a eficiência da triagem e diminuição do tempo de detecção da solubilização do K pelos microrganismos, o método de ensaio em placa ainda apresenta algumas limitações e muita variabilidade, principalmente quando a formação do halo é discreta ou ausente. Nesse sentido, o presente estudo propôs ajustes metodológicos nos meios de cultivo para a avaliação mais precisa da bio-solubilização de rochas potássicas com base em diferentes espécies de bactérias de importância agrônoma. Foram avaliadas estirpes de 11 espécies bacterianas Gram positivas e negativas nos meios de cultivo Aleksandrov, Basak e Biswas e MISK na presença de quatro pós de rocha. O meio de cultivo Basak e Biswas modificado (B&B) foi aquele que proporcionou melhor nitidez para a visualização dos halos e menor variabilidade nos testes após os ajustes sucessivos realizados. Os resultados mostraram variação na capacidade de solubilização de potássio com estirpes apresentando ausência de crescimento, crescimento, mas ausência de halo de solubilização, crescimento e de halo fraco de solubilização e, crescimento e halo de solubilização proeminentes. Duas estirpes (Ppe8 = BR 11366 e T8 = BR 15417) apresentaram halos proeminentes nas placas e, portanto, foram utilizadas para quantificar o K bio-solubilizado após o cultivo das bactérias por 35 dias em meio B&B líquido modificado na presença dos quatro pós de rocha. A estirpe Ppe8 se destacou e foi capaz de sobreviver até os 35 dias de incubação, com poucas alterações no pH do meio e proporcionou aumento nos teores de K quando cultivada na presença do pó de rocha da amostra 3. A estirpe foi novamente testada para a validação da metodologia e os resultados confirmaram o potencial da estirpe em solubilizar a rocha potássica. Baseado nesse resultado, sugerimos o meio B&B (Basak; Biswas, 2010) modificado em sua composição que permite avaliar *in vitro* a capacidade de estirpes pertencentes a diferentes espécies (Gram negativas e Gram

positivas) em solubilizar K a partir de pó de rocha, seja em meio agarizado (semi-quantitativo) ou em meio líquido (quantitativo).

Termos para indexação: Meio Basak e Biswas, formação de halo, solubilizadores de potássio, bactérias Gram positiva e negativa, rocha potássica.

Methodological adjustments for *in vitro* evaluation of the potassium rocks biosolubilization by different bacterial species associated with plants of agronomic relevance

Abstract – There are several culture media to evaluate and select microorganisms that solubilize potassium rocks *in vitro* conditions. Despite having its composition modified over the years to increase screening efficiency and reduce the detection time of K solubilization by microorganisms, the plate assay method still has some limitations and a lot of variability, especially when the formation of the halo is discrete or absent. In this sense, the present study proposed methodological adjustments in the culture media for a more accurate assessment of the biosolubilization of potassium rocks based on different bacterial species of agronomic importance. Strains of 11 Gram-positive and negative bacterial species were evaluated in Aleksandrov, Basak and Biswas, and MISK culture media in the presence of four rock powders. The modified Basak and Biswas (B&B) cultivation medium was the one that provided better clarity for visualizing the halos and less variability in the tests after the successive adjustments. The results showed variation in potassium solubilization capacity with strains showing absence of growth, growth but absence of solubilization halo, growth and weak solubilization halo and, growth and prominent solubilization halo. Two strains (Ppe8= BR 11366 and T8 = BR 15417) presented prominent halos on the plates and, therefore, were used to quantify biosolubilized K after culturing the bacteria for 35 days in modified liquid B&B medium in the presence of the four rock powders. The Ppe8 strain stood out since it was able to survive up to 35 days of incubation, with few changes in the pH medium and provided an increase in K levels when cultivated in the presence of rock from sample 3. It was again tested for validation of the methodology and the results confirmed the potential of this strain to solubilize potash rock. Based on this result, we suggest the B&B medium (Basak; Biswas, 2010) modified in its composition that allows evaluating

in vitro the ability of strains belonging to different species (Gram negative and Gram positive) to solubilize K from rock powder either in agarized medium (semi-quantitative) or in a liquid medium (quantitative).

Index terms: Basak and Biswas medium, halo formation, K solubilizers, Gram-positive and negative bacteria, rock potassium.

Introdução

O potássio (K) é o oitavo elemento mais abundante na terra, compreendendo por volta de 2,1% da crosta terrestre. Entretanto, deste total, quase 98% está presente na forma não trocável, indisponível para as plantas, sendo frequente a deficiência de K nos solos, principalmente em sistemas de produção intensificados. Com base em sua disponibilidade para as culturas, o potássio é subdividido em quatro frações, sendo: (i) K solúvel, que está prontamente disponível para as plantas e microrganismos e potencialmente sujeito à lixiviação, (ii) K-trocável, aquele adsorvido na superfície dos argilominerais e da matéria orgânica, representando quase todo o K disponível do solo e encontrando-se em equilíbrio com o K solúvel, (iii) K-não trocável ou fixado, firmemente ligado à rede cristalina de certos minerais de argila, principalmente argilas 2:1 expansivas e (iv) K-mineral ou estrutural, forma original de todo o K do solo, fazendo parte da estrutura dos minerais e representando a maior parte do K em solos minerais. De maneira geral, as abundâncias relativas destas frações estão presentes na seguinte ordem: K-mineral (> 90%-98% do K total) > K-não trocável (1%-10% do total de K) > K-trocável+solúvel (1%-2% do total de K) (Kirkman *et al.*, 1994; Meena *et al.*, 2015; Soumare, *et al.*, 2023). Desta forma, a fim de aumentar a disponibilidade de K, em quantidades necessárias para sustentar a produtividade agrícola recomenda-se, tradicionalmente, a aplicação de fertilizantes potássicos solúveis. No entanto, os processos de produção destes fertilizantes enfrentam problemas práticos e requerem uma grande quantidade de energia, sendo sua exploração difícil, dispendiosa e insustentável. Felizmente, alguns processos biológicos naturais são utilizados por plantas e microrganismos para a biossolubilização do K na solução do solo, aumentando, assim, sua disponibilidade (Boubekri *et al.*, 2021; Soumare, *et al.*, 2023).

Muitas espécies de bactérias e fungos do solo apresentam a capacidade de disponibilizar formas solúveis de K a partir de minerais silicáticos

através do mecanismo de solubilização. Estudos indicam que a produção de ácidos orgânicos é um dos principais mecanismos de solubilização de K (Rogers; Bennett, 2004; Sheng; He, 2006; Uroz *et al.*, 2009; Meena *et al.*, 2016), no entanto, processos como a acidólise da rizosfera e de minerais, o intemperismo químico mediado por ácido carbônico, a quelação dos cátions ligados a silicatos por reações de troca e por fixação direta de microrganismos solubilizadores de potássio em superfícies minerais são outros mecanismos citados na literatura (Vassileva *et al.*, 1997; Anjanadevi *et al.*, 2016; Sattar *et al.*, 2019). Diante das evidências de que a eficiência de uso de K na agricultura pode ser efetivamente melhorada pela inoculação de MSK e em função da escassez de estratégias para seleção destes microrganismos, o desenvolvimento de um protocolo eficiente para o isolamento, seleção e caracterização de Microrganismos Solubilizadores de Potássio (MSK), utilizando K insolúvel como base dos ensaios, é essencial. De acordo com a literatura, o isolamento e a avaliação quantitativa de MSK tem sido conduzido com o meio de cultura (Aleksandrov *et al.*, 1967) inspirado na identificação de solubilizadores de fósforo (P), utilizando o método de placa de ágar Pikovskaya, onde a formação de um halo/zona visível no meio de cultura é considerada o principal critério para a seleção dos MSK. Este método foi posteriormente otimizado através da alteração do meio Aleksandrov com corantes indicadores ácido-base, tais como vermelho de fenol, azul de bromotimol e púrpura de bromocresol (Rajawat *et al.*, 2016). Esses indicadores aumentam a eficiência da triagem e diminuem o tempo de detecção destes micro-organismos de 4-5 para 2-3 dias. No entanto, o método de ensaio em placa ainda apresenta algumas limitações e muita variabilidade de resultados, principalmente quando a formação do halo é discreta ou ausente, isso porque muitos isolados não mostram nenhuma zona clara de solubilização nessa metodologia (Nautiyal, 1999). Diante destes fatos, este trabalho propõe ajustes metodológicos para avaliação mais precisa da biossolubilização de rochas potássicas com base em diferentes espécies de bactérias de importância agrônoma.

Material e métodos

Microrganismos

Foram avaliadas as seguintes estirpes bacterianas provenientes de pesquisas conduzidas no

Laboratório de Genética e Bioquímica (LGB) e do acervo do Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner da Embrapa Agrobiologia (CRB-JD): *Azospirillum argentinense* NRB085 (BR13925), *Azospirillum argentinense* NRB214 (BR13796), *Azospirillum baldaniorum* SP245 (BR11005), *Azospirillum brasilense* Abv5 (BR12186), *Azospirillum brasilense* Abv6 (BR12391), *Bacillus circulans* CC127 (BR14268), *Bacillus velezensis* LMC44a (BR13731), *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 (BR11281), *Gluconacetobacter diazotrophicus* LP343 (BR12376), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103 (BR11504), *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 (BR11335), *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 (BR11417), *Nitrospirillum viridazoti* Cbamc (BR11145), *Paenibacillus taichungensis* LMC42 (BR13939), *Paraburkholderia silvatlantica* NRB142 (BR13787), *Paraburkholderia tropica* Ppe8 (BR11366), *Sphingomonas sanguinis* DYAPRB4429 (BR14752) e *Serratia marcescens* T8 (BR15417).

Rochas potássicas

Os pós de rochas empregados neste estudo foram disponibilizados pelo Centro de Tecnologia Mineral (CETEM) – RJ e foram selecionados com base na disponibilidade e análises químicas do teor de potássio e de outros elementos (Tabela 1).

Meios de cultivos

No presente trabalho foram realizadas modificações em três meios de cultivo (Aleksandrov, B&B e MISK) disponíveis na literatura e que têm sido utilizados nos estudos de biossolubilização de K.

Constituições originais

- Aleksandrov (Hu, Chu e Guo, 2006): 5 g L⁻¹ glicose; 0,5 g L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0,005 g L⁻¹ FeCl₃; 0,1 g L⁻¹ CaCO₃; 2 g L⁻¹ Ca₃PO₄; 2 g L⁻¹ da fonte de potássio, pH 7,5.
- Meio B&B (Basak; Biswas, 2010): 5 g L⁻¹ sacarose; 2 g L⁻¹ Na₂HPO₄; 0,5 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄; 0,5 g L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0,005 g L⁻¹ FeCl₃; 0,1 g L⁻¹ CaCO₃; 0,2 g L⁻¹ extrato de levedura; 1 g L⁻¹ da fonte de potássio; solubilizados em água destilada, pH 7,5.
- MISK (Guimarães, 2006): 5 g L⁻¹ sacarose; 0,6 g L⁻¹ NH₄H₂PO₄; 0,2 g L⁻¹ CaCl₂.2H₂O; 0,2 g L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0,002 g L⁻¹ Na₂MoO₄.2H₂O; 0,01 g L⁻¹ FeCl₃; 10 g L⁻¹ da fonte de potássio, pH 6,2.

Tabela 1. Características das rochas potássicas utilizadas nos ensaios *in vitro* de solubilização de K.

Composição (% em peso)	Pó de rocha amostra 3*	Pó de rocha amostra 8*	Pó de rocha Amazonita**	Pó de rocha Kamafugito***
SiO ₂	43,5	48,4	72,33	16
Al ₂ O ₃	11,70	12,5	15,04	-
Fe ₂ O ₃	6,51	15,7	1,59	15,4
CaO	3,49	9,32	0,43	4
MgO	22,3	5,18	0,00	4
TiO ₂	1,41	3,56	0,049	-
P ₂ O ₅	0,01	0,39	0,00	3
Na ₂ O	0,27	2,35	4,57	-
K ₂ O	7,75	1,18	5,28	3
MnO	0,06	0,21	0,03	0,32
Soma de Bases (CaO+MgO+K ₂ O)	33,54	15,68	5,71	11

* dados obtidos do projeto "Levantamento de resíduos e rejeitos e o potencial de diversificação de produtos da atividade mineral na região Centro-Oeste para agrominerais".

** http://mineralis.cetem.gov.br/bitstream/cetem/555/1/Patricia_Piza.pdf

*** dados obtidos através do site <https://kp-fertil.com/kpfertil/>

Modificações realizadas nos meios de cultivos

- Aleksandrov: Modificado pela adição de (NH₄)₂SO₄, de azul de bromotimol, ágar bacteriológico e alteração do pH (tabela 2).
- B&B
 - 1ª modificação: Adição de azul de bromotimol e ágar bacteriológico, e aumento na quantidade da fonte de potássio (tabela 3);
 - 2ª modificação: Substituição da sacarose por glicose, aumento na quantidade da fonte de potássio, retirada do extrato de levedura, troca da água destilada por água ultrapura (Milli-Q), aumento na quantidade de azul de bromotimol e alteração do pH (tabela 3);
 - 3ª modificação: Preparo da solução de azul de bromotimol solubilizado em etanol 70% em água Milli-Q e adição de 25 mL L⁻¹ conforme recomendado por Rajawat (2016) que testou a adição de 3 corantes diferentes ao meio Aleksandrov para melhorar a visualização dos halos de solubilização. Aumento na quantidade da fonte de potássio (tabela 3);
 - 4ª modificação: Troca do CaCO₃ por CaCl₂.2H₂O (tabela 3).
- MISK: Modificado pela substituição da sacarose por glicose, pela adição de 25 mL L⁻¹ de azul de bromotimol 5 g L⁻¹ solubilizado em etanol 70% em água Milli-Q, diminuição na quantidade de pó

de rocha, adição de ágar bacteriológico e alteração no pH (tabela 4).

Teste de biossolubilização de rochas potássicas em placas de Petri contendo meio de cultura agarizado

As bactérias foram previamente cultivadas em meio DYGS (Rodrigues Neto *et al.*, 1986) modificado pH 6,0 ou em meio Luria Bertani (LB) pH 7,0. Após incubação a 30°C, 200 rpm durante 24 horas, os cultivos foram centrifugados a 5.000 rpm, a 25°C durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado bacteriano foi ressuspenso em solução contendo somente os sais de cada meio testado, a fim de remover resquícios de constituintes do meio utilizado no pré-inóculo, e metabólitos. Este processo foi realizado 2 vezes (lavagem 2x). Após, foram inoculados 10 µL em placas de Petri contendo 25 mL dos meios agarizados seguido por incubação em estufa bacteriológica a 30°C. A formação de halos de solubilização foi acompanhada diariamente.

Teste de biossolubilização de rochas potássicas em meio de cultivo B&B modificado líquido

As estirpes *Paraburkholderia tropica* Ppe8 = BR11366 e *Serratia marcescens* T8 = BR 15417 foram selecionadas para o teste de biossolubilização em meio líquido. As bactérias foram previamente

Tabela 2. Constituição original e modificada do meio de cultivo Aleksandrov (Hu, Chu e Guo, 2006).

Aleksandrov original		Aleksandrov modificado	
Glicose	5 g	Glicose	5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeCl ₃	0,005 g	FeCl ₃	0,005 g
CaCO ₃	0,1 g	CaCO ₃	0,1 g
Ca ₃ PO ₄	2 g	Ca ₃ PO ₄	2 g
Fonte de potássio	2 g	Fonte de potássio	2 g
		(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
		Azul de bromotimol 5 g L ⁻¹ preparado em KOH 0,2 N	5 mL
		Ágar bacteriológico	15 g
pH	7,5	pH	7,0
Água destilada	q.s.p* 1 L	Água destilada	q.s.p* 1 L

*q.s.p = Quantidade suficiente para

Tabela 3. Constituição original e modificações realizadas no meio de cultivo B&B (Basak; Biswas, 2010).

B&B original		B&B 1ª modificação		B&B 2ª modificação		B&B 3ª modificação		B&B 4ª modificação	
Sacarose	5 g	Sacarose	5 g						
				Glicose	5 g	Glicose	5 g	Glicose	5 g
Na ₂ HPO ₄	2 g	Na ₂ HPO ₄	2 g	Na ₂ HPO ₄	2 g	Na ₂ HPO ₄	2 g	Na ₂ HPO ₄	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeCl ₃	0,005 g	FeCl ₃	0,005 g	FeCl ₃	0,005 g	FeCl ₃	0,005 g	FeCl ₃	0,005 g
CaCO ₃	0,1 g	CaCO ₃	0,1 g	CaCO ₃	0,1 g	CaCO ₃	0,1 g		
								CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1 g
Extrato de levedura	0,2 g	Extrato de levedura	0,2 g						
Fonte de potássio	1 g	Fonte de potássio	2 g	Fonte de potássio	3 g	Fonte de potássio	5 g	Fonte de potássio	5 g
		Azul de bromotimol 5 g L ⁻¹ preparado em KOH 0,2 N	5 mL	Azul de bromotimol 5 g L ⁻¹ preparado em KOH 0,2 N	7 mL	Azul de bromotimol 5 g L ⁻¹ preparado em etanol 70%	25 mL	Azul de bromotimol 5 g L ⁻¹ preparado em etanol 70%	25 mL
		Ágar bacteriológico	15 g	Ágar bacteriológico	15 g	Ágar bacteriológico	15 g	Ágar bacteriológico	15 g
pH	7,5	pH	7,5	pH	6,5	pH	6,5	pH	6,5
Água destilada	q.s.p* 1 L	Água destilada	q.s.p* 1 L	Água Milli-Q	q.s.p* 1 L	Água Milli-Q	q.s.p* 1 L	Água Milli-Q	q.s.p* 1 L

*q.s.p = Quantidade suficiente para

Tabela 4. Constituição original e modificada do meio de cultivo MISK (Guimarães, 2006).

MISK original		MISK modificado	
Sacarose	5 g		
		Glicose	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
FeCl ₃	0,01 g	FeCl ₃	0,01 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	0,6 g	NH ₄ H ₂ PO ₄	0,6 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,2 g	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,2 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,002 g	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,002 g
Fonte de potássio	10 g	Fonte de potássio	5 g
		Azul de bromotimol 5 g L ⁻¹ preparado em etanol 70%	25 mL
		Ágar bacteriológico	15 g
pH	6,2	pH	6,5
Água destilada	q.s.p* 1 L	Água Milli-Q	q.s.p* 1 L

* q.s.p = Quantidade suficiente para

cultivadas em meio DYGS modificado pH 6,0 e Luria Bertani (LB) pH 7,0, respectivamente. Após o crescimento, os cultivos foram centrifugados a 5.000 rpm a 25°C durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado bacteriano foi ressuspenso em solução contendo somente os sais do meio. O processo foi repetido por 2 vezes (lavagem 2x) e, 1×10^4 células mL⁻¹ foram inoculadas em 50 mL de meio contidos em frascos de 125 mL. Foi empregado o meio sem adição de azul de bromotimol para possibilitar a dosagem de K. O controle absoluto consistiu no meio de cultura adicionado dos pós de rocha, porém desprovido de inóculo bacteriano. Os cultivos foram incubados a 200 rpm à temperatura ambiente. Após 13, 24 e 35 dias de incubação, 15 mL de cada cultivo foram coletados e esterilizados por filtração (0,22 µm). Procedeu-se a verificação do pH e análise do teor de K por espectrofotometria de chama. Paralelamente, as amostras foram cultivadas nos meios DYGS e LB a fim de avaliar a sobrevivência e pureza do inóculo, bem como eventuais alterações na morfologia das colônias. Para o experimento de validação da metodologia, foram incluídas réplicas biológicas e o período de incubação foi estendido até 46 dias. A bactéria *Paraburkholderia tropica* estirpe Ppe8 foi cultivada no meio Basak e Biswas com aumento na quantidade de glicose de 5 g L⁻¹ para 10 g L⁻¹, a fim de suportar o cultivo por maior período de incubação, e 1×10^4 células mL⁻¹ foram inoculadas

em 100 mL de meio contidos em frascos de 250 mL. A metodologia empregada para o inóculo foi a mesma do experimento anterior. Alíquotas para a verificação do pH e análise do teor de K foram coletadas após 10, 20, 31 e 46 dias de incubação.

Resultados e discussão

Para os estudos de avaliação do potencial de biossolubilização de potássio a partir de fontes de pós de rocha, inicialmente foram empregados os meios Aleksandrov e B&B modificados adicionados dos pós amostra 3 e amostra 8. Após 24 horas de incubação a 30°C foi verificada a presença de halo de solubilização em todos os isolados independentemente do pó de rocha (na quantidade de 2 g L⁻¹) e do meio de cultivo empregado.

Foram levantadas as seguintes hipóteses: todos os isolados são capazes de solubilizar ambos os pós de rocha; constituintes dos meios poderiam estar interferindo na disponibilidade de K, como por exemplo, presença de potássio na água destilada e no extrato de levedura constituinte do meio Basak e Biswas, ou interferindo no halo de solubilização como por exemplo a solubilização concomitante de Ca₃PO₄ presente no meio Aleksandrov. Assim, optou-se por repetir o experimento com algumas alterações, porém empregando somente o meio Basak e Biswas o qual apresentou uma melhor nitidez para a visualização dos halos. Foram realizadas as

seguintes modificações: substituição da fonte de carbono por glicose (5 g L^{-1}), aumento na quantidade de pó de rocha (3 g L^{-1}) e de azul de bromotimol (7 mL), ausência de extrato de levedura, solubilização em água ultrapura (Milli-Q) e alteração do pH para 6,5 (2ª modificação). Novamente todos os isolados apresentaram halos de solubilização nas placas de meio de cultivo agarizado e nos diferentes pós de rocha. Após investigação, foi verificado que o corante azul de bromotimol é preparado em solução de KOH 0,2N o que poderia estar atuando como uma fonte extra de potássio.

Assim, foi realizado um 3º experimento empregando azul de bromotimol 5 g L^{-1} solubilizado em álcool etílico 70%, o volume foi alterado para 25 mL L^{-1} conforme sugerido por Rajawat *et al.* (2016) e foi realizado um incremento na quantidade de pó de rocha (5 g L^{-1}) (3ª modificação). Foi realizado o mesmo procedimento para o inóculo. Após 24 horas de incubação a 30°C foi possível observar o crescimento bacteriano e a presença de halos de solubilização em parte das estirpes. Em contraste, mesmo após 132 horas de incubação, não foi observado crescimento de estirpes que haviam solubilizado os pós de rocha nos experimentos anteriores. A fim de confirmar o resultado obtido, os mesmos isolados foram cultivados novamente em um segundo teste e após 72 horas de incubação foi verificado o crescimento de todas as estirpes.

Como os resultados obtidos não foram conclusivos, optou-se pela realização de um novo experimento (experimento I) incluindo os pós de rocha Amazonita e Kamafugito além dos pós amostras 3 e 8. Foram utilizados os meios Basak e Biswas modificado pela substituição do CaCO_3 por $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4ª modificação) e foi incluído o meio MISK (Guimarães, 2006) utilizado na Embrapa Milho e Sorgo, modificado pela substituição da sacarose por glicose, adição de azul de bromotimol e ajuste de pH para 6,5. O crescimento e formação de halo de solubilização foram verificados após 72 horas e diariamente até 1 semana de incubação. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 5. Foi verificado que as estirpes *P. tropica* Ppe8 e *S. marcescens* T8 apresentaram crescimento bacteriano proeminente e halo de solubilização para todas as quatro rochas potássicas testadas independente do meio de cultivo utilizado. Já as estirpes *A. argentinense* NRB085 e NRB214 apresentaram crescimento e halo fraco de solubilização somente no meio Basak e Biswas modificado, enquanto que as estirpes *S. sanguinis* DYAPRB4429 e *G. diazotrophicus* PAL5 apresentaram a presença de crescimento bacteriano, mas

ausência de halo de solubilização. Em contraste, as estirpes *P. taichungensis* LMC42, *B. circulans* CC127 e *B. velezensis* LMC44a não cresceram e, portanto, não apresentaram halo de solubilização. Basak e Biswas (2009), obtiveram resultados positivos de solubilização de potássio a partir de resíduos de mica com uma estirpe de *Bacillus mucilaginosus*. É possível que os resultados negativos observados no presente estudo sejam específicos das estirpes, já que o número de estirpes/espécies de *Bacillus* testadas foi baixo e a literatura tem histórico de diversas espécies de *Bacillus* com potencial de solubilizar potássio insolúvel a partir de rochas potássicas (Lian *et al.*, 2008, Soumare *et al.*, 2023).

Uma vez que o meio B&B, após a 4ª modificação (ver detalhe em conclusões), possibilitou o crescimento das estirpes de *A. argentinense* e apresentou uma melhor visualização dos halos, o meio de cultura foi empregado em um segundo experimento (experimento II), com um maior número de estirpes. Foi confirmado os resultados obtidos para as estirpes PPe8 e T8, e, em adição as estirpes *P. silvatlantica* NRB 142, *N. viridazoti* Cbamc e *G. diazotrophicus* LP343 também apresentaram crescimento e halo proeminente. Já as estirpes *A. baldaniorum* SP245, *A. brasilense* Abv5 e Abv6, *H. rubrisubalbicans* HCC103, *H. seropedicae* HRC54 e ZAE94 mostraram crescimento bacteriano, porém halo fraco de solubilização (Tabela 5).

Dentre as estirpes avaliadas, T8 e Ppe8, foram as que apresentaram crescimento e halos de solubilização de K proeminentes na presença de todos os pós de rocha. A fim de avaliar quantitativamente o potencial de biossolubilização de K foi realizado um novo experimento empregando o meio B&B (após a 4ª modificação) líquido. Os resultados mostraram pouca variação de pH para os diferentes pós de rocha na presença da estirpe Ppe8 ao longo das coletas (Figura 1C). A única exceção foi a amostra contendo pó de rocha Amazonita, que reduziu o pH para valores ao redor de $\text{pH} = 3$ desde a coleta feita aos 13 dias (Figura 1C). Já em relação aos teores de K, pode-se observar incremento na amostra contendo pó de rocha 3 incubado na presença da estirpe Ppe8 desde a coleta realizada aos 13 dias e com leve aumento aos 35 dias, enquanto que para as demais rochas os valores foram similares aos obtidos sem a presença da bactéria (Figura 1D). No caso da estirpe T8, verificou-se uma redução de pH para valores ao redor de 3 para todas os pós de rochas quando na presença da bactéria (Figura 1A). Já o acúmulo de K foi superior quando a estirpe T8 foi cultivada na

Tabela 5. Formação de halos de biossolubilização de K pelas diferentes estirpes cultivadas nos meios agarizado B&B (Barak e Biwas, 2010) e MISK (Guimarães, 2006) modificados na presença dos 4 pós-de-rocha.

Estirpes	Presença de halo meio B&B				Presença de halo meio MISK			
	Amostra 3	Amostra 8	Amazonita	Kama fugito	Amostra 3	Amostra 8	Amazonita	Kama fugito
Experimento I								
<i>Azospirillum argentinense</i> NRB085 (BR13925)	++	++	++	++	+	-	-	-
<i>Azospirillum argentinense</i> NRB214 (BR13796)	++	++	++	++	-	-	-	-
<i>Bacillus circulans</i> CC127 (BR14268)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus velezensis</i> LMC44a (BR13731)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5 (BR11281)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Paenibacillus taichungensis</i> LMC42 (BR13939)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Paraburkholderia tropica</i> Ppe8 (BR11366)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Sphingomonas sanguinis</i> DYAPRB4429 (BR14752)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i> T8 (BR 15417)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Experimento II								
<i>Azospirillum baldaniorum</i> SP245 (BR11005)	++	++	++	++	nd	nd	nd	nd
<i>Azospirillum brasilense</i> Abv5 (BR12186)	++	++	++	++	nd	nd	nd	nd
<i>Azospirillum brasilense</i> Abv6 (BR12391)	++	++	++	++	nd	nd	nd	nd
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> LP343 (BR12376)	+++	+++	+++	+++	nd	nd	nd	nd
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> HCC103 (BR11504)	++	++	++	++	nd	nd	nd	nd
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> HRC54 (BR11335)	++	++	++	++	nd	nd	nd	nd
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> ZAE94 (BR11417)	++	++	++	++	nd	nd	nd	nd
<i>Nitrospirillum viridazoti</i> Cbamc (BR11145)	+++	+++	+++	+++	nd	nd	nd	nd
<i>Paraburkholderia silvatlantica</i> NRB142 (BR13787)	+++	+++	+++	+++	nd	nd	nd	nd

Legenda:

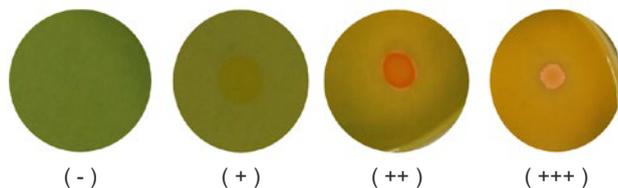
(-) Ausência de crescimento bacteriano e de halo de solubilização

(+) Presença de crescimento bacteriano mas ausência de halo de solubilização

(++) Presença de crescimento bacteriano e de halo fraco de solubilização

(+++) Presença de crescimento bacteriano e de halo de solubilização proeminentes

nd - não determinado



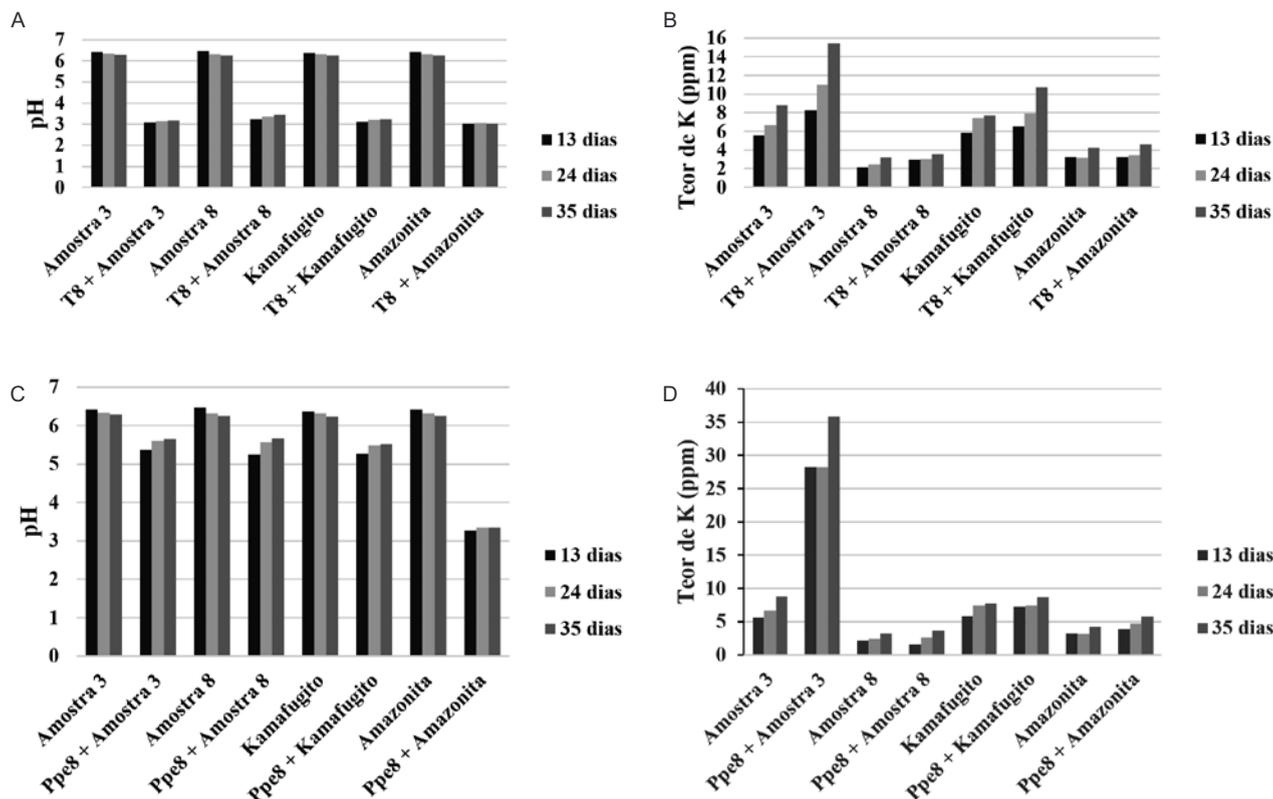


Figura 1. Variação de pH e dos teores de potássio (K) no sobrenadante dos cultivos de *Serratia marcescens* T8 (A e B) e de *Paraburkholderia tropica* Ppe8 (C e D) em meio Basak e Biswas modificado, suplementado com os pós de rocha 3, 8, Amazonita e Kamafugito após 13, 24 e 35 dias de incubação.

presença do pó de rocha 3 e levemente aumentada na presença do pó de rocha Kamafugito. Os demais não mostraram aumento nos teores de K (Figura 1B). Paralelamente, as amostras foram cultivadas nos meios DYGS e LB e, após 24 dias (segunda coleta) de incubação não foi verificado crescimento da estirpe T8, indicando a morte das células pela redução de pH. Em contraste, foi possível recuperar colônias puras de Ppe8 ao longo de toda a duração do experimento (Figura 2).

Considerando que a *Paraburkholderia tropica* estirpe Ppe8 foi capaz de sobreviver até os 35 dias de incubação, com poucas alterações no pH do meio e proporcionou aumento nos teores de K quando cultivada na presença do pó de rocha da amostra 3, a mesma foi selecionada para realização do experimento de validação da metodologia. Os resultados obtidos estão representados na figura 3. Pode ser observado que não houve variação de pH ao longo das coletas quando os pós de rochas foram incubados sem a bactéria (Figura 3A). Já na presença da estirpe Ppe8, foi verificado a redução de 1 unidade nas três primeiras coletas e um leve

aumento de pH para todas as rochas usadas na coleta realizada aos 46 dias de incubação (Figura 3A). A análise dos teores de K para os diferentes pós de rocha, confirmaram os resultados do experimento anterior onde teores altos de K foram observados quando a estirpe Ppe8 foi incubada na presença do pó amostra 3 (Figura 3B). Os demais pós de rocha não apresentaram valores elevados de teores de K tanto na presença como na ausência da bactéria. É possível que os maiores teores de K no pó de rocha 3 após incubação com as bactérias estejam relacionados com o maior teor de K existente na rocha 3 em comparação as demais rochas (Tabela 1).

Os ajustes metodológicos realizados no meio B&B (Basak Biswas, 2010) foram críticos para a visualização da presença ou não de formação de halo durante os ensaios *in vitro*. Pode-se perceber que a presença de alguns compostos tais como o extrato de levedura, Ca_3PO_4 e azul de bromotimol preparado com KOH produziram resultados falsos positivos para algumas bactérias, cujos halos se formaram nos primeiros ajustes, porém

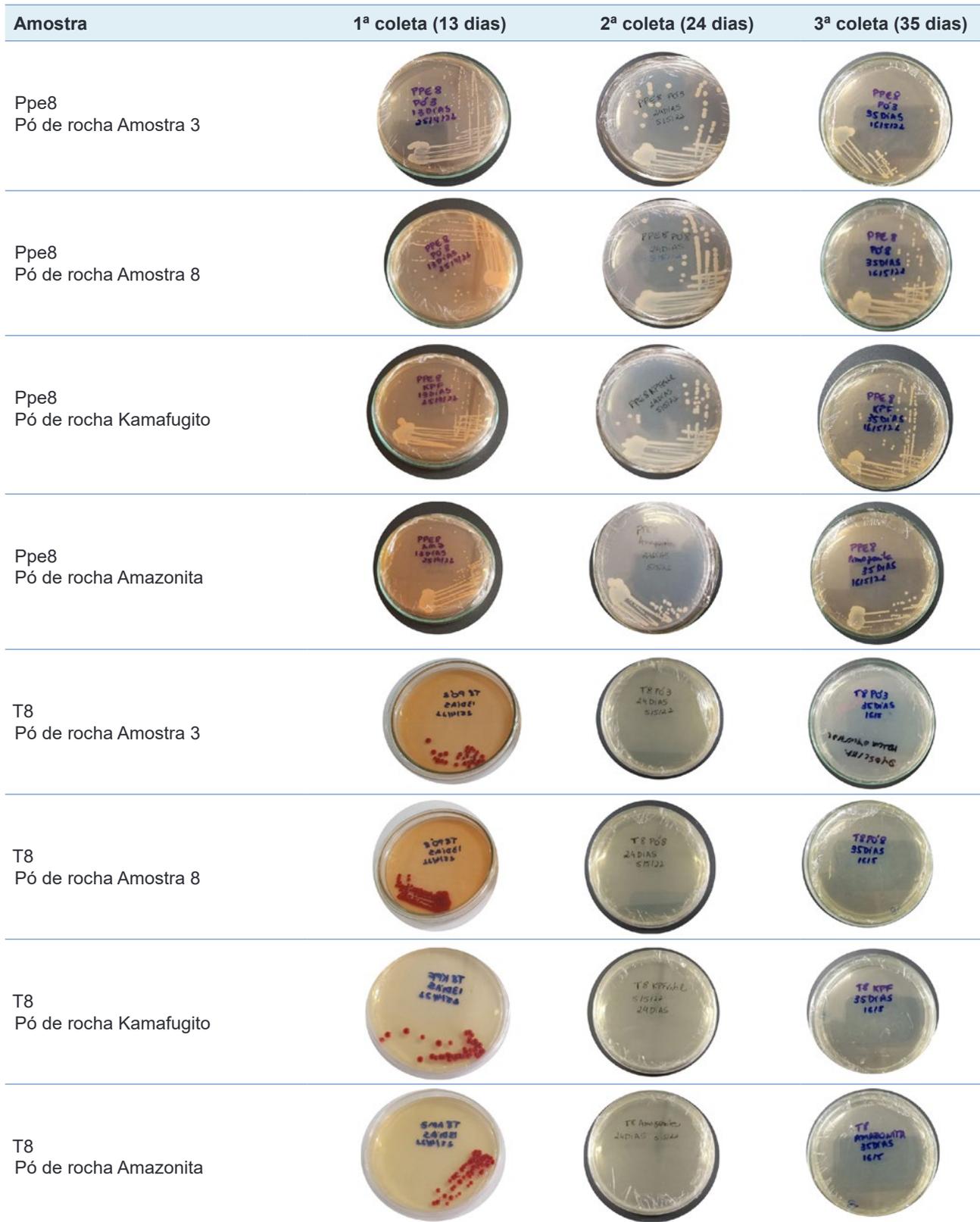


Figura 2. Crescimento de *Paraburkholderia tropica* Ppe8 e *Serratia marcescens* T8 em placas de meio DYGS e LB, respectivamente, após diferentes períodos de incubação em meio B&B modificado, suplementado com os pós de rocha da Amostra 3, Amostra 8, Kamafugito e Amazonita.

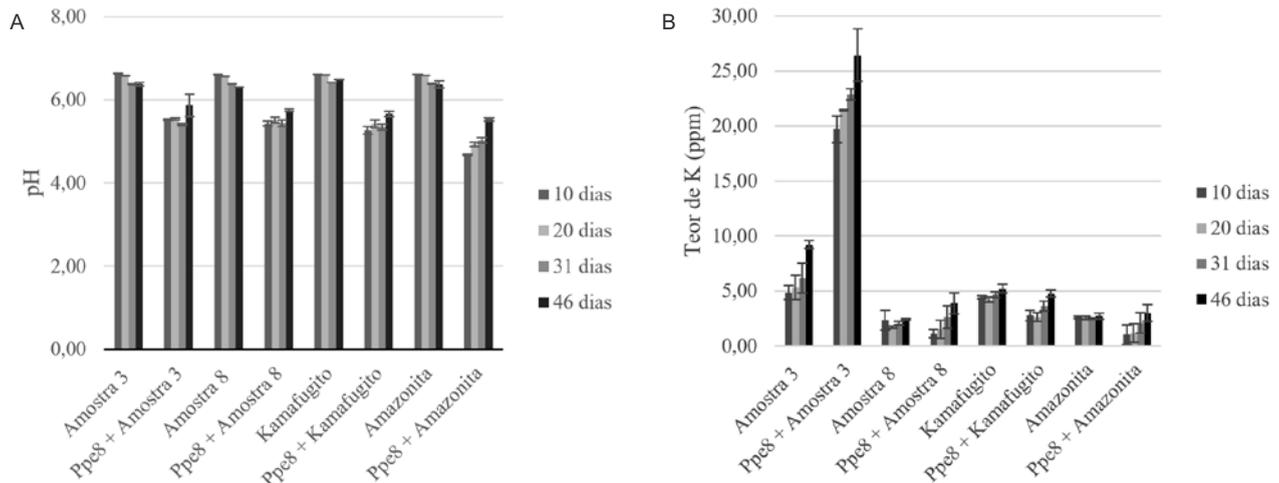


Figura 3. Variações de pH (A) e Teor de Potássio (B) no sobrenadante do cultivo de *Paraburkholderia tropica* Ppe8 em meio B&B modificado suplementado com os pós de rocha da Amostra 3, Amostra 8, Amazonita e Kamafugito em diferentes períodos de incubação. *Os valores referem-se a média e desvio padrão: Meio sem inóculo = 2 réplicas e Meio + Ppe8 = 3 réplicas.

tornaram-se negativos após a última modificação do meio B&B. A modificação do meio permitiu identificar de maneira rápida estirpes até então desconhecidas quanto a capacidade de solubilização de K presente em rochas potássicas. Destacam-se as estirpes *Paraburkholderia tropica* Ppe8, *Nitrospirillum viridazoti* Cbamc (antigo *N. amazonense*), *Gluconacetobacter diazotrophicus* LP343 e *Paraburkholderia silvatlantica* NRB142, sendo as duas primeiras constituintes de inoculante desenvolvido para a cultura de cana-de-açúcar (Reis *et al.*, 2020). A confirmação da capacidade de solubilizar K em meio líquido é um indicativo do potencial das estirpes, porém torna-se necessário avaliar essas bactérias em associação com plantas de interesse agrônomico cultivadas em condições limitantes de K solúvel para efetivamente definir o papel delas para um incremento significativo na produção vegetal e conseqüentemente contribuir para a sustentabilidade da agricultura.

Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o meio de cultivo a ser empregado na seleção de bactérias capazes de solubilizar o K insolúvel presente nos pós de rocha requer cuidados, principalmente referentes a presença do elemento K nos componentes ou veículos de preparação, bem como de compostos que, ao serem solubilizados, também podem induzir a formação de halo, como por exemplo CaCO_3 e Ca_3PO_4 . Verificamos

que deve ser evitado a presença de extrato de levedura, o qual possui composição variável podendo conter potássio em sua formulação, o uso de indicador de pH que seja dissolvido em hidróxido de potássio e que é essencial a utilização de água Milli-Q para eliminar as chances de fontes adicionais de K solúvel. Nesse sentido, o meio B&B (Basak; Biswas, 2010) foi modificado ao longo dos experimentos, chegando-se a composição abaixo (após a 4ª modificação) que permitiu avaliar *in vitro* a capacidade de solubilização de diferentes estirpes pertencentes a espécies distintas (Gram negativas e Gram positivas), tanto em meio agarizado (semi-quantitativo) como em meio líquido (quantitativo) e dosar a quantidade de K em solução a partir do pó de rocha. É importante ressaltar que o teor de K presente no pó de rocha interfere na quantidade de K solubilizado, assim como o pH do meio de cultivo que pode reduzir drasticamente a sobrevivência das bactérias.

Baseado nos resultados obtidos, sugerimos o meio B&B (Basak; Biswas, 2010) modificado com a nova composição: 5 g L⁻¹ glicose; 2 g L⁻¹ Na₂HPO₄; 0,5 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 0,5 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O; 0,005 g L⁻¹ FeCl₃; 0,1 g L⁻¹ CaCl₂·2H₂O; 5 g L⁻¹ de fonte de potássio; 25 mL de azul de bromotimol 5 g L⁻¹ solubilizado em etanol 70% em água Milli-Q; 15 g L⁻¹ ágar bacteriológico; pH = 6,5. Solubilizar em água Milli-Q. No caso de avaliação em meio líquido, sugere-se dobrar a quantidade de glicose para 10 g e omitir o uso do azul de bromotimol, para não haver interferência na quantificação de potássio.

Agradecimentos

Ao projeto CNPq/Universal (processo 431146/2018-7) - Respostas do microbioma de solo agrícola a aplicação de remineralizadores como fontes alternativas de nutrientes para as plantas e projeto Embrapa nº 10.23.00.065.00.00 - Aproveitamento de resíduos da extração de rocha para uso na produção de remineralizadores como fonte alternativa de potássio e no desenvolvimento de novos produtos (Parceria Embrapa/CETEM) que apoiaram financeiramente a pesquisa.

Referências

- ALEKSANDROV, V. G.; BLAGODYR, R. N.; ILEV, I. P. Liberation of phosphoric acid from apatite by silicate bacteria. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal*, v. 29, p. 111-114, 1967.
- ANJANADEVI, I. P.; JOHN, N. S.; JOHN, K. S.; JEEVA, M. L.; MISRA, R. S. Rock inhabiting potassium solubilizing bacteria from Kerala, India: Characterization and possibility in chemical K fertilizer substitution. *Journal of Basic Microbiology*, v. 56, p. 67-77, 2016.
- BASAK, B. B.; BISWAS, D. R. Influence of potassium solubilizing microorganism (*Bacillus mucilaginosus*) and waste mica on potassium uptake dynamics by sudan grass (*Sorghum vulgare* Pers.) grown under two Alfisols. *Plant and Soil*, v. 317, p. 235-255, 2009.
- BASAK, B. B.; BISWAS, D. R. Co-inoculation of potassium solubilizing and nitrogen fixing bacteria on solubilization of waste mica and their effect on growth promotion and nutrient acquisition by a forage crop. *Biology and Fertility of Soils*, v. 46, p. 641-648, 2010.
- BOUBEKRI, K.; SOUMARE, A.; MARDAD, I.; LYAMLOULI, K.; HAFIDI, M.; OUHDOUCH, Y.; KOUISNI, L. The screening of potassium- and phosphate-solubilizing actinobacteria and the assessment of their ability to promote wheat growth parameters. *Microorganisms*, v. 9, p. 470, 2021.
- GIRGIS, M. G. Z.; KHALIL, H. M. A.; SHARAF, M. S. In vitro evaluation of rock phosphate and potassium solubilizing potential of some *Bacillus* strains. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, v. 2, p. 68-81, 2008.
- GUIMARÃES, P. S.; LUCIO, C. H.; SOARES, E. M.; NONATO, L. V.; COELHO, A. M.; ALVES, V. M. C.; MARRIEL, I. E. Liberação de potássio de rocha silicática brecha alcalina influenciada pelo genótipo de fungo, In Vitro. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 26.; SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA-DO-CARTUCHO, SPODOPTERA FRUGIPERDA, 2.; SIMPÓSIO SOBRE COLLETOTRICHUM GRAMINICOLA, 1., 2006, Belo Horizonte. **Inovação para sistemas integrados de produção**: trabalhos apresentados. Sete Lagoa: ABMS, 2006.
- KIRKMAN, J. H.; BASKER, A.; SURAPANENI, A.; MACGREGOR, A. N. Potassium in the soils of New Zealand—A review. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, v. 37, p. 207-227, 1994.
- MEENA, R. K.; SINGH, R. K.; SINGH, N. P.; MEENA, S. K.; MEENA, V. S. Isolation of low temperature surviving plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) from pea (*Pisum sativum* L.) and documentation of their plant growth promoting traits. *Biocatalysis Agricultural Biotechnology*, v. 4, p. 806-811, 2015.
- MEENA, V. S.; BAHADUR, I.; MAURYA, B. R.; KUMAR, A.; MEENA, R. K.; MEENA, S. K.; VERMA, J. P. Potassium-solubilizing microorganism in evergreen agriculture: an overview. MEENA, V. S.; MAURYA, B. R.; VERMA, J. P.; MEENA, R. S. (Eds.). **Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture**, Springer, New Delhi, 2016, p. 1-20.
- NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, v. 170, p. 265-270, 1999.
- RAJAWAT, M. V. S.; SINGH, S.; TYAGI, S. P.; SAXENA, A. K. A Modified plate assay for rapid screening of potassium-solubilizing bacteria. *Pedosphere*, v. 26; n. 5, p. 768-773. 2016.
- REIS, V. M.; RIOS, F. A.; BRAZ, G. B. P.; CONSTANTIN, J.; HIRATA, E. S.; BIFFE, D. F. Performance agrônômica da cana-de-açúcar submetida à inoculação de *Nitrospirillum amazonense* (BR11145). *Revista Caatinga*, v. 33, n. 4, p. 918-926, 2020.
- ROGERS, J. R.; BENNETT, P. C. Mineral stimulation of subsurface microorganisms: Release of limiting nutrients from silicates. *Chemical Geology*, v. 203, p. 91-108, 2004.
- SHENG, X. F.; HE, L. Y. Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild-type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. *Canadian Journal Microbiology*, v. 52, p. 66-72, 2006.
- SOUMARE, A.; SARR, D.; DIÉDHIOU, A. G. Potassium sources, microorganisms and plant nutrition: Challenges and future research directions. *Pedosphere*, v. 33, n. 1, p. 105-115, 2023.
- UROZ, S.; CALVARUSO, C.; TURPAULT, M. P.; FREY-KLETT, P. Mineral weathering by bacteria: Ecology, actors and mechanisms. *Trends in Microbiology*, v. 17, p. 378-387, 2009.

VASSILEVA, M.; VASSILEV, N.; AZCON, R. Rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* on olive cake-based medium and its further application in a soil-plant system. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, p. 281-284, 1997.

KESHAVARZ ZARJANI, J. K.; ALIASGHARZAD, N.; OUSTAN, S.; EMADI, M.; AHMADI, A. Isolation and characterization of potassium solubilizing bacteria in some Iranian soils. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 59, n. 12, p. 1713-1723, 2013.



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA E
PECUÁRIA