



ARTIGO

Potencial *in vitro* para solubilização de fosfato por *Trichoderma* spp.

Priscila Pauly Ribas^{1*}, Rosane Rech², Aida Terezinha dos Santos Matsumura³ e
Sueli Teresinha Van Der Sand¹

Recebido: 14 de março de 2014 Recebido após revisão: 18 de junho de 2015 Aceito: 3 de maio de 2016
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/2967>

RESUMO: (Potencial *in vitro* para solubilização de fosfato por *Trichoderma* spp.). O fósforo é um nutriente essencial para o desenvolvimento das plantas, entretanto, a maior parte deste nutriente presente no solo se encontra na forma de fosfatos inorgânicos, que não podem ser utilizados pelas mesmas. Alguns microrganismos presentes na rizosfera são capazes de atuar solubilizando o fosfato inorgânico, auxiliando no desenvolvimento vegetal. *Trichoderma* sp. é um fungo amplamente utilizado como agente de controle biológico de doenças de plantas e encontra-se associado às suas raízes. Este trabalho visou avaliar o potencial *in vitro* de diferentes isolados de *Trichoderma* spp. para a solubilização de fosfato de cálcio em meio PVK, e sua capacidade de acidificação do meio e produção de enzimas fosfatases. Todos os isolados foram capazes de solubilizar fosfato no meio e demonstraram correlação entre a solubilização de fosfato de cálcio e a acidificação do meio de cultura. O isolado ICB08 (*T. asperellum*) solubilizou maior concentração de fosfato no meio em relação aos demais isolados, quando considerado o intervalo de tempo analisado. Todos os isolados apresentaram atividade enzimática, variando em concentração e tipo de fosfatase produzida. Também foi possível estabelecer correlação entre a solubilização de fosfato e a produção de enzimas fosfatases. O isolado ICB18 (*T. asperellum*) obteve a maior atividade enzimática no período de tempo avaliado e produziu fosfatase ácida e fosfatase alcalina. Foi possível concluir que os diferentes isolados possuem potencial de solubilização, tanto através da acidificação do meio quanto pela produção de fosfatase ácida e fosfatase alcalina.

Palavras-chave: fosfato de cálcio, meio PVK, fosfatase ácida, fosfatase alcalina.

ABSTRACT: (*In vitro* potential for phosphate solubilization by *Trichoderma* spp.). Phosphorus is an essential nutrient for plant growth; however, most of it in the soil is in the form of inorganic phosphate, which cannot be used by plants. Some rhizosphere microorganisms are able to solubilize inorganic phosphate, aiding in plant development. *Trichoderma* sp. is a fungus widely used as biological control agent of plant diseases, being found associated with roots. We evaluated the *in vitro* potential of *Trichoderma* spp. isolates for solubilizing calcium phosphate in PVK medium, and their ability to acidify the medium and produce phosphatase enzymes. All isolates were able to solubilize phosphate in the medium and showed correlation between the solubility of calcium phosphate and acidification of the culture medium. Isolate ICB08 (*T. asperellum*) solubilized higher concentrations of phosphate in the medium than the other isolates, in the tested time interval. All isolates showed enzymatic activity, varying in concentration and type of phosphatase produced. Phosphate solubilization also showed correlation with phosphatase production. Isolate ICB18 (*T. asperellum*) showed the highest enzyme activity in the tested time period, producing both acid and alkaline phosphatases. We concluded that the isolates showed potential for solubilization, through both acidification of the culture medium and production of acid and alkaline phosphatases.

Keywords: Calcium phosphate, PVK medium, acid phosphatase, alkaline phosphatase.

INTRODUÇÃO

O fósforo é um componente de diversas moléculas, como ácidos nucleicos, fosfolípidios e ATP e conseqüentemente, as plantas não podem crescer sem a suplementação desse nutriente, que representa cerca de 0,2 % do peso seco das mesmas (Kapri & Tewari 2010). O fósforo inorgânico também está envolvido no controle de reações enzimáticas e na regulação de vias metabólicas (Schachtman *et al.* 1998). Depois do nitrogênio, o fósforo é o mais frequente macronutriente limitador do crescimento das plantas, uma vez que 95-99 % do fósforo presente no solo se encontra na forma de fosfatos insolúveis, que não podem ser utilizados pelas plantas (Pradhan & Sukla 2005).

Diversos microrganismos do solo, principalmente da rizosfera podem atuar solubilizando formas indisponíveis de fosfato (Maheswar & Sathiyavani 2012). Os fungos têm sido relatados por possuir maior habilidade de solubilização do que bactérias (Nahas 2002). A capacidade de solubilização de fosfatos é correlacionada com a habilidade de produção de ácidos orgânicos e/ou polissacarídeos extracelulares pelos microrganismos (Kim *et al.* 1997, Omar 1998, Souchie *et al.* 2007) bem como pela produção de enzimas fosfatases, que promovem a hidrólise do fosfato, transformando o fosfato orgânico em uma forma solúvel de fosfato inorgânico (Leitão *et al.* 2010).

A inoculação de microrganismos solubilizadores de fosfatos ou o manejo de suas populações têm sido suge-

1. Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Rua Sarmento Leite, 500, sala 150, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

2. Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos, UFRGS. Avenida Bento Gonçalves, 9500, Campus do Vale, Prédio 43212, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

3. ICB BIOAGRITEC LTDA. Rua Arabutan, 386, CEP 90240-470, Porto Alegre, RS, Brasil.

*Autor para contato. E-mail: pripauly@gmail.com

ridos como uma forma de substituir ou diminuir o uso de fertilizantes fosfatados solúveis, mediante um melhor aproveitamento dos fosfatos naturais existentes ou adicionados ao solo (Goldstein 1986, Kim *et al.* 1997). Um exemplo de prática semelhante ocorreu com a implementação do controle biológico de doenças de plantas utilizando os fungos do gênero *Trichoderma* spp.. Morandi & Bettioli (2009) relatam o uso deste microrganismo com sucesso no Brasil, para o controle de patógenos de solo como *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina*, *Botrytis*, *Cryspipellis*, *Sclerotium* e *Sclerotinia*, reduzindo o volume de agrotóxico aplicados em diversas culturas, como feijão, soja, algodão, fumo, morango, tomate, cebola, alho, plantas ornamentais e cacau.

As diferentes espécies de *Trichoderma* estão sempre associadas com as raízes e ecossistema radicular das plantas, por isso, além do controle biológico podem atuar de forma semelhante aos fungos micorrízicos produzindo compostos que podem estimular o crescimento e o mecanismo de defesa das plantas (Benítez *et al.* 2004). Um dos mecanismos de ação biofertilizante deste fungo pode ser a suplementação das necessidades nutricionais das plantas pela solubilização de fosfatos (Gravel *et al.* 2007, Machado *et al.* 2011).

Para uma maior compreensão do potencial de aplicação de *Trichoderma* spp. também como biofertilizante, este estudo avaliou a capacidade de solubilização de fosfato *in vitro*, através da produção das enzimas fosfatases (ácidas/alcalinas) e alteração de pH provocada no meio.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção de isolados de Trichoderma spp.

Foram avaliados 23 isolados de *Trichoderma asperellum* (ICB01, ICB02, ICB03, ICB04, ICB06, ICB07, ICB08, ICB09, ICB10, ICB11, ICB12, ICB13, ICB14, ICB15, ICB16, ICB17, ICB18, ICB19, ICB20, ICB21, ICB22, ICB23 e ICB24), 1 isolado de *Trichoderma harzianum* (ICB05) e 1 isolado de *Trichoderma virens* (ICB25). Os isolados pertencem a Micoteca da empresa ICB BIOAGRITEC Ltda. e foram cedidos pela mesma para o presente estudo. Todos os isolados foram previamente coletados de regiões agrícolas com cultivo de feijão e histórico de uso no controle biológico de doenças radiculares.

Solubilização de fosfato

O cultivo prévio dos isolados foi realizado em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) a 28 °C durante 5 dias. Discos de 8,0 mm de diâmetro foram retirados das bordas destas colônias e então transferidos para o meio de cultura caldo PVK (10 g glicose, 5 g Ca₃(PO₄)₂, 0,2 g NaCl, 0,1 g MgSO₄, 0,2 g KCl, 0,5 g extrato de levedura, 0,002 g MnSO₄, 0,002 g FeSO₄ e 1000 mL água destilada) selecionado para o teste de solubilização de fosfato (Pikovskaya 1948), em frascos de Erlenmeyer com 250 mL de meio. Os frascos foram mantidos em temperatura de 28 °C sob agitação de 140 rpm durante cinco dias. As

avaliações foram realizadas em intervalos de 24 h, 72 h e 120 h após o cultivo.

Para a determinação da concentração de fósforo solúvel utilizou-se o protocolo de Fiske & Subbarow (1925) e os resultados foram expressos como concentração de fosfato solúvel em µg.mL⁻¹.

Determinação da concentração enzimática da fosfatase

O cultivo prévio foi realizado em meio de cultura BDA a 28 °C durante 5 dias. Discos de 8,0 mm de diâmetro foram retirados das bordas destas colônias e então transferidos para o meio de cultura BD, mantidos em temperatura de 28 °C, sob agitação de 140 rpm. Foram feitas avaliações 24 h, 72 h e 120 h após o cultivo. Uma alíquota de cada amostra foi retirada e centrifugada a 1200 rpm durante 20 min. O processo foi repetido por duas vezes sempre descartando o precipitado. A concentração enzimática (mmol.mL⁻¹) foi avaliada de acordo com a metodologia de Kersters & DeLey (1971).

A produtividade enzimática máxima foi calculada pela através da Equação 1:

$$(1) \quad P_E = C_E / t_p$$

onde,

P_E = produtividade enzimática máxima;

C_E = concentração enzimática máxima;

t_p = tempo de produção.

Determinação do tipo de fosfatase produzida

Para determinação do tipo de fosfatase produzida (ácida ou alcalina), os isolados foram inoculados em meio de cultura salino (Nahas *et al.* 1994) contendo 1 g citrato de sódio, 1 g NH₄Cl, 0,2 g KCl, 1,2 g MgSO₄, 0,1 g CaCl₂, 10 g glicose, 0,5 g extrato de levedura, 1,5 % (p/v) ágar, 1000 mL água destilada. O pH do meio foi ajustado para 5,6. As placas foram incubadas a 28 °C pelo período de 72 h. A diferenciação entre o tipo de fosfatase produzida foi determinada pelo método de Nahas (2002).

Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os valores foram expressos como a média entre elas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com nível de significância de 5 % e as médias comparadas pelo teste de Tukey. As análises de correlação foram efetuadas, calculando-se a equação de regressão e o coeficiente de correlação linear (r). O software utilizado para todas as análises estatísticas foi o Statistica 7.0 (Statsoft).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Solubilização de fosfato

O uso de fungos solubilizadores de fosfato é uma estratégia biotecnológica promissora para o manejo de fósforo no solo, uma vez que permite a utilização de fosfatos insolúveis, como o fosfato de rocha ou a recuperação de fósforo indisponível, fixo em partículas do solo (Mendes *et al.* 2014).

Este trabalho demonstrou a capacidade de isolados de 3 diferentes espécies de *Trichoderma* na solubilização de fosfato de cálcio em meio PVK. Diferentes meios de cultura para solubilização de fosfato vêm sendo testados por diversos autores (Nautiyal 1999, Silva-Filho & Vidor 2000, Pradhan & Sukla 2005, Rawat & Tewari 2011). Todos os isolados de *Trichoderma* testados mostraram crescimento micelial em meio PVK. A eficiência do meio PVK em comparação com outros meios de cultura líquidos, incluindo os meios AYG, NBRIP e NBR1Y, foi comprovada por Pradhan & Sukla (2005). Um dos fatores que pode facilitar o isolamento e seleção de microrganismos solubilizadores de fosfato neste meio é a presença do extrato de levedura e glicose no meio, o primeiro deles é utilizado pelos fungos como fonte de nitrogênio, o que seria um diferencial em relação aos demais meios testados (Pradhan & Sukla 2005, Souchie *et al.* 2006, Souchie *et al.* 2007).

A concentração de fosfato solubilizado aumentou gradualmente no período avaliado para todos os isolados, com exceção do isolado ICB21 que diminuiu após 120 h de cultivo, entretanto, essa diferença não foi considerada significativa ($p < 0,05$) (Tab. 1). O aumento inicial na concentração de fosfato solúvel no meio seguido por uma diminuição gradual com o decorrer do experimento é um fato recorrente e observado por diversos autores (Nautiyal 1999, Kapri & Tewari 2010, Oliveira *et al.* 2012). A redução na concentração de fosfato solúvel no meio, pode ser correlacionada com o sequestro do nutriente pelo micélio do fungo para ser liberado de uma forma facilmente disponível quando próximo das raízes das plantas, após a lise do micélio com a senescência do fungo (Kapri & Tewari 2010).

A concentração de fosfato solúvel no meio não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos analisados para os isolados ICB02, ICB09, ICB20, ICB21 e ICB25 (Tab.1), para os demais isolados o período de 72 h de cultivo foi suficiente para alcançar resultados significativos ($p < 0,05$) na concentração de fosfato solúvel em meio PVK. Kapri & Tewari (2010) também observaram o aumento na concentração de fosfato solúvel após 72 h de cultivo de *Trichoderma* spp. em meio NBRIP, mostrando o elevado potencial deste fungo em solubilizar fosfato inorgânico, que poderia ser posteriormente utilizado pelo fungo em processos celulares.

Após 24 h de cultivo, a concentração de fosfato solúvel presente no meio PVK variou de 0,78 a 6,52 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ entre os tratamentos com inoculação (Tab.1), sendo que os isolados ICB01, ICB02, ICB03, ICB05, ICB13, ICB14, ICB18, ICB23 e ICB25 não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle. Os demais isolados apresentaram solubilização superior ($p < 0,05$) ao controle testado. Os isolados ICB07, ICB08, ICB09, ICB12 e ICB21 apresentaram as maiores concentrações ($p < 0,05$) de fosfato solúvel neste período.

A concentração de fosfato solúvel presente no meio PVK variou de 1,16 a 7,75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ após 72 h de cultivo (Tab. 1). Nesse momento, os isolados ICB02 e ICB25

não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle. Os isolados ICB07, ICB08, ICB09, ICB12 e ICB21 também solubilizaram as maiores concentrações ($p < 0,05$) de fosfato neste período.

Na avaliação realizada após 120 h de cultivo, a concentração de fosfato de cálcio solúvel no meio testado variou de 2,0 a 9,07 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tab. 1). Os isolados ICB06, ICB07, ICB08, ICB09 e ICB12 solubilizaram as maiores concentrações ($p < 0,05$) de fosfato no meio de cultura PVK neste período, enquanto os isolados ICB02 e ICB25 não diferiram do controle.

O isolado ICB08 apresentou a melhor atividade de solubilização, uma vez que apresentou a maior concentração de fosfato solúvel no meio de cultura desde a primeira avaliação, em 24 h após o cultivo, mantendo esse padrão em 72 h e 120 h de cultivo (Tab. 1).

A capacidade de *Trichoderma* spp. atuar como agente de biocontrole é um fato comprovado por uma ampla gama de autores (Howell 2003, Benítez *et al.* 2004, Bae *et al.* 2009, Carvalho *et al.* 2011). Assim, além de atuar na disponibilização de nutrientes para as plantas, promovendo o seu crescimento, a capacidade de solubilizar nutrientes do ambiente está correlacionada com os mecanismos que atuam no controle biológico, como a competição (Howell 2003, Benítez *et al.* 2004, Berg 2009). Altomare *et al.* (1999) relatam a possibilidade de

Tabela 1. Solubilização de fosfato de cálcio (10 g.L^{-1}) em meio PVK por isolados de *Trichoderma* spp. em diferentes intervalos de tempo¹.

Isolados	Concentração de fosfato solubilizado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		
	24 h	72 h	120 h
ICB01	1,52 ^{bGHI}	2,82 ^{abGHI}	4,07 ^{aGHI}
ICB02	0,78 ^{aHI}	1,16 ^{aIJ}	2,00 ^{aIJ}
ICB03	1,80 ^{bAGHI}	3,60 ^{abEFGH}	5,27 ^{aGEFGH}
ICB04	2,96 ^{bDEFGH}	4,18 ^{abEFG}	5,67 ^{aDEFG}
ICB05	1,87 ^{bGHI}	3,64 ^{aEFGH}	5,89 ^{aCDEFG}
ICB06	4,30 ^{bBCDE}	5,53 ^{abBCDE}	7,23 ^{aBCDE}
ICB07	4,80 ^{abABCD}	6,41 ^{abABC}	8,01 ^{aAB}
ICB08	6,52 ^{ba}	7,75 ^{aba}	9,07 ^{aA}
ICB09	5,74 ^{aAB}	6,55 ^{aABC}	7,59 ^{aABCD}
ICB10	3,14 ^{bDEFGH}	4,20 ^{abDEFG}	5,57 ^{aDEFG}
ICB11	2,95 ^{bDEFGH}	4,08 ^{abEFG}	5,70 ^{aDEFG}
ICB12	4,86 ^{bABCD}	6,28 ^{abABCD}	7,82 ^{aABC}
ICB13	1,67 ^{bGHI}	2,65 ^{abGHI}	4,74 ^{aFGH}
ICB14	2,13 ^{bFGHI}	3,41 ^{abFGH}	5,16 ^{aEFGH}
ICB15	2,88 ^{bDEFGH}	3,87 ^{abEFGH}	5,22 ^{aEFGH}
ICB16	2,54 ^{bEFGH}	4,08 ^{abEFG}	5,36 ^{aEFGH}
ICB17	2,64 ^{bEFGH}	3,96 ^{abEFGH}	5,32 ^{aEFGH}
ICB18	2,04 ^{bGHI}	3,41 ^{abFGH}	5,03 ^{aFGH}
ICB19	2,65 ^{bEFGH}	4,18 ^{abEFG}	5,50 ^{aDEFG}
ICB20	3,40 ^{aCDEFG}	4,55 ^{aCDEFG}	5,27 ^{aEFGH}
ICB21	5,41 ^{aABC}	7,03 ^{aAB}	5,66 ^{aDEFG}
ICB22	3,16 ^{bDEFGH}	4,01 ^{abEFGH}	5,37 ^{aEFG}
ICB23	2,29 ^{bEFGHI}	3,98 ^{abEFGH}	5,07 ^{aFGH}
ICB24	4,16 ^{bBCDEF}	5,33 ^{abBCDEF}	6,59 ^{aBCDEF}
ICB25	1,75 ^{aGHI}	1,96 ^{aHIJ}	3,44 ^{aHI}
Controle	0,35 ^{al}	0,36 ^{aj}	0,36 ^{aj}

1. Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si na linha e médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si na coluna pelo teste de Tukey 5%.

um isolado com elevado potencial de solubilização de fosfato atuar na supressão de patógenos de solo, como *Pythium* e *Rhizoctonia*, que são incapazes de solubilizar este nutriente do solo, devido à alta eficiência e competitividade.

Muitos microrganismos podem mobilizar fósforo a partir de fosfatos inorgânicos simplesmente pela redução do pH que ocorre como resultado da atividade metabólica (Wakelin *et al.* 2004). Segundo Mendes *et al.* (2014) a acidificação do meio é um dos mecanismos efetivos na solubilização, especialmente para $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. A exsudação celular de H^+ para o balanço da absorção de NH_4^+ pode reduzir o pH das soluções e propicia o aumento de algumas formas de fosfato de cálcio (Asea *et al.* 1988). Além disso, a produção de ácidos orgânicos pelos fungos também pode ser um mecanismo responsável por acidificar o meio (Rudresh *et al.* 2005). Todos os isolados testados neste experimento reduziram o valor do pH em relação ao pH inicial do meio após 120 h ($p < 0,05$) (Tab. 2). O pH variou entre 6,0 a 4,1 no intervalo de tempo de 0 até 120 h de cultivo. Estes valores de pH estão em acordo com os resultados encontrados por Illmer & Schinner (1995), Kapri & Tewari (2010) e Oliveira *et al.* (2012).

Em análise de correlação entre os melhores resultados de solubilização de fosfato e o pH do meio, demonstrou-

se que existe correlação negativa entre as variáveis (Fig. 1). Kpoblekou & Tabatabai (1994) sugerem que microrganismos que tendem a reduzir o pH do meio durante o seu crescimento são eficientes na solubilização de fosfato. Rawat & Tewari (2011) demonstraram que *Trichoderma* spp. podem crescer e solubilizar fosfato de forma eficiente tanto em meio ácido quanto alcalino. Este fato demonstra que a acidificação do meio por *Trichoderma* spp. pode não ser o único mecanismo envolvido na solubilização de fosfatos para este fungo.

Determinação da concentração enzimática da fosfatase

O teor de fosfato solúvel encontrado em ensaios de inoculação com microrganismos solubilizadores também pode decorrer da atividade das fosfatases em liberar fosfato de origem orgânica (Nahas 1991). Inúmeras fosfatases são reconhecidas por sua habilidade em hidrolisar mono ou diésteres fosfóricos (Feder 1973). As fosfatases compreendem um amplo grupo de enzimas fitases, nucleases e fosfolipases, podendo formar no final do processo de hidrólise, fosfomonoesterases (Pang & Kolenko 1986). Em média 10 % dos fungos, além de solubilizadores, possuem também atividade das fosfatases ácida e alcalina (Nahas *et al.* 1994).

Todos os isolados testados neste experimento apresentaram crescimento micelial em meio BD. As maiores concentrações enzimáticas são obtidas a partir de 72 h após o cultivo para a maioria dos isolados, com exceção dos isolados ICB17 e ICB25, que não demonstraram variação significativa na concentração enzimática no intervalo de tempo testado ($p < 0,05$) (Tab. 3). Os melhores resultados para produção de fosfatase ácida e alcalina em meio PVK foi obtida por Kapri & Tewari (2010) no intervalo de 72 h. Segundo estes autores, o declínio na atividade das fosfatases após esse período é devido a inibição das enzimas pela completa dissolução de fosfato de cálcio no meio de cultura.

Após 24 h todos os isolados produziram concentrações semelhantes das enzimas fosfatases, não apresentando diferença significativa ($p < 0,05$), variando de 3,45 a 25,60 mmol.L^{-1} (Tab. 3). As concentrações variaram entre 4,09 e 179,69 mmol.L^{-1} quando considerado o tempo de

Tabela 2. pH do meio PVK, após a inoculação de isolados de *Trichoderma* spp. em diferentes intervalos de tempo¹.

Isolados	pH do meio			
	Inicial	24 h	72 h	120 h
ICB01	6,0 ^{aA}	5,9 ^{aA}	5,3 ^{bCDEFG}	5,0 ^{bCDEFG}
ICB02	6,0 ^{aA}	6,0 ^{aA}	5,3 ^{bDEFG}	4,8 ^{cDEFG}
ICB03	6,0 ^{aA}	6,0 ^{aA}	5,2 ^{bEFGH}	4,9 ^{bDEFG}
ICB04	6,0 ^{aA}	5,8 ^{aA}	5,1 ^{bFGH}	4,9 ^{bDEFG}
ICB05	6,0 ^{aA}	6 ^{aA}	5,3 ^{bDEFG}	4,9 ^{bCDEFG}
ICB06	6,0 ^{aA}	6,0 ^{aA}	4,9 ^{bGHI}	4,6 ^{bGH}
ICB07	6,0 ^{aA}	5,9 ^{aA}	5,7 ^{abABC}	5,4 ^{bB}
ICB08	6,0 ^{aA}	5,8 ^{aA}	4,6 ^{bIJ}	4,3 ^{bHI}
ICB09	6,0 ^{aA}	5,8 ^{aA}	5,0 ^{bGH}	4,8 ^{bEFG}
ICB10	6,0 ^{aA}	5,9 ^{aA}	5,1 ^{bFGH}	4,9 ^{bCDEFG}
ICB11	6,0 ^{aA}	6,0 ^{aA}	5,9 ^{aAB}	5,3 ^{bBC}
ICB12	6,0 ^{aA}	5,8 ^{aA}	5,0 ^{bGHI}	4,6 ^{bFGH}
ICB13	6,0 ^{aA}	5,9 ^{aA}	5,3 ^{bCDEFG}	4,9 ^{bCDEFG}
ICB14	6,0 ^{aA}	5,8 ^{aA}	5,0 ^{bGH}	4,6 ^{eFGH}
ICB15	6,0 ^{aA}	5,9 ^{aA}	5,2 ^{bDEFG}	4,9 ^{bCDEFG}
ICB16	6,0 ^{aA}	6,0 ^{aA}	5,4 ^{bCDEF}	5,0 ^{cDEFG}
ICB17	6,0 ^{aA}	5,9 ^{aA}	4,8 ^{bHIJ}	4,6 ^{bGH}
ICB18	6,0 ^{aA}	5,9 ^{aA}	4,4 ^{bJ}	4,1 ^{bI}
ICB19	6,0 ^{aA}	5,9 ^{aA}	5,2 ^{bEFGH}	4,7 ^{cFGH}
ICB20	6,0 ^{aA}	6,0 ^{aA}	5,6 ^{aABCD}	5,2 ^{bBCDE}
ICB21	6,0 ^{aA}	5,8 ^{aA}	5,3 ^{bCDEFG}	5,0 ^{bCDEF}
ICB22	6,0 ^{aA}	5,9 ^{aA}	5,0 ^{bGH}	4,3 ^{cHI}
ICB23	6,0 ^{aA}	6,0 ^{aA}	5,5 ^{bBCDE}	5,2 ^{bBCD}
ICB24	6,0 ^{aA}	5,9 ^{aA}	5,0 ^{bGH}	4,4 ^{cHI}
ICB25	6,0 ^{aA}	5,9 ^{aA}	5,5 ^{bBCDEF}	5,0 ^{cBCDEF}
Controle	6,0 ^{aA}	6,0 ^{aA}	6,0 ^{aA}	6,1 ^{aA}

1. Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si na linha e médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si na coluna pelo teste de Tukey 5%.

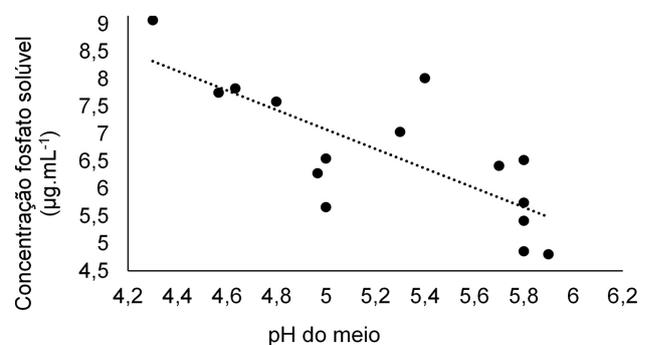


Figura 1. Relação entre a solubilização de fosfato com o pH do meio para os isolados ICB07, ICB08, ICB09, ICB12 e ICB21. Equação de regressão: $y = -94,01x + 576,62$, $r = -0,72^*$. * Correlação negativa significativa ($p < 0,05$).

72 h (Tab. 3). O isolado ICB18 obteve a maior produção enzimática (179,69 mmol.L⁻¹), diferindo significativamente dos demais isolados testados ($p < 0,05$), enquanto os isolados ICB01, ICB02, ICB03, ICB04, ICB06, ICB07, ICB08, ICB09 e ICB24 produziram as menores concentrações enzimáticas.

No intervalo de 120 h após a inoculação, as concentrações enzimáticas variaram de 51,12 a 239,88 mmol.L⁻¹ (Tab. 3). O isolado ICB03 produziu a maior concentração enzimática, enquanto os isolados ICB01, ICB06, ICB08, ICB09, ICB10, ICB11, ICB12, ICB13, ICB14, ICB15, ICB16, ICB17, ICB19, ICB20, ICB21, e ICB25 foram os que produziram as menores concentrações.

Para a determinação da produtividade enzimática máxima, foram utilizados na Equação 1 os valores das concentrações referentes aos isolados ICB18 em 72 h e do isolado ICB03 em 120 h, que apresentaram as maiores concentrações enzimáticas entre os isolados testados. Com o quociente de 2,49 mmol.L⁻¹.h⁻¹, o isolado ICB18 em 72 h foi considerado a maior produtividade enzimática neste experimento.

Os resultados obtidos neste experimento indicam o potencial de isolados de *Trichoderma* spp. produzirem enzimas que possam atuar na solubilização de fosfatos.

Tabela 3. Produção de enzimas fosfatase em meio BDA e tipo de fosfatase produzida por isolados de *Trichoderma* spp. em diferentes intervalos de tempo¹ e tipo de fosfatase produzida.

Isolados	Concentração de fosfatases (mmol.mL ⁻¹)			Fosfatase produzida
	24 h	72 h	120 h	
ICB01	3,93 ^{ba}	19,02 ^{abcDEFGH}	58,99 ^{agh}	Ácida/Alcalina
ICB02	17,58 ^{ba}	5,94 ^{bGH}	101,60 ^{defg}	Ácida/Alcalina
ICB03	4,41 ^{ba}	8,59 ^{bFGH}	239,88 ^{aa}	Ácida/Alcalina
ICB04	3,45 ^{ba}	34,67 ^{bcDEFGH}	184,99 ^{ab}	Ácida/Alcalina
ICB05	25,60 ^{ba}	67,49 ^{abB}	106,66 ^{acDEF}	Ácida/Alcalina
ICB06	7,86 ^{ba}	10,27 ^{bEFGH}	64,44 ^{aFGH}	Alcalina
ICB07	10,99 ^{ba}	4,09 ^{bH}	145,10 ^{abc}	Ácida/Alcalina
ICB08	5,86 ^{ba}	13,16 ^{bDEFGH}	76,64 ^{aEFGH}	Ácida/Alcalina
ICB09	11,48 ^{ba}	44,22 ^{abcDEFGH}	63,40 ^{aFGH}	Ácida
ICB10	6,18 ^{ba}	50,56 ^{abcDEF}	78,89 ^{aEFGH}	Ácida/Alcalina
ICB11	7,86 ^{ba}	77,69 ^{ab}	63,32 ^{aFGH}	Ácida/Alcalina
ICB12	5,54 ^{ba}	50,56 ^{bcDEF}	60,27 ^{aGH}	Ácida/Alcalina
ICB13	12,44 ^{ba}	53,05 ^{abBCDE}	81,14 ^{aEFGH}	Ácida
ICB14	3,53 ^{ba}	48,23 ^{abcDEFG}	53,93 ^{aH}	Ácida/Alcalina
ICB15	8,67 ^{ba}	54,65 ^{aBCD}	78,89 ^{aEFGH}	Ácida/Alcalina
ICB16	7,70 ^{ba}	54,65 ^{aBCD}	64,77 ^{aFGH}	Ácida/Alcalina
ICB17	22,47 ^{aA}	49,36 ^{abcDEFG}	65,723 ^{aFGH}	Ácida/Alcalina
ICB18	24,24 ^{ba}	179,69 ^{aa}	138,76 ^{cd}	Ácida/Alcalina
ICB19	9,31 ^{ba}	49,60 ^{abcDEF}	92,93 ^{aEFGH}	Ácida/Alcalina
ICB20	10,83 ^{ba}	65,33 ^{ab}	60,99 ^{agh}	Alcalina
ICB21	10,75 ^{ba}	48,07 ^{abcDEFG}	56,34 ^{aH}	Ácida/Alcalina
ICB22	10,03 ^{ba}	66,93 ^{ab}	118,22 ^{acDE}	Ácida/Alcalina
ICB23	19,26 ^{ba}	60,67 ^{bBC}	114,36 ^{acDE}	Alcalina
ICB24	20,06 ^{ba}	42,29 ^{bBCDEFGH}	141,73 ^{abcd}	Ácida/Alcalina
ICB25	16,21 ^{aA}	54,57 ^{aBCD}	51,12 ^{aH}	Ácida

1. Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si na linha e médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si na coluna pelo teste de Tukey 5%.

Aseri et al. (2009) compararam a atividade enzimática de *Trichoderma* sp. com *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Pseudeurotium* sp. e comprovaram produtividade superior de fosfatase ácida e fosfatase alcalina por este fungo. Os mesmos autores ainda indicaram que a atividade média da fosfatase ácida intracelular foi duas vezes maior do que a secreção de fosfatase ácida extracelular por unidade de peso seco.

Quando considerados os melhores resultados para a solubilização de fosfato (ICB07, ICB08, ICB09, ICB12 e ICB21) em correlação com os valores da concentração de fosfatases produzida por estes isolados, foi possível verificar uma correlação moderada entre as variáveis (Fig. 2).

Foi possível identificar o tipo de fosfatase produzida por todos os isolados testados. Entre os isolados testados, 76 % produzem tanto fosfatase ácida quanto fosfatase alcalina, 12 % produzem apenas fosfatase alcalina (ICB06, ICB20 e ICB23) e 12 % dos isolados (ICB09, ICB13 e ICB25) produzem apenas fosfatase ácida (Tab. 3). Embora as concentrações de fosfatases ácida e alcalina não tenham sido mensuradas, Nahas et al. (1994) constataram que fungos produzem maiores concentrações de fosfatases ácidas, enquanto bactérias produzem maiores concentrações de fosfatases alcalinas.

CONCLUSÕES

Os isolados de *Trichoderma* spp. testados tem o potencial para solubilizar fosfato, indicando a possível recomendação como biofertilizante.

Ficou caracterizada a existência de uma variação nos resultados na relação eficiência x tempo, assim, pode-se concluir que um “mix” de isolados de *Trichoderma* pode ter ação mais ampla e, portanto, apresentar resultados com maior eficiência na solubilização de fosfatos.

Diferentes mecanismos estão envolvidos na solubilização de fosfato de cálcio por isolados de *Trichoderma* spp.

O isolado ICB18 (*T. asperellum*) apresentou a maior atividade enzimática e foi capaz de produzir fosfatases ácidas e alcalinas.

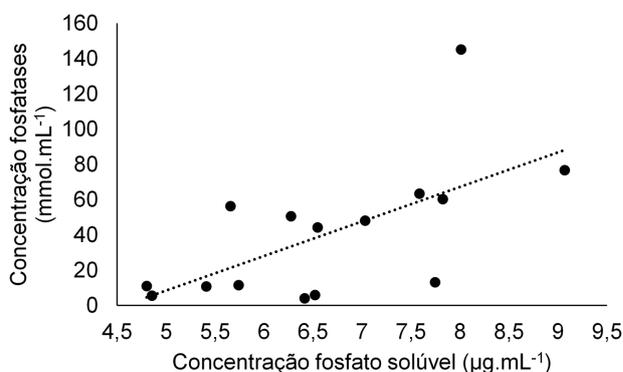


Figura 2. Relação entre a solubilização de fosfato e concentração de fosfatases para os isolados ICB07, ICB08, ICB09, ICB12 e ICB21. Equações de regressão: (A): $y = 19,587x - 89,50$, $r = 0,63^*$. * Correlação negativa significativa ($p < 0,05$).

REFERÊNCIAS

- ALTMORE, C., NORVELL, W.A., BJÖRKMAN, T. & HARMAN, G.E. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5): 2926-2933.
- ASEA, P.E.A., KUCEY, R.M.N. & STEWART, J.W.B. 1988. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. *Soil Biology and Biochemistry* 20: 459-464.
- ASERI, G.K., JAIN, N. & TARAFDAR, J.C. 2009. Hydrolysis of organic phosphate forms by phosphatases and phytase producing fungi of arid and semi arid soils of India. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 5(4): 564-570.
- BAE, H., SICHER, R.C., KIM, M.S., STREM, M.D., ELNICK, R.L. & BAILEY, B.A. 2009. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany*, 60(11): 3279-3295.
- BENÍTEZ, T., RINCÓN, A.M., LIMÓN, M.C. & CODÓN, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7: 249-260.
- BERG, G. 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84: 11-18.
- CARVALHO, D.D.C., MELLO, S.C.M., LOBO-JÚNIOR, M. & SILVA, M.C. 2011. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção de crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. *Tropical Plant Pathology*, 36(1): 28-34.
- FEDER, J. 1973. The phosphatases. In: GRIFITH, E.J., BECTEN, A., SPENCER, J.M. & MITCHEL, D.T. *Environmental phosphorus handbook*. New York: John Wiley. p. 475-507.
- FISKE, C.H. & SUBBAROW, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *The Journal of Biological Chemistry*, 66: 375-400.
- GOLDSTEIN, A.H. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspectives and future prospects. *American Journal of Alternative Agriculture*, 1(2): 51-57.
- GRAVEL, V., ANTOUN, H. & TWEDDELL, R.J. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology & Biochemistry*, 39(8): 1968-1977.
- HOWELL, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Diseases*, 87(1): 4-10.
- ILLMER, P., BARBATO, A. & SCHINNER, F. 1995. Solubilization of hardly-soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(3): 265-270.
- KAPRI, A. & TEWARI, L. 2010. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rizospheric *Trichoderma* spp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(3): 787-795.
- KERSTERS, K. & DELEY, J. 1971. Enzymic tests with resting cells and cell-free extracts. In: NORRIS, J.R. & RIBBONS, D.W. (Ed.). *Methods in Microbiology*. New York: Academic Press. p. 33-52.
- KIM, K.Y., JORDAN, D. & MCDONALD, G.A. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. 1997. *Biology and Fertility of Soils*, 26(2): 79-87.
- KPOMBLEKOU, A.K. & TABATABAI, M.A. 1994. Effect of organic acids on the release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Science*, 158: 112-118.
- LEITÃO, V.O., LIMA, R.C.M., VAINSTEIN, M.H. & ULHOA, C.J. Purification and characterization of an acid phosphatase from *Trichoderma harzianum*. 2010. *Biotechnology Letters*, 32: 1083-1088.
- MACHADO, R.G., SÁ, E.L.S., DAMASCENO, R.G., HAHN, L., ALMEIDA, D., MORAES, T., CAMARGO, F.A.O. & REARTES, D.S. 2011. Promoção de crescimento de *Lotus corniculatus* L. e *Avena strigosa* Schreb pela inoculação conjunta de *Trichoderma harzianum* e rizóbio. *Ciência e Natura*, 33(2):111-126.
- MAHESWAR, N.U. & SATHIYAVANI, G. 2012. Solubilization of phosphate by *Bacillus* Sps, from groundnut rhizosphere (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4(8): 4007-4011.
- MENDES, G.O., FREITAS, A.L.M., PEREIRA, O.L., SILVA, I.R., VAS-SILEV, N.B. & COSTA, M.D. 2014. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Annals of Microbiology*, 64: 239-249.
- MORANDI, M.A.B & BETTIOL, W. 2009. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W. & MORANDI, M.A.B. (Ed.). *Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas*, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. p. 7-15.
- NAHAS, E. 1991. Ciclo do fósforo: transformações microbianas. Jaboticabal: FUNEP. 67 p.
- NAHAS, E., CENTURION, J.F. & ASSIS, L.C. 1994. Microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases de vários solos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 18: 43-48.
- NAHAS, E. 2002. Microrganismos de solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. 2002. *Bragantia*, 61(3): 267-275.
- NAUTIYAL, C.S. 1999. Na eficiente microbiological growth médium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1): 265-270.
- OLIVEIRA, A.G., CHAGAS-JUNIOR, A.F., SANTOS, G.R., MILLER, L.O. & CHAGAS, L.F.B. 2012. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp.. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 7(3): 149-155.
- OMAR S.A. 1998. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular-arbuscular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(2): 211-218.
- PANG, P.C.K. & KOLENKO, H. 1986. Phosphomonoesterase activity in forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 18(1): 35-40.
- PIKOVSKAYA, R.I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiologiya*, 17: 362-370.
- PRADHAN, N. & SUKLA, L.B. 2005. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *African Journal of Biotechnology*, 5(10): 850-854.
- RAWAT, R. & TEWARI, L. 2011. Effects of abiotic stress on phosphate solubilization by biocontrol fungus *Trichoderma* sp. *Current Microbiology*, 62: 1521-1526.
- RUDRESH, D.L., SHIVAPRAKASH, M.K & PRASAD, R.D. 2005. Tricalcium phosphate solubilizing abilities of *Trichoderma* spp. in relation to P uptake and growth and yield parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Canadian Journal of Microbiology*, 51: 217-222.
- SCHACHTMAN, D.P., REID, R.J. & AYLING, S.M. 1998. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiology*, 116: 447-453.
- SILVA-FILHO, G.N. & VIDOR, C. 2000. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 24: 311-319.
- SOUCHIE, E.L., ABBOUD, A.C.S. & CAPRONI, A.L. 2007. Solubilização de fosfato *in vitro* por microrganismos rizosféricos de Guandu. *Bioscience Journal*, 23(2): 53-60.
- SOUCHIE, E.L., SAGGIN-JUNIOR, O.J., SILVA, E.M.R., CAMPELLO, E.F.C., AZCÓN, R. & BAREA, J.M. 2006. Communities of P-solubilizing bacteria, fungi and arbuscular mycorrhizal fungi in grass pasture and secundar forest of Paraty, RJ – Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 76(1): 183-193.
- WAKELIN, S.A., WARREN, R.A., HARVEY, P.R. & RYDER, M.H. 2004. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. *Biology and Fertility of Soils*, 40: 36-43.