

# SOLUBILIZAÇÃO POTENCIAL DE FOSFATOS MEDIADA PELA MICROBIOTA RIZOSFÉRICA DE EUCALIPTO CULTIVADO EM TOPOSSEQUÊNCIA TÍPICA DA ZONA DA MATA MINEIRA

André Marcos Massenssini<sup>(1)</sup>, Marcos Rogério Tótola<sup>(2)</sup>, Arnaldo Chaer Borges<sup>(2)</sup> e Maurício Dutra Costa<sup>(2)\*</sup>

<sup>(1)</sup> Instituto Federal Goiano, *Campus Iporá*. Iporá, Goiás, Brasil.

<sup>(2)</sup> Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

\* Autor correspondente.

E-mail: mdcosta@ufv.br

## RESUMO

O uso de fosfatos naturais, aliado ao adequado manejo de microrganismos do solo solubilizadores de fosfato, é uma alternativa para reduzir os custos da adubação fosfatada. No entanto, ambas as práticas requerem a avaliação prévia do potencial da microbiota rizosférica em solubilizar fontes de P pouco reativas em condições de campo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial da microbiota do solo de solubilizar os fosfatos de Ca, Fe, Al, além dos fosfatos naturais de Araxá e Catalão em amostras de solo rizosférico e não rizosférico de plantio do híbrido *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla*, localizados em três pontos de uma topossequência típica da Zona da Mata de Minas Gerais. Adicionalmente, avaliou-se a atividade de fosfatases ácidas e alcalinas sob as mesmas condições experimentais. A microbiota rizosférica das plantas do topo e da baixada apresentou maior potencial de solubilização de fosfato de Ca (5.745,09 e 6.452,80 µg de P, respectivamente), enquanto o solo da encosta não apresentou diferenças entre as fontes inorgânicas testadas. O fosfato de Catalão foi a fonte de fosfato natural com maior potencial de solubilização (1.209,71 µg de P) pela microbiota do solo nas condições avaliadas. O pH final do meio de cultura correlacionou-se negativamente com os valores de P solubilizado, indicando que a acidificação do ambiente foi um dos mecanismos de solubilização utilizados pela microbiota rizosférica *in vitro*. A atividade das fosfatases ácida e alcalina foi maior na rizosfera de plantas do topo, área com maior teor de matéria orgânica. Não foi observada correlação clara entre o potencial de solubilização de fosfato ou a atividade das fosfatases com o diâmetro médio à altura do peito das árvores do plantio.

Recebido para publicação em 10 de junho de 2014 e aprovado em 19 de fevereiro de 2015.

DOI: 10.1590/01000683rbc20140339

**Este estudo demonstra o efeito da topografia no potencial de solubilização da microbiota do solo, que é influenciada positivamente pelo teor de matéria orgânica do solo.**

**Palavras-chave:** atividade microbiana, fosfomonoesterase, fosfato de rocha, microbiota do solo, rizosfera.

**ABSTRACT: POTENTIAL PHOSPHATE SOLUBILIZATION MEDIATED BY RHIZOSPHERIC MICROBIOTA OF EUCALYPTUS CULTIVATED IN A TYPICAL TOPOSEQUENCE OF THE ZONA DA MATA, MINAS GERAIS, BRAZIL**

*The use of rock phosphates, combined with proper management of soil microorganisms able to solubilize phosphate, is an alternative for reducing the costs of P fertilization. However, both practices require prior assessment of the potential of the rhizospheric microbiota in solubilizing P sources with low reactivity under field conditions. The objective of this study was to evaluate the potential of soil microbes to solubilize Ca, Fe, and Al phosphates, as well as Araxá and Catalão rock phosphates, in rhizospheric and bulk soil samples from hybrid Eucalyptus grandis × E. urophylla plantations located at three points in a typical toposequence from the state of Minas Gerais. Additionally, we evaluated the activity of acid and alkaline phosphatases under the same experimental conditions. The rhizospheric microbiota of plants from the top of the slope and from the lowland showed higher solubilization potential of Ca phosphate (5,745.09 and 6,452.80 µg P, respectively), whereas the soil from along the slope showed no difference among the inorganic sources tested. Catalão rock phosphate was the natural phosphate source with highest solubilization potential (1,209.71 µg P) by soil microbiota under the conditions evaluated. The final pH of the culture medium was negatively correlated with the values of solubilized P, indicating that acidification of the environment is one of the mechanisms used by soil microbiota in phosphate solubilization in vitro. The activity of acid and alkaline phosphatases was higher in the rhizosphere of plants from the top of the slope, an area with higher organic matter content. No clear correlation between phosphate solubilization potential or phosphatase activity with the average diameter at breast height of trees was observed. This study demonstrates the effect of topography on the solubilization potential of soil microbes, which is positively influenced by the organic matter content of the soil.*

*Keywords:* microbial activity, phosphomonoesterase, rock phosphate, soil microbiota, rhizosphere.

## INTRODUÇÃO

A área plantada com eucalipto no Brasil é de, aproximadamente, 4,5 milhões de hectares (Abraf, 2010). A vasta utilização dessa essência florestal para fins de reflorestamento deve-se, em parte, à rusticidade das plantas, capazes de tolerar condições de baixa fertilidade e elevada acidez (Barros et al., 1981), características comuns dos solos predominantes no Brasil. Mesmo com essas características, para obter boa produtividade, é necessária a utilização de fertilizantes (Barros et al., 1981). As formas de adubação fosfatada usuais baseiam-se na aplicação de fertilizantes químicos de alta solubilidade. A utilização de formas solúveis para a adubação requer a aplicação de doses superiores às necessárias ao crescimento da planta, tendo em vista que cerca de 90 % do P aplicado é rapidamente adsorvido às partículas de argila (Gonçalves et al., 1985).

Uma forma de reduzir os custos com a aplicação de P é usar os fosfatos naturais, que apresentam o inconveniente de possuírem baixa solubilidade e, portanto, são pouco disponíveis às plantas. Assim, uma das alternativas que pode potencializar a

utilização de fosfatos naturais é o uso ou o manejo adequado de microrganismos com capacidade de solubilizar essa fonte de P. Esses microrganismos, principalmente os associados às raízes, são capazes de promover o crescimento das plantas, apesar de constituírem pequena parcela da microbiota total do solo (Kucey, 1983). Esses microrganismos são geralmente encontrados em quantidades aproximadas de  $10^2$  a  $10^5$  unidades formadoras de colônia por g de solo seco (Sylvester-Bradley et al., 1982; Nahas et al., 1994b).

Entre os microrganismos solubilizadores de fosfato, as bactérias são encontradas em maior número e, entre elas, as gram-negativas são mais eficientes em solubilizar fosfatos por meio da oxidação extracelular de glicose a ácido glucônico pela quinoproteína glicose desidrogenase (Goldstein et al., 1999). Entretanto, os organismos com maior capacidade de solubilização são isolados fúngicos de *Aspergillus* e *Penicillium* (Nahas, 1996; Silva Filho et al., 2002; Mendes et al., 2014).

A solubilização de fontes insolúveis de fosfato pode ocorrer em razão da excreção de ácidos orgânicos pelos microrganismos, que solubilizam

esses fosfatos por meio da acidificação do ambiente (Nautiyal et al., 2000). No entanto, Kpombrekou-A e Tabatabai (1994) demonstraram que a habilidade dos ácidos orgânicos em solubilizar fosfatos não é dependente apenas do pH, mas também de características estruturais desses ácidos que estão envolvidas na quelação de cátions, o que desloca o equilíbrio no sentido dos produtos solubilizados. Os autores demonstraram também que, em baixas concentrações (1 mmol L<sup>-1</sup>), os ácidos orgânicos são mais efetivos na solubilização de fosfatos de rocha menos reativos, provavelmente em razão da menor quantidade de carbonatos livres, que poderiam consumir a acidez, diminuindo a reação do ácido com o fosfato. Mendes et al. (2014) demonstraram que a liberação de ácidos orgânicos é o principal mecanismo usado por algumas espécies fúngicas para solubilizar fosfatos de rocha. Em outro estudo, Mendes et al. (2013) observaram que a liberação de fluoreto, que ocorre durante a solubilização dos fosfatos de rocha, influencia negativamente o processo de solubilização de fosfato por *Aspergillus niger*.

A importância desse grupo de microrganismos no suprimento de P para as plantas já foi demonstrado em vários trabalhos (Azcon et al., 1976; Freitas et al., 1997; Gyaneshwar et al., 2002), e sua efetividade depende da interação desses com a planta hospedeira. Isso é justificado pela variação que existe na composição dos exsudatos radiculares em relação à espécie da planta e sua condição nutricional (Grayston et al., 1996). Portanto, entender os processos mediados por esses microrganismos, bem como os fatores ambientais que influem nesses processos, torna-se muito importante para o estabelecimento de práticas de manejo adequadas, que visam reduzir a dependência dos produtores em relação aos fertilizantes mais onerosos, promovendo o bom desenvolvimento das plantas e maior produtividade por área.

O potencial de solubilização é uma medida da capacidade que a microbiota do solo possui de solubilizar determinada fonte insolúvel de fosfato em condições de crescimento próximas das ideais. Esse dado, apesar de não ser uma medida do processo *in situ*, é capaz de fornecer informações sobre a composição das populações de organismos solubilizadores presentes em determinada amostra. Espera-se que populações com maior potencial de solubilização *in vitro* sejam capazes de solubilizar maior quantidade de P *in situ*. No entanto, fatores como a quantidade e qualidade dos exsudatos radiculares podem interferir o desempenho dessas populações (Nautiyal et al., 2000) ou promover a seleção de espécies com menor potencial de solubilização (Garbeva et al., 2004).

A região de Viçosa caracteriza-se por possuir o relevo acidentado típico do domínio de “mar de morros”, com elevações em meia-laranja, de vertente côncavo-convexa. Essa conformação de relevo resulta em heterogeneidade no crescimento

das plantas de eucalipto, resultante possivelmente de diferenças físico-químicas do solo entre as posições topográficas. As propriedades do solo podem influir na atividade microbiana, especialmente nos processos relacionados à disponibilização de nutrientes que são determinantes para a produtividade dessas áreas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de solubilização de P pela microbiota da rizosfera de plantas do híbrido *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* e do solo não rizosférico em áreas situadas em diferentes posições topográficas na região de Viçosa, MG.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Associações Simbióticas Micorrízicas do Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, BIOAGRO, Viçosa, MG.

Estudaram-se o potencial de solubilização microbiana de fosfato e a atividade de fosfatases ácidas e alcalinas de solo sob plantio clonal do híbrido *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* com 2,5 anos de idade e espaçamento 3 × 3 m, localizado no município de Viçosa, MG. A área apresenta topografia típica de meia-laranja de vertente côncavo-convexa, resultando em três posições topográficas distintas: topo (20° 48' 10,0" S e 42° 54' 08,4" O), encosta (20° 48' 07,0" S e 42° 54' 0,57" O) e baixada (20° 48' 03,2" S e 42° 54' 05,7" O). Em cada posição topográfica foi delimitada uma parcela de 60 m<sup>2</sup>, sendo cada uma delas caracterizada por apresentar diferenças marcantes no crescimento das árvores e no depósito de serapilheira (Quadro 1). O diâmetro médio representa a média de diâmetro à altura do peito (DAP) das 100 árvores constituintes da parcela em cada posição topográfica. As árvores foram divididas em três classes de diâmetro (inferior, médio e superior) com base na média geral de DAP e no desvio-padrão (Quadro 1).

Amostras compostas do solo das três parcelas foram coletadas na camada de 0-20 cm para a caracterização física e química (Quadro 2). Para quantificar o potencial de solubilização da microbiota do solo e para determinar a atividade de fosfomonoesterases, foi coletada uma amostra composta de solo rizosférico, definido como aquele que permanece aderido às raízes após leve agitação, de três árvores de cada classe de diâmetro, totalizando nove árvores amostradas em cada posição topográfica. Além disso, foram coletadas três amostras compostas de solo não rizosférico em cada uma das três posições topográficas. No total, foram coletadas 36 amostras compostas, que foram imediatamente transportadas para o laboratório para realização das análises microbiológicas.

**Quadro 1. Classes de diâmetro, diâmetro médio e quantidade de serapilheira de um plantio clonal do híbrido de *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* com 2,5 anos de idade, plantado em três posições topográficas distintas (Topo, Encosta, Baixada) da região de Viçosa, MG**

Posição topográfica	Classe de diâmetro			Diâmetro médio	Serapilheira <sup>(1)</sup>
	Inferior	Médio	Superior		
	cm				kg ha <sup>-1</sup>
Topo	<7,3	9 a 10	>12,2	9,7	2.460 a
Encosta	<5,3	7,6 a 8,6	>10,5	7,8	1.239 c
Baixada	<8,7	11,7 a 12,5	>14,7	11,7	1.730 b

<sup>(1)</sup> Dados extraídos de Zambrano (2007).

O potencial de solubilização de formas inorgânicas de P foi determinado de acordo com o método estabelecido por Debnath et al. (1994), incubando-se 1 g de solo úmido em 15 mL de meio NBRIP líquido (Nautiyal, 1999), com adição de diferentes fontes insolúveis de P (Ca<sub>5</sub>P<sub>3</sub>HO<sub>13</sub>, AlPO<sub>4</sub>, FePO<sub>4</sub>), em quantidade equivalente a 15 mg de P, em tubos de ensaio a 28 °C por 15 dias, com três repetições. Um tratamento-controle, sem a adição de P, foi também incluído. Ao final do experimento, o pH do sobrenadante foi medido e a estimativa do P solúvel foi feita pelo método colorimétrico descrito por John (1970).

O experimento constituiu-se de fatorial 3 × 4, referente a três posições topográficas e a quatro fontes de P, com parcelas subdivididas correspondentes aos quatro solos de procedência distinta (solo rizosférico de árvores das três classes de DAP e solo não rizosférico), sendo montado com três repetições. No laboratório, o experimento foi conduzido em triplicata.

Em outro experimento, o potencial de solubilização de fosfatos naturais foi determinado de acordo com o método estabelecido por Debnath et al. (1994), incubando-se 1 g de solo úmido de cada amostra em 15 mL de meio NBRIP líquido (Nautiyal, 1999), com adição de fosfatos naturais de baixa reatividade (fosfato de Catalão, 36 % de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; fosfato de Araxá, 24 % de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), em quantidade equivalente a 15 mg de P, em tubos de ensaio a 28 °C por 15 dias, com três repetições. Um tratamento-controle, sem adição de P, foi também incluído. Ao final do experimento, o pH do sobrenadante foi medido e a estimativa do P solúvel foi feita pelo método colorimétrico descrito por John (1970).

O experimento constituiu-se de fatorial 3 × 3, referente a três posições topográficas e a três fontes de P, com parcelas subdivididas correspondentes aos quatro solos de procedência distinta (solo rizosférico das três classes de diâmetro de árvores e solo não rizosférico), sendo montado com três repetições. O experimento foi conduzido em laboratório em triplicata.

A atividade das fosfatases ácida e alcalina foi avaliada conforme método descrito por Tabatabai (1994), que envolve a determinação colorimétrica do p-nitrofenol liberado quando amostras de solo são incubadas com solução tamponada de p-nitrofenil fosfato e tolueno.

**Quadro 2. Características químicas e físicas do solo de área cultivada com o híbrido de *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* com 2,5 anos de idade, em três posições topográficas distintas (Topo, Encosta, Baixada) da região de Viçosa, MG**

Característica	Posição Topográfica		
	Topo	Encosta	Baixada
H(H <sub>2</sub> O) (1:2,5)	4,86	4,43	4,75
Al <sup>3+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> ) <sup>(1)</sup>	0,82	0,67	0,43
Ca <sup>2+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> ) <sup>(1)</sup>	0,17	0,00	0,56
Mg <sup>2+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> ) <sup>(1)</sup>	0,40	0,05	0,40
H+Al (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> ) <sup>(2)</sup>	10,5	8,6	6,8
K (mg dm <sup>-3</sup> ) <sup>(3)</sup>	40,0	19,0	37,0
P (mg dm <sup>-3</sup> ) <sup>(3)</sup>	2,2	0,9	1,3
P-remanescente (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>(4)</sup>	17,0	16,6	22,6
MO (dag kg <sup>-1</sup> ) <sup>(5)</sup>	5,50	3,84	3,84
SB (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,67	0,10	1,05
(cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	1,49	0,77	1,48
T (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	11,17	8,70	7,85
m (%)	55,0	87,0	29,1
V (%)	6,0	1,1	13,4
Areia grossa (%)	22	22	35
Areia fina (%)	11	12	11
Silte (%)	5	7	7
Argila (%)	62	59	47
Classe textural	Muito Argilosa	Argilosa	Argilo-arenosa

<sup>(1)</sup> Extrator KCl 1 mol L<sup>-1</sup>. <sup>(2)</sup> Extrator acetato de cálcio 0,5 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0. <sup>(3)</sup> Extrator Mehlich-1. <sup>(4)</sup> Concentração de P na solução de equilíbrio, após agitar por 1 h o solo com CaCl<sub>2</sub> 0,01 mol L<sup>-1</sup>, contendo 60 mg L<sup>-1</sup> de P em relação solo:solução de 1:10. <sup>(5)</sup> Método Walkey-Black.

O experimento foi montado com parcelas subdivididas, onde as três posições topográficas corresponderam às parcelas e aos quatro solos de procedência distinta (solo rizosférico das três classes de diâmetro de árvores e solo não rizosférico), as sub-parcelas, sendo montado com três repetições. No laboratório, o experimento foi conduzido em triplicata.

Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos à análise de variância, e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Duncan a 5 % de significância. Foram analisadas, também, as correlações simples de Pearson entre P solubilizado e pH a 5 % de significância.

## RESULTADOS

O potencial de solubilização de fontes inorgânicas de P pela microbiota do solo foi influenciado de forma significativa pelas fontes de P utilizadas e pela posição topográfica, apresentando interação significativa entre os dois fatores (Quadro 3). Os maiores valores médios de P solubilizado foram observados na baixada e no topo (6.452,80 e 5.745,09 µg de P, respectivamente), ambos na presença de fosfato de Ca (Quadro 4). Na presença dos fosfatos de Fe e Al não foram encontradas diferenças significativas entre as três posições topográficas (Quadro 4).

Pôde-se observar que, mesmo o fosfato de Al apresentando potencial de solubilização muito maior que o observado para o fosfato de Fe, não foi detectada diferença estatística entre eles (Quadro 4). Isso pode ser atribuído ao elevado coeficiente de variação dos dados (70,94 %), que impossibilitou a detecção

dessas diferenças. Essa elevada variação espacial no potencial de solubilização da comunidade microbiana do solo é uma importante característica que deve ser considerada em metodologias adotadas em campo.

O pH final do sobrenadante apresentou correlação negativa (-0,196;  $p < 0,001$ ) com a quantidade de P solubilizado. No entanto, quando as correlações foram analisadas em cada fonte de P, foram observados elevados coeficientes, principalmente na presença dos fosfatos de Al (-0,730;  $p < 0,001$ ) e Ca (-0,680;  $p < 0,001$ ) (Quadro 5).

O potencial de solubilização de fosfatos naturais foi influenciado pelas fontes de P utilizadas, pela posição topográfica e pela classe de diâmetro das árvores, apresentando interação significativa entre esses fatores (Quadro 3). O maior potencial de solubilização foi observado em solo rizosférico de árvores de diâmetro médio do topo na presença do fosfato de Catalão (Quadro 6). Essa fonte foi a mais solubilizada em todas as posições topográficas, geralmente apresentando valores entre 166,89 e 619,34 µg de P (Quadro 6).

A microbiota do solo sob as diferentes classes de diâmetro das árvores apresentou diferenças no potencial de solubilização de fosfato de Catalão

**Quadro 3. Resultados da ANOVA para os dados de potencial de solubilização de fosfatos pela microbiota total em solos sob plantio do híbrido *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* com 2,5 anos de idade na região de Viçosa, MG**

Fonte de P	Potencial de solubilização	
	F	Significância
Inorgânica <sup>(1)</sup>		
Topografia	185,57***	0,0001
Classe de diâmetro	0,51	0,0001
Fonte de P	220,22***	0,0001
Topografia × classe de diâmetro	1,43	0,2141
Topografia × fonte de P	38,89***	0,0001
Classe × fonte de P	1,26	0,2737
Topografia × classe de diâmetro × fonte de P	1,63	0,0759
Fosfato natural		
Topografia	22,07***	0,0001
Classe de diâmetro	27,83***	0,0001
Fonte de P	345,21***	0,0001
Topografia × classe de diâmetro	6,63***	0,0001
Topografia × fonte de P	27,05***	0,0001
Classe × fonte de P	21,02***	0,0001
Topografia × classe de diâmetro × fonte de P	6,43***	0,0001

<sup>(1)</sup>CaPO<sub>4</sub>, FePO<sub>4</sub>, AlPO<sub>4</sub>. \*\*\*: significativo a 0,1 %.

**Quadro 4. Potencial de solubilização de fosfato de cálcio, ferro e alumínio, em solos sob plantio do híbrido *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* com 2,5 anos de idade, em três posições topográficas distintas (Topo, Encosta, Baixada) na região de Viçosa, MG**

Topografia	Fonte inorgânica de P			
	Ca <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fe <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	Al <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	Controle
	µg de P			
Topo	5.745,09 Aa	61,72 Ab	345,78 Ab	15,04 Ab
Encosta	865,12 Ba	24,03 Aa	508,82 Aa	11,66 Aa
Baixada	6.452,80 Aa	19,21 Ab	362,07 Ab	14,26 Ab

Na coluna, em cada posição topográfica, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5 %. Na linha, médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5 %. Controle: sem adição de fosfato.

**Quadro 5. Correlações entre potencial de solubilização de fosfato e pH final do sobrenadante na presença de fontes inorgânicas de P e fosfatos naturais**

Fonte de P	Correlação	Significância
CaPO <sub>4</sub>	-0,68	0,0001
FePO <sub>4</sub>	-0,45	0,0001
AlPO <sub>4</sub>	-0,73	0,0001
Catalão	-0,42	0,0001
Araxá	-0,20	0,0001

(Quadro 6). O mesmo não foi observado para o fosfato de Araxá. A posição topográfica influenciou a solubilização apenas do solo rizosférico de árvores de diâmetro médio na presença de fosfato de Catalão.

O pH final do sobrenadante dos tubos apresentou correlação negativa com o P solubilizado (-0,427;  $p < 0,0001$ ) (Quadro 5).

A atividade de fosfomonoesterases ácida e alcalina apresentou diferenças quanto à posição topográfica e à classe de diâmetro das árvores (Quadro 7). As fosfatases ácida e alcalina apresentaram maior atividade nos solos rizosféricos do topo, em relação às demais posições topográficas. Esses resultados foram atribuídos ao maior teor de matéria orgânica (MO) presente nesse solo (Quadro 2), bem como à maior produção de serapilheira nesta área.

A atividade da fosfatase ácida observada neste trabalho variou de 24,50 a 190,67  $\mu\text{g}$  de  $p$ -nitrofenol  $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$  (Quadro 7). A atividade da fosfatase alcalina observada neste trabalho variou de 0,70 a 20,55  $\mu\text{g}$  de  $p$ -nitrofenol  $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$  (Quadro 7).

## DISCUSSÃO

A solubilização de fosfatos pela microbiota do solo foi estimulada pela adição dos fosfatos de Ca e de Catalão (Quadros 4 e 6). Entretanto, a adição dos fosfatos de Fe, de Al e de Araxá não foi capaz de estimular a solubilização de fosfato pela microbiota

do solo. Os fosfatos de Fe e Al são as formas menos reativas que o fosfato de Ca (Mendes et al., 2014). Por sua vez, o fosfato de Araxá é menos reativo que o fosfato de Catalão (Oliveira, 2011). Isso sugere que os microrganismos presentes no solo estudado são capazes de tornar fontes insolúveis de fosfato disponíveis às plantas. No entanto, essa capacidade se restringe às fontes insolúveis de maior reatividade.

A correlação negativa e significativa observada neste trabalho entre o potencial de solubilização da microbiota e o pH do meio está de acordo com os resultados obtidos por Nahas et al. (1994b), que avaliaram a solubilização de fosfato por diversos isolados bacterianos e fúngicos *in vitro*. Esse tipo de correlação indica que a redução do pH do meio, pela liberação de prótons ou pela produção de ácidos orgânicos, é o principal mecanismo empregado na solubilização dos fosfatos (Asea et al., 1988; Nautiyal et al., 2000). Assim, para os fosfatos de Ca e Al, a redução do pH do meio foi o principal mecanismo empregado pela microbiota do solo para promover sua solubilização. No entanto, outros mecanismos secundários podem estar envolvidos, uma vez que a produção de ácidos orgânicos é uma estratégia que ao mesmo tempo em que reduz o pH do ambiente também atua no consumo dos produtos da solubilização, deslocando o equilíbrio da reação e promovendo maior solubilização das fontes de P (Kpombrekou-A e Tabatabai, 1994).

A variação encontrada no potencial de solubilização da microbiota entre as diferentes fontes inorgânicas de P estudadas se deve também

**Quadro 6. Potencial de solubilização em solos cultivados com o híbrido *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* com 2,5 anos de idade, em três posições topográficas distintas (Topo, Encosta, Baixada) e dividido em diferentes classes de diâmetro (superior, médio e inferior), na região de Viçosa, MG, na presença de diferentes fosfatos naturais**

Fosfato	Superior	Médio	Inferior	Não rizosférico
$\mu\text{g}$ de P				
Topo				
Catalão	619,34 Ab	1209,71 Aa	336,98 Ac	504,56 Ab
Araxá	56,43 Ba	56,75 Ba	51,66 Ba	52,21 Ba
Controle	26,44 Ba	17,24 Ba	17,53 Ba	17,34 Ba
Encosta				
Catalão	222,64 Ab	523,71 Aa	166,89 Ab	230,08 Ab
Araxá	47,54 Ba	42,71 Ba	27,08 Ba	28,13 Ba
Controle	17,56 Ba	17,40 Ba	17,43 Ba	17,52 Ba
Baixada				
Catalão	243,11 Ac	447,20 Ab	214,47 Ac	583,25 Aa
Araxá	52,37 Ba	94,59 Ba	28,83 Ba	57,56 Ba
Controle	16,82 Ba	29,28 Ba	16,82 Ba	38,97 Ba

Na coluna, em cada posição topográfica, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. Na linha, médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. Controle: sem adição de fosfato. Na posição Topo, classe Inferior DAP <7,3 cm, classe Média DAP entre 9 e 10 cm e classe Superior DAP >12,2 cm. Na posição Encosta, classe Inferior DAP <5,3 cm, classe Média DAP entre 7,6 e 8,6 cm e classe Superior DAP >10,5 cm. Na posição Baixada, classe Inferior DAP <8,7 cm, classe Média DAP entre 11,7 e 12,5 cm e Superior DAP >14,7 cm.

**Quadro 7. Atividade de fosfatases ácida e alcalina, em solos sob plantio do híbrido *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* com 2,5 anos de idade, em três posições topográficas distintas (Topo, Encosta, Baixada) e dividido em diferentes classes de diâmetro (superior, médio e inferior), na região de Viçosa, MG**

Posição topográfica	Fosfatase ácida				Fosfatase alcalina			
	Superior	Médio	Inferior	Não rizosférico	Superior	Médio	Inferior	Não rizosférico
	µg de p-nitrofenol g <sup>-1</sup> de solo h <sup>-1</sup>							
Topo	187,69 Aa	190,67 Aa	161,65 Ab	28,92 Ac	20,44 Aa	20,55 Aa	16,80 Ab	1,31 Ac
Encosta	40,88 Ba	35,81 Ba	28,61 Ba	24,50 Aa	3,07 Ba	2,00 Ba	2,79 Ba	0,70 Aa
Baixada	27,12 Ba	31,21 Ba	31,64 Ba	28,05 Aa	2,72 Ba	3,38 Ba	3,02 Ba	2,58 Aa

Na coluna, em cada posição topográfica, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5 %. Na linha, médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5 %. Na posição Topo, classe Inferior DAP <7,3 cm, classe Média DAP entre 9 e 10 cm e classe Superior DAP >12,2 cm. Na posição Encosta, classe Inferior DAP <5,3 cm, classe Média DAP entre 7,6 e 8,6 cm e classe Superior DAP >10,5 cm. Na posição Baixada, classe Inferior DAP <8,7 cm, classe Média DAP entre 11,7 e 12,5 cm e Superior DAP >14,7 cm.

às características químicas de cada fonte. O fosfato de Ca é mais sensível a reduções do pH do meio comparado aos fosfatos de Fe e Al (Mendes et al., 2014). Isso indica que apenas a acidificação do ambiente promovida pela microbiota do solo seja suficiente para promover a solubilização do fosfato de Ca. No entanto, estudos anteriores sugerem que a redução do pH não é eficiente para solubilizar os fosfatos de Fe e Al, e que a quelatação dos produtos da solubilização por ácidos orgânicos é um mecanismo mais eficiente na solubilização desses fosfatos (Kpombekou-A e Tabatabai, 1994).

Neste trabalho, foi observada correlação negativa e significativa entre a solubilização de fosfato de Al e o pH do meio, o que sugere que a redução do pH do meio seja o principal mecanismo envolvido na solubilização desse tipo de fosfato pela microbiota do solo. Esse resultado contraria os resultados obtidos por Mendes et al. (2014), que demonstraram que a redução do pH do meio é um mecanismo secundário na solubilização deste tipo de fosfato por isolados fúngicos. No entanto, a maior diversidade de microrganismos avaliada neste estudo, aliada à presença de partículas do solo no meio de cultura, indicaram que, no solo, as estratégias para solubilização de fosfatos inorgânicos podem ser diferentes daquelas observadas *in vitro*.

As variações observadas entre as diferentes posições topográficas podem ser em razão da quantidade de MO encontrada em cada local. No topo, o maior teor de MO (Quadro 2), aliado à maior quantidade de serapilheira (Quadro 1), pode suportar uma comunidade maior de microrganismos, o que foi demonstrado em estudos prévios, em que a contagem de microrganismos do solo correlacionou-se positivamente com o teor de MO do solo (Nahas et al., 1994a). O solo da baixada, apesar de possuir teor de MO semelhante ao solo da encosta (Quadro 2), possui maior quantidade de serapilheira. Assim, o teor de MO do topo e

da baixada pode favorecer o desenvolvimento de maiores comunidades microbianas, em relação à encosta, o que sugere que há também maior número de microrganismos solubilizadores de fosfato (Nahas et al., 1994b).

Considerando-se os resultados obtidos para os fosfatos naturais, o fosfato de Catalão é mais eficientemente solubilizado pela microbiota do solo, quando comparado ao de Araxá, o que sugere sua utilização como fertilizante fosfatado na área estudada. As correlações entre o pH final do meio e a solubilização dos fosfatos naturais corroboram com os resultados obtidos por Nahas et al. (1994b), indicando que, ao contrário do que foi observado para as fontes inorgânicas, a acidificação do ambiente não é o principal mecanismo envolvido na solubilização das fontes naturais de P. Esses resultados demonstraram que a microbiota do solo é capaz de utilizar mais de um mecanismo para promover a solubilização dos fosfatos naturais.

O P ligado à fração orgânica do solo constitui importante reservatório desse nutriente em solos tropicais (Santos et al., 2008). A capacidade da microbiota do solo de promover a ciclagem desse P pode ser determinante para o crescimento de plantas (Conte et al., 2003). Neste estudo, a atividade das fosfatases ácida e alcalina foi maior em solo rizosférico do topo, onde havia maior teor de MO e maior quantidade de serapilheira. Estudos anteriores demonstraram que a atividade de fosfatases correlaciona-se positivamente com o teor de MO do solo (Venkatesan e Senthurpandian, 2006) e com a presença de serapilheira (Dornbush, 2007). A menor atividade de fosfatases no solo não rizosférico, em relação ao solo rizosférico, se deve à baixa densidade de populações microbianas, bem como ao menor teor de C, o que limita a atividade microbiana e a produção de tais enzimas (Chen, 2003). Além disso, a fosfatase alcalina apresentou menor atividade em relação à fosfatase ácida, o que é comum em solos com baixos valores de pH,

possivelmente em razão do controle da secreção dessas enzimas pela microbiota em relação à concentração de  $H^+$  no solo (Nahas et al., 1982), aliado à menor atividade dessas enzimas em meios com baixos valores de pH.

Os microrganismos do solo estão envolvidos em importantes processos ecológicos e são capazes de disponibilizar nutrientes para as plantas, promovendo o crescimento vegetal em condições naturais. Os resultados encontrados aqui sugerem que a microbiota do solo possui elevado potencial de solubilização de fontes insolúveis de fosfato, utilizando diferentes mecanismos para promover a solubilização das fontes de fosfato estudadas, o que demonstra a versatilidade e a importância ecológica desse grupo de microrganismos. Ao se avaliar o potencial de solubilização de fosfato da microbiota do solo associada a árvores que apresentavam crescimento diferente, não foi possível observar uma tendência clara que demonstrasse a correlação do potencial de solubilização com o crescimento das plantas. Isso indica que a função desempenhada pelo grupo de microrganismos em questão não é a principal responsável pelo crescimento heterogêneo das plantas. Além disso, os dados obtidos apresentaram elevado coeficiente de variação, o que indica grande heterogeneidade espacial na densidade e, ou, diversidade das populações desses microrganismos.

## CONCLUSÕES

A solubilização de fosfatos inorgânicos e naturais pela microbiota do solo variou em relação à posição topográfica, sendo positivamente influenciada pelo teor de matéria orgânica.

A microbiota do solo é capaz de utilizar diferentes mecanismos na solubilização de fontes insolúveis de fosfato, sendo a redução do pH a principal estratégia para solubilizar os fosfatos de cálcio e alumínio.

O potencial de solubilização de fosfato da microbiota do solo apresenta grande variabilidade espacial, indicando grande heterogeneidade na densidade e, ou, diversidade das populações desses microrganismos.

## REFERÊNCIAS

Asea PEA, Kucey RMN, Stewart JWB. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. *Soil Biol Biochem.* 1988;20:459-64.

Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas - Abraf. [Acesso: 27 fev 2010]. Disponível em: <http://www.abraflor.org.br/estatisticas.asp>.

Azcon R, Barea JM, Hayman DS. Utilization of rock phosphate in alkaline soils by plants inoculated with mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing bacteria. *Soil Biol Biochem.* 1976;8:135-8.

Barros NF, Braga JM, Brandi RM, Defelipo BV. Produção de eucalipto em solos de cerrados em resposta à aplicação de NPK e de B e Zn. *R Árvore.* 1981;5:90-103.

Chen H. Phosphatase activity and P fractions in soils of an 18-year-old Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) plantation. *For Ecol Manage.* 2003;178:301-10.

Conte E, Anghinoni I, Rheinheimer DS. Frações de fósforo acumuladas em Latossolo argiloso pela aplicação de fosfato no sistema plantio direto. *R Bras Ci Solo.* 2003;27:893-900.

Debnath A, Das AC, Mukherjee D. Studies on the decomposition of non-conventional organic wastes in soil. *Microbiol Res.* 1994;149:195-201.

Dornbush ME. Grasses, litter, and their interaction affect microbial biomass and soil enzyme activity. *Soil Biol Biochem.* 2007;39:2241-9.

Freitas JR, Banerjee MR, Germida JJ. Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol Fertil Soils.* 1997;24:358-64.

Garbeva P, van Venn JA, van Elsas JP. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plants and soil type and implications for disease suppressiveness. *Ann Rev Phytopatol.* 2004;42:243-70.

Goldstein AH, Braverman K, Osorio N. Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate-limiting desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) rhizobacterium. *FEMS Microbiol Ecol.* 1999;30:295-300.

Gonçalves JLM, Firme DJ, Novais RF, Ribeiro AC. Cinética de adsorção de fósforo em solos de cerrado. *R Bras Ci Solo.* 1985;9:107-11.

Grayston SJ, Vaughan D, Jones D. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Appl Soil Ecol.* 1996;5:29-56.

Gyaneshwar P, Kumar GN, Parekh LJ, Poole PS. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil.* 2002;245:83-93.

John MK. Colorimetric determination of phosphorus in soil and plant materials with ascorbic acid. *Soil Sci.* 1970;109:214-20.

Kpombekou-A K, Tabatabai MA. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Sci.* 1994;158:442-53.

Kucey RMN. Phosphate solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Can J Soil Sci.* 1983;63:671-8.

Mendes GO, Freitas ALM, Pereira OL, Silva IR, Vassilev NB, Costa MD. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Ann Microbiol.* 2014;64:239-49.

Mendes GO, Vassilev NB, Bonduki VHA, Silva IR, Ribeiro Jr. JI, Costa MD. Inhibition of *Aspergillus niger* phosphate solubilization by fluoride released from rock phosphate. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79:4906-13.

Nahas E, Centurion JF, Assis LC. Efeito das características químicas dos solos sobre os microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases. *R Bras Ci Solo.* 1994a;18:49-53.

- Nahas E, Centurion JF, Assis LC. Microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases de vários solos. R Bras Ci Solo. 1994b;18:43-8.
- Nahas E, Terenzi HF, Rossi A. Effect of carbon source and pH on the production and secretion of acid phosphatase (EC 3.1.3.2.) and alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1.) in *Neurospora crassa*. J Genet Microbiol. 1982;128:2017-21.
- Nahas E. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. World J Microbiol Biotechnol. 1996;12:567-72.
- Nautiyal CS, Bhadauria S, Kumar P, Lal H, Mondal R, Verma D. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. FEMS Microbiol Lett. 2000;182:291-6.
- Nautiyal CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiol Lett. 1999;170:265-70.
- Oliveira SC. Fontes de carbono e minerais na solubilização de fosfato natural não reativo por *Aspergillus niger* [dissertação]. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa; 2011.
- Santos DR, Gatiboni LC, Kaminski J. Fatores que afetam a disponibilidade do fósforo e o manejo da adubação fosfatada em solos sob sistema plantio direto. Ci Rural. 2008;38:576-86.
- Silva Filho GN, Narloch C, Scharf R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. Pesq Agropec Bras. 2002;37:847-54.
- Sylvester-Bradley R, Asakawa N, Torraca S, Magalhães FMM, Oliveira LA, Pereira RM. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. Acta Amaz. 1982;12:15-22.
- Tabatabai MA. Soil enzymes. In: Weaver RW, Angle JS, Bottomley PS, Bezdicek D, Smith S, Tabatabai A, Wollum A, editors. Methods of soil analysis. Microbiological and biochemical properties. Madison: Soil Science Society of America; 1994. Pt. 2. v.5. p.775-833.
- Venkatesan S, Senthurpandian VK. Comparison of enzyme activity with depth under tea plantations and forested sites in south India. Geoderma. 2006;137:212-6.
- Zambrano JA. Acúmulo de ácido oxálico e cristais de oxalato de cálcio em ectomicorrizas de eucalipto [dissertação]. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa; 2007.