



Solubilização de fosfato por rizobactérias provenientes de solos salinos do estado do Rio de Janeiro

Phosphate solubilization by rhizobacteria from saline soils in the state of Rio de Janeiro

ARCENIO, Fernanda Seixas¹; TELES, Érico Atílio de Paiva²; GONÇALVES, João Vitor da Silva³; AMAYA, Rafael Leandro⁴; ZONTA, Everaldo⁵; COELHO, Irene da Silva⁶

¹Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, feseixasufrj@ufrj.br; ²Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, ericoateles@gmail.com; ³Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, joaovdsgoncalves@gmail.com; ⁴Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, rafajoca77@gmail.com; ⁵Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, ezonta@ufrj.br; ⁶Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, irenecoelho@ufrj.br.

RESUMO EXPANDIDO

Eixo Temático: Manejo de Agroecossistemas

Resumo: A bioprospecção de rizobactérias halotolerantes e halofílicas com capacidade de solubilização de fósforo pode representar uma alternativa promissora no manejo sustentável de áreas agrícolas, inclusive nas que apresentam problemas de salinidade. Diante disto, dezessete bactérias isoladas da rizosfera de plantas halófitas foram identificadas a nível de gênero e avaliadas quanto a sua capacidade de se multiplicar em concentrações crescentes de NaCl e de solubilizar fosfato de cálcio e alumínio. Os isolados foram identificados como pertencentes aos gêneros *Bacillus* sp. (2), *Citrobacter* sp. (1) *Enterobacter* sp. (5), *Halomonas* sp. (2), *Halobacillus* sp. (1), *Pseudomonas* sp. (2) e *Staphylococcus* sp. (2). Quatro isolados foram classificados como halofílicos e treze como halotolerantes. Todos os isolados foram capazes de solubilizar o fosfato de cálcio em ambos os meios, e o fosfato de alumínio somente no meio líquido, o que indica que podem ser promissoras para o desenvolvimento de bioinsumos.

Palavras-chave: Bactérias halofílicas; bactérias halotolerantes; estresse salino; promoção de crescimento vegetal.

Introdução:

A salinidade e a seca são os principais estresses abióticos que prejudicam o crescimento, a produtividade e o rendimento das culturas vegetais. Muitos fatores ambientais e antrópicos influenciam a salinização do solo e sua aridez, como a escassa cobertura vegetal, baixa precipitação associada à elevada evapotranspiração, drenagem limitada, qualidade da água de irrigação e práticas agronômicas inapropriadas (GAMALERO et al., 2020).

Outro fator limitante para a produção agrícola é a baixa disponibilidade de fósforo (P) nos solos. Assim, para manter a produtividade agrícola, a utilização de fertilizantes fosfatados tem aumentado nas últimas décadas, o que pode gerar



diversos problemas ambientais como a eutrofização de corpos d'água, além de representar um desperdício desse recurso bastante limitado e aumento do custo de produção (GAMUYAO et al., 2012; WITHERS et al., 2018).

Nesse contexto, microrganismos solubilizadores de fósforo desempenham um papel central na biodisponibilização desse nutriente, otimizando seu uso e promovendo o aumento do crescimento vegetal. Dessa forma, a bioprospecção de rizobactérias halotolerantes e halofílicas com capacidade de solubilização de fósforo pode representar uma alternativa promissora no manejo sustentável de áreas agrícolas, inclusive nas que apresentam problema de salinidade (ZHU et al., 2011). A partir disso, o objetivo desse trabalho foi identificar bactérias isoladas da rizosfera de plantas, classificá-las quanto à capacidade de crescimento em concentrações crescentes de NaCl e solubilização de fosfato de cálcio (CaHPO_4) e de alumínio (AlPO_4) em meios de cultura sólidos e líquidos.

Metodologia:

Origem e identificação genotípica das bactérias:

Os 17 isolados bacterianos foram provenientes da rizosfera de plantas halófitas do entorno da Lagoa Vermelha de Araruama - RJ e de uma salina desativada em São Pedro da Aldeira - RJ. O DNA total dos isolados foi extraído e um fragmento de aproximadamente 1000 pb do gene 16S rDNA foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram utilizados *primers* universais 338F 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'; 1378R 5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG-3'. O sequenciamento foi realizado na Plataforma de Sequenciamento de DNA (PSEQDNA), no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ. As sequências foram editadas utilizando o programa BioNumerics (v. 7.6), e foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados do NCBI utilizando o algoritmo BLASTn para inferência dos gêneros.

Classificação quanto à salinidade:

Colônias bacterianas foram diluídas em água salina 0,9% até alcançar a turbidez equivalente à concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ na escala de McFarland. A seguir, triplicatas de cada isolado foram semeadas em placas contendo meio DYGS acrescidos de 0,5% a 30% de NaCl e incubadas a 30°C. Os isolados foram avaliados por um período de 14 dias após a inoculação. Isolados que se desenvolveram exclusivamente em meios com concentrações iguais ou superiores 1,0% de NaCl foram classificados como halofílicos, já aqueles que se desenvolveram também em 0,5% foram classificados como halotolerantes (AMOOZEGAR et al., 2019; SINGH et al., 2019). Após as análises de resposta à salinidade, a concentração de 3% de NaCl foi estabelecida para o cultivo das bactérias nos demais meios e testes realizados, pois todos os isolados apresentaram crescimento adequado nessa concentração.



Teste de solubilização em meio sólido:

Os isolados bacterianos foram inoculados em 5 mL de meio DYGS e incubados por 24 horas a 150 rpm. Posteriormente, a densidade óptica (DO) de cada cultura foi ajustada por espectrofotometria. Uma alíquota de 10 μ L das culturas foi inoculada em discos de papel de 6 mm dispostos sobre meio sólido NBRIP acrescido 3% de NaCl e contendo 5 g por litro de CaHPO_4 ou AlPO_4 como fonte de fosfato. As bactérias foram inoculadas no meio em triplicata. O diâmetro do halo de solubilização formado ao redor das colônias foi medido no décimo sétimo dia após a inoculação. Os índices de solubilização (IS) foram calculados através da fórmula:

$$IS = \text{diâmetro do halo (mm)} / \text{diâmetro da colônia (mm)}$$

Os isolados foram classificados quanto à capacidade de solubilização em baixa ($IS < 2$), média ($2 \leq IS \leq 4$) e alta ($IS > 4$) (BERRAQUERA et al., 1976).

Teste de solubilização em meio líquido:

Os isolados bacterianos foram cultivados e tiveram suas densidades ópticas ajustadas como descrito anteriormente. Os isolados foram inoculados no meio em triplicata. Uma alíquota 300 μ L de cada cultura foi inoculado em 35 mL de meio NBRIP (acrescido 3% de NaCl contendo 5 g por litro de CaHPO_4 ou AlPO_4 e o pH ajustado para 7,0) e mantidas sob agitação de 150 rpm por 14 dias. O fósforo solúvel foi quantificado segundo TEIXEIRA et al. (2017) e o pH determinado no dia da inoculação e após 14 dias.

Resultados e Discussão:

As dezessete bactérias foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Bacillus* sp. (3), *Citrobacter* sp. (1), *Enterobacter* sp. (5), *Halobacillus* sp. (1), *Halomonas* sp. (2), *Pseudomonas* sp. (2), *Straphylococcus* sp. (2). Um isolado apresentou maior identidade com uma sequência de bactéria não cultivável depositada no NCBI (Tabela 1).

Em relação à resposta à salinidade, treze isolados foram classificados como halotolerantes e quatro classificados como halofílicas. As bactérias classificadas como halotolerantes, apresentaram crescimento em meios contendo 0,5% de NaCl e cresceram em concentrações de até 10%, 15% ou 20% de NaCl. Os isolados classificados como halofílicos se desenvolveram em meios contendo concentrações máximas de 10% ou 15% de NaCl (Tabela 1).

Todos os isolados apresentaram resultados positivos, no que tange a solubilização de CaHPO_4 em meio sólido (Tabela 1). Entre os dezessete isolados bacterianos, o isolado *Halobacillus* sp (58) apresentou um alto índice de solubilização, 10 isolados obtiveram um índice médio e 6 obtiveram uma baixa solubilização. Não foram observados halos de solubilização nos meios contendo AlPO_4 , embora tenha sido constatado o desenvolvimento de colônia. No entanto, a formação de halos de solubilização é apenas um indicativo da capacidade de solubilização. A exsudação



de ácidos orgânicos é um dos principais mecanismos para a mobilização de fosfatos minerais por bactérias (ALORI et al., 2017). Esses ácidos podem formar complexos metálicos com íons de Ca, Al e Fe associados aos fosfatos sem levar à formação de halos translúcidos nos meios de cultura (BASHAN et al., 2013).

Tabela 1: Identificação, intervalo de crescimento em diferentes concentrações de NaCl e classificação quanto à salinidade e índice de solubilização (IS) de CaHPO_4 em meio sólido

Isolado	Gênero	Intervalo de crescimento	Classificação quanto a salinidade	IS
49	<i>Bacillus</i> sp./OR113009.1	0,5% - 15%	Halotolerante	Baixa
120	<i>Bacillus</i> sp./ MT126504.1	0,5% - 15%	Halotolerante	Baixa
132	<i>Bacillus</i> sp./ OR113009.1	0,5% - 20%	Halotolerante	Baixa
67	<i>Citrobacter</i> sp./MT263019.1	0,5% - 15%	Halotolerante	Média
127	<i>Enterobacter</i> sp./MK559552.1	0,5% - 15%	Halotolerante	Média
12	<i>Enterobacter</i> sp. /MT409542.1	1,0% - 10%	Halofílico	Média
11	<i>Enterobacter</i> sp./EF198245.1	0,5% - 10%	Halotolerante	Média
34	<i>Enterobacter</i> sp./MH988744.1	0,5% - 15%	Halotolerante	Média
143	<i>Enterobacter</i> sp./MT579677.1	0,5% - 15%	Halotolerante	Baixa
58	<i>Halobacillus</i> sp./MT433871.1	0,5% - 15%	Halotolerante	Alta
8	<i>Halomonas</i> sp./MT509796.1	1,0% - 10%	Halofílico	Baixa
16	<i>Halomonas</i> sp./MT760104.1	1,5% - 10%	Halofílico	Média
48	<i>Pseudomonas</i> sp./OR105012.1	0,5% - 15%	Halotolerante	Média
51	<i>Pseudomonas</i> sp./OR105012.1	0,5% - 20%	Halotolerante	Média
19	<i>Staphylococcus</i> sp./KT261167.1	0,5% - 15%	Halotolerante	Baixa
10	<i>Straphylococcus</i> sp./LC511705.1	0,5% - 10%	Halotolerante	Média
15	<i>uncultured bacterium</i> /M557554.1	1,0% - 10%	Halofílico	Média

Nos testes em meio líquido, todos os isolados foram capazes de solubilizar CaHPO_4 e AlPO_4 . Entre os dezessete isolados bacterianos, os isolados *Bacillus* sp. (120) e *Pseudomonas* sp. (48) foram os dois isolados que apresentaram a maior capacidade de solubilização de fosfato de cálcio, respectivamente, 757,61 mg/L e 570,01 mg/L, com pH após 14 dias de 3,8 e 4,3 (Figura 1). Já os isolados *Bacillus* sp. (49) e *uncultured bacterium* (15), foram os mais expressivos na solubilização de fosfato de alumínio, apresentando 14,62 mg/L e 14,56 mg/L com pH de 4,4 e 3,0, respectivamente, (Figura 2). Foi possível observar uma correlação entre a quantidade de fosfato de cálcio solubilizado com a diminuição do pH dos meios. Isso ocorre, pois a solubilização do fosfato de cálcio pode se dar pela simples queda do pH (BASHAN et al. 2013). Microrganismos com capacidade de solubilização liberaram ácidos orgânicos ou prótons, acidificando o meio. Além disso, os ácidos orgânicos podem dissolver o fosfato mineral como um resultado na troca de ânions, formação de complexos e quelação dos metais associados ao P.



Já nos meios contendo fosfato de alumínio a taxa de solubilização não acompanhou a redução do pH. Isso concorda com resultados observados por FANKEM et al. (2008), que observaram que, diferente dos fosfatos de cálcio, a mobilização de fosfatos de ferro e alumínio é menos diretamente relacionada com a queda do pH; sendo mais relacionado às constantes de estabilidade da ligação entre o complexo Fe ou Al e os diferentes ácidos orgânicos.

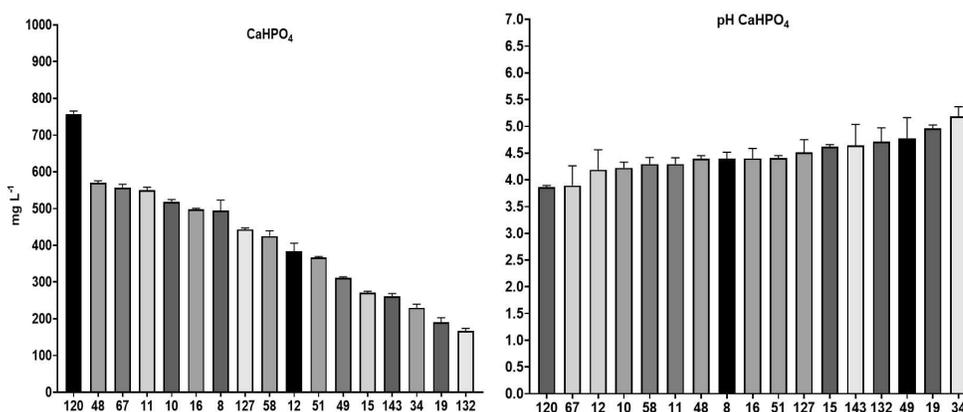


Figura 1: Quantidade de P solubilizado e pH em meios de cultura líquido contendo fosfato de cálcio após 14 dias de incubação.

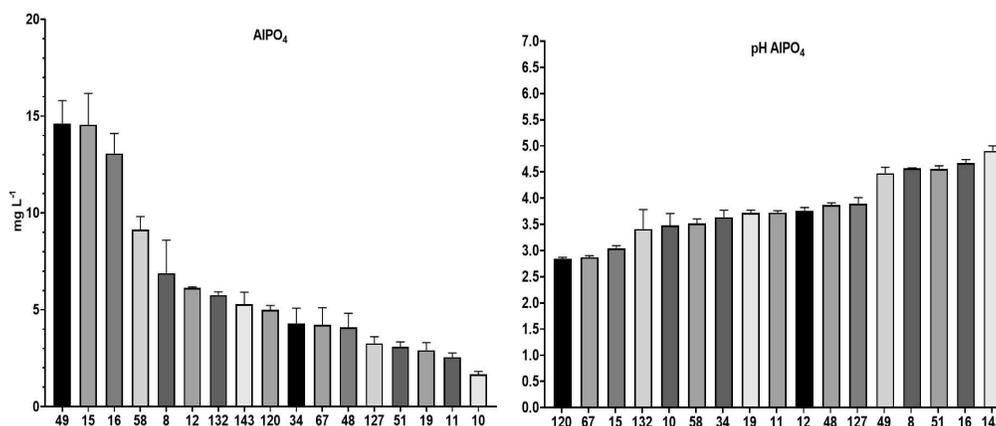


Figura 2: Quantidade de P solubilizado e pH em meios de cultura líquido contendo fosfato de alumínio após 14 dias de incubação.

Conclusão:

As bactérias provenientes da rizosfera de plantas halófitas descritas neste trabalho foram capazes de se desenvolver em concentrações elevadas de NaCl. Além disso, foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio e alumínio, sendo consideradas promissoras para o desenvolvimento de bioinsumos que visem o melhor



aproveitamento do fosfato presente nos solos, inclusive em ambientes afetados por sais.

Bibliografia:

ALORI, Elizabeth T.; GLICK, Bernard R.; BABALOLA, Olubukola O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 971, 2017.

AMOOZEGAR, Mohammad Ali et al. Halophiles and their vast potential in biofuel production. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1895, 2019.

BASHAN, Yoav; KAMNEV, Alexander A.; DE-BASHAN, Luz E. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 4, p. 465-479, 2013.

BERRAQUERO, F. Ruiz; BAYA, Ana M^a; CORMENZANA, A. Ramos. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, v. 17, n. 4, p. 399-406, 1976.

FANKEM, Henri et al. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by strains of *Pseudomonas fluorescens* isolated from acidic soils of Cameroon. **African Journal of Microbiology Research**, v. 2, n. 7, p. 171-178, 2008.

GAMALERO, Elisa et al. Saline and arid soils: Impact on bacteria, plants, and their interaction. **Biology**, v. 9, n. 6, p. 116, 2020.

GAMUYAO, Rico et al. The protein kinase Pstol1 from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. **Nature**, v. 488, n. 7412, p. 535-539, 2012.

SINGH, Prachi et al. Microbial community dynamics of extremophiles/extreme environment. In: **Microbial diversity in the genomic era**. Academic Press, 2019. p. 323-332.

TEIXEIRA, Paulo César et al. **Manual de métodos de análise de solo**. 2017.

WITHERS, Paul JA et al. Transitions to sustainable management of phosphorus in Brazilian agriculture. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018.

ZHU, Fengling et al. Isolation and characterization of a phosphate-solubilizing halophilic bacterium *Kushneria* sp. YCWA18 from Daqiao Saltern on the coast of Yellow Sea of China. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.