

Sete Lagoas, MG  
Dezembro, 2013

### Autores

**Christiane Abreu de Oliveira**  
Eng.-Agr., D.Sc. em Biologia  
Vegetal, Pesq. da Embrapa  
Milho e Sorgo, Sete Lagoas,  
MG, christiane.paiva@embrapa.br

**Bianca Braz Mattos**  
Bióloga, M.Sc. em  
Microbiologia, Analista da  
Embrapa Milho e Sorgo, Sete  
Lagoas, MG,  
bianca.mattos@embrapa.br

**Ivanildo Evódio Marriel**  
Eng.-Agr.ônomo, D.Sc. em  
Biologia Celular, Pesquisador em  
Microbiologia da Embrapa Milho  
e Sorgo, Sete Lagoas, MG,  
ivanildo.marriel@embrapa.br

**Eliane Aparecida Gomes**  
Bióloga, D.Sc. em Genética,  
Pesquisadora da Embrapa Milho  
e Sorgo, Sete Lagoas, MG,  
eliane.aparecida@embrapa.br

**Ubiraci Gomes de Paula Lana**  
Químico, D.Sc. em Genética,  
Analista da Embrapa Milho e  
Sorgo, Sete Lagoas, MG,  
ubiraci.lana@embrapa.br

**Melissa Barbosa Valença**  
Graduanda em Eng. Ambiental,  
Centro Universitário de Sete  
Lagoas - UNIFEMM, Sete  
Lagoas, MG,  
melissavalensa@hotmail.com

**Ralf Greiner**  
D. Sc. em Química,  
Pesquisador, Max Rubner-  
Institute, Alemanha, ralf.  
einer@mri.bund.de

# Metodologia para Otimização de Seleção de Microrganismos Mineralizadores de Fósforo Orgânico

## Introdução

O fósforo (P) é um dos macronutrientes mais limitantes do crescimento vegetal (ALMEIDA, 2002). Além disso, a sua concentração disponível no solo é geralmente baixa, por causa da sua adsorção às superfícies dos coloides ou precipitação como fosfatos de cálcio (Ca), magnésio (Mg), ferro (Fe) e alumínio (Al) (GRANT et al., 2001).

Assim, para promover um aumento de produtividade agrícola, grandes quantidades de fertilizantes fosfatados são aplicadas a cada ano, mas somente 10% a 20% do total são prontamente utilizados pelas plantas (VANCE et al., 2003). Além do alto custo associado à aplicação de fertilizantes fosfatados, o seu uso indiscriminado pode causar impactos negativos a ecossistemas, como eutrofização e hipóxia em ambientes aquáticos (MILLER et al., 2001; VANCE et al., 2003).

Um dos processos biológicos chave para o ciclo do fósforo no solo e um passo importante para elaboração de uma alternativa biológica para substituição/complementação da adubação fosfatada convencional na biosfera é a mineralização do fitato. O fitato está presente no solo como a forma orgânica do fósforo mais abundante na matéria orgânica do solo. O processo de degradação do fitato é mediado por enzimas denominadas fosfomonoesterases, que pertencem ao grupo das fosfatases e catalisam a hidrólise da fração orgânica do fósforo, disponibilizando o fósforo solúvel para o ambiente. As fosfomonoesterases são as enzimas mais estudadas, por atuarem na mobilização de fósforo orgânico utilizando como substrato ortofosfatos de monoésteres, como o fitato. Estas são classificadas e identificadas de acordo com o composto hidrolisado. Neste caso, as enzimas fitases possuem esta denominação por atuarem sobre o substrato fitato, sendo pertencentes ao grupo das fosfomonoesterases que, por sua vez, pertencem ao grande grupo das fosfatases. As fitases são produzidas por plantas, tecidos animais e microrganismos (KONIETZNY; GREINER, 2002).

Pesquisas sobre a utilização de microrganismos solubilizadores e mineralizadores de fósforo do solo (MSP) têm ganhado espaço no cenário mundial. Estudos recentes apontam que o uso de inoculantes poderia reduzir em até 50% a utilização de adubos fosfatados no cultivo de arroz (RAJAPAKSHA et al., 2011). Como a quantidade de fósforo orgânico tem aumentado nos solos sob plantio direto (NOVAIS et al., 2007), microrganismos que sejam eficientes na mineralização deste fósforo são ainda mais promissores como inoculantes.

Uma ferramenta importante para o isolamento e a seleção de microrganismos capazes de mineralizar o fósforo orgânico presente no solo é o cultivo deles em meios de cultura cuja fonte de fósforo seja exclusivamente um fosfato orgânico. Em 1997, foi descrito um meio de cultura à base de fitato para o isolamento e a quantificação da mineralização de P por fungos produtores de fitase (GARGOVA et al., 1997). No entanto, o rendimento dessa técnica de isolamento tem sido prejudicado pelo teor de fósforo solúvel encontrado como contaminante no ácido fórtico comercial. Este valor de fósforo solúvel é variável nos reagentes comerciais de ácido fórtico e o principal problema está relacionado a sua presença no meio de cultura durante a fase de seleção de microrganismos eficientes na mineralização do fosfato. Essa alta concentração de P solúvel pode causar efeitos negativos sobre a atividade das fosfatases, inibindo a enzima por excesso de produto (BARRIENTOS et al., 1994), e até mesmo dificultar a detecção deste processo enzimático por causa do alto “background” do ensaio, levando à obtenção de resultados falso-positivos<sup>1</sup>.

Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia para a eliminação/redução do fósforo solúvel presente como contaminante do ácido fórtico comercial utilizado na produção de meio de cultivo, por meio da técnica de diálise. Este processo visa otimizar o preparo do meio de cultura utilizado no “screening” de microrganismos mineralizadores de P orgânico com a finalidade de eliminar os resultados falso-negativos.

## Montagem do Sistema de Diálise

Para a remoção do P inorgânico (Pi solúvel em água) presente no ácido fórtico comercial, foi utilizado um sistema de diálise. Neste sistema, o ácido fórtico (*Sigma, St. Louis, MO, USA*) foi pesado (0,5g), dissolvido em 20 ml de água deionizada e distribuído em uma membrana de diálise (*Sigma, St. Louis, MO, USA*) com aproximadamente 20 cm de comprimento capaz de reter moléculas a partir de 12 kDa. Após o preparo do sistema, o fitato foi dialisado contra água deionizada (volume final de 2 l), sob leve agitação, durante um período de 24 h. Posteriormente, foram preparados meios de cultura contendo o ácido fórtico comercial bruto ou dialisado, de acordo com o descrito a seguir, para a análise do conteúdo de Pi (**Figura 1**). No terceiro passo da Figura 1, são demonstrados os resultados obtidos após a análise de Pi nos dois meios de cultura (MURPHY; RILEY, 1962). O tubo contendo o líquido azul representa a alta concentração de fósforo solúvel encontrada no meio de cultura contendo o fitato comercial bruto como fonte de fósforo, e o tubo contendo líquido transparente representa a baixa concentração de P encontrada no meio de cultura contendo o fitato dialisado.

---

<sup>1</sup>Ralf Greiner, informação pessoal.

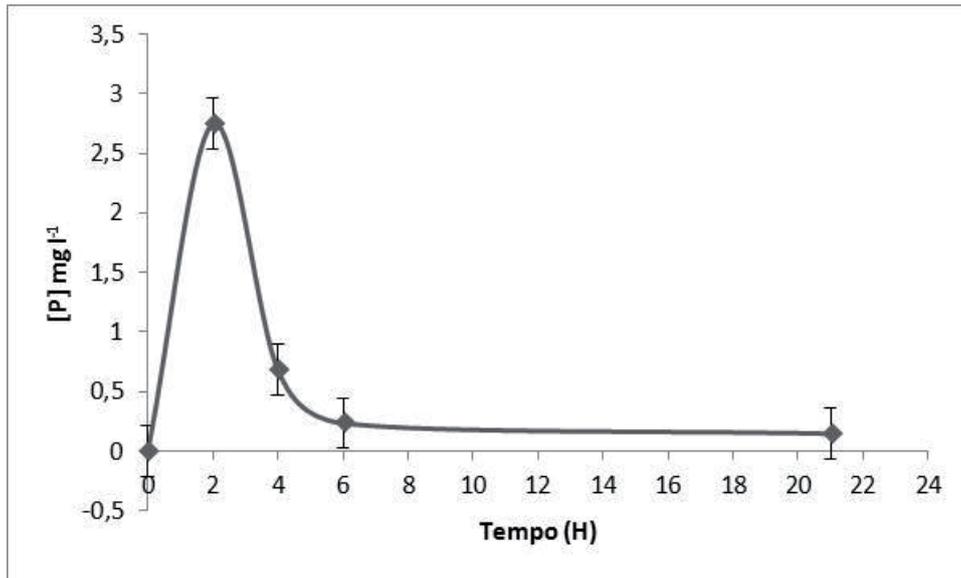


**Figura 1.** Representação esquemática do processo de remoção de P inorgânico contaminante presente no fitato comercial através do processo de diálise.

### Determinação do Número de Trocas de Água Necessárias para o Melhor Desempenho do Sistema de Diálise para a Remoção de P

Foram realizadas trocas da água do sistema com a finalidade de evitar o alcance da estabilidade osmótica entre a solução na membrana e a água do sistema de diálise. Neste sistema, o P solúvel presente como contaminante no ácido fítico comercial foi removido da solução no interior da membrana por difusão passiva, passando do interior da membrana (região de alta concentração de P) para a água deionizada (região de baixa concentração de P), até que fosse alcançado o equilíbrio entre essas duas soluções. O processo de diálise foi acompanhado através da análise quantitativa de P solúvel presente na água removida do sistema (MURPHY;

RILEY, 1962), realizada a cada troca de água do sistema. As trocas foram realizadas a cada duas horas, até que a concentração de P na água se mantivesse constante entre os intervalos das leituras (**Figura 2**). Como é possível observar no gráfico, após seis horas de diálise, houve uma redução significativa na velocidade de troca de P solúvel do interior da membrana para a água do sistema de diálise, indicando que períodos de incubação maiores não serão eficientes para uma maior purificação do ácido fítico.



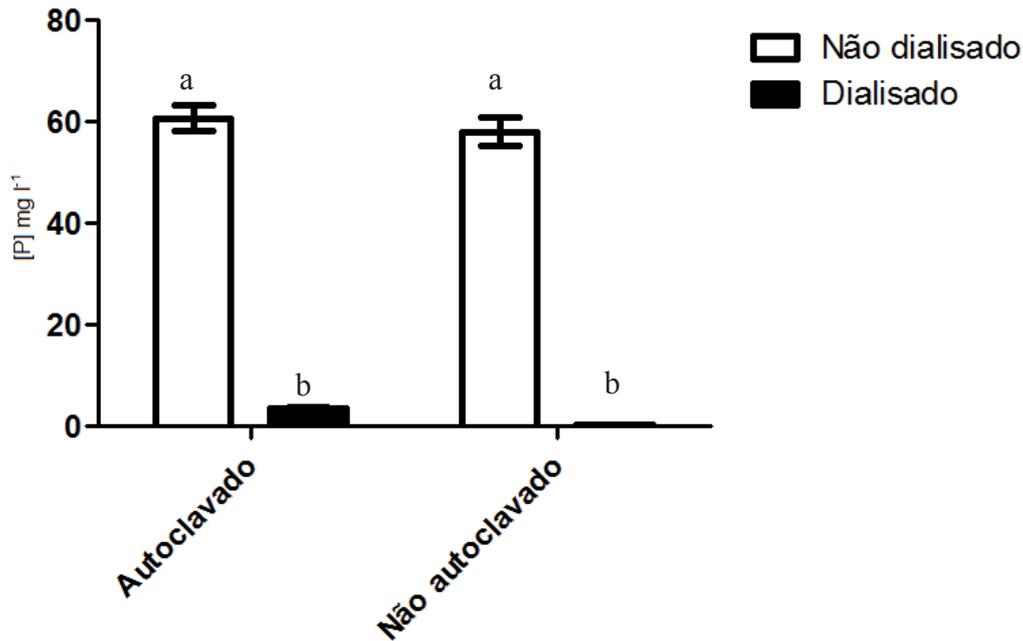
**Figura 2.** Concentração de fósforo ( $\text{mg l}^{-1}$ ) liberado na água do sistema de diálise ao longo de 24 h

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste de ANOVA através do programa GraphPad Prism (versão 5.0).

### Determinação da Eficácia do Sistema na Remoção do P Solúvel e o Efeito do Processo de Autoclavagem na Estabilidade do P Orgânico

Após o período de diálise, o conteúdo da membrana foi removido e utilizado para o preparo do meio de cultura contendo o fitato como única fonte de P (GARGOVA et al., 1997). O fitato em solução aquosa obtido após o sistema de diálise teve o seu volume corrigido para 100 ml, para que fosse obtido um meio de cultura contendo 5g/l de fitato comercial no término do preparo (GARGOVA et al., 1997). Em contrapartida, o mesmo meio de cultura foi preparado de maneira convencional, utilizando o ácido fítico comercial bruto. Foram separadas alíquotas de 5 ml de cada um dos meios de cultura preparados (contendo fitato dialisado ou não dialisado) e essas alíquotas foram acondicionadas em temperatura ambiente para posterior análise de P solúvel. O restante dos meios de cultura foi autoclavado a 121 °C e a 1 atm, por 15

minutos. Após o período de autoclavagem, o conteúdo de P solúvel foi analisado (MURPHY; RILEY, 1962) em todas as condições descritas acima (meio de cultura preparado com fitato bruto e após diálise – autoclavado e não autoclavado) (Figura 3). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos foram analisados estatisticamente por ANOVA, através do programa GraphPad Prism (versão 5.0). Foram encontradas diferenças significativas entre os meios de culturas contendo o fitato dialisado e não dialisado como fonte de P ( $P < 0,001$ ), tanto para o meio de cultura autoclavado quanto para o não autoclavado. A autoclavagem proporcionou uma ligeira liberação de P solúvel a partir do fitato, no entanto, não houve diferença significativa entre os resultados encontrados para os meios de cultura antes e após autoclavagem (Figura 3).



**Figura 3.** Determinação da eficácia do sistema e o efeito do processo de autoclavagem na estabilidade do P orgânico através da análise de P solúvel. Pares de médias seguidos de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Bonferroni ( $P < 0,001$ ) para amostras autoclavadas e não autoclavadas e ou para amostras dialisadas e não dialisadas ( $P < 0,001$ ).

### Estimativa da Perda do Fitato Durante o Processo de Diálise

Com a finalidade de verificar a capacidade de retenção da membrana em relação ao ácido fítico, o procedimento foi repetido, conforme descrito anteriormente, e o conteúdo das membranas foi liofilizado. Após a liofilização, a massa seca do material foi determinada. Para que representasse o valor inicial de ácido fítico (100%), 0,5 g do reagente comercial também foi liofilizado. A partir dos resultados obtidos, foi determinada uma perda média de 87,23% do material inicial após a diálise. No entanto, desses 87,23%, no mínimo 20% representavam os valores de perda do fósforo contaminante, sódio e cálcio, conforme as informações apresentadas pelo fabricante e os dados de fósforo contaminante apresentados anteriormente. Entretanto, testes mais específicos para a dosagem de Ca, Na e P presentes na água da diálise são necessários para a determinação exata dos valores de perda do fitato. Apesar de os valores

preliminares de perda serem relativamente altos (> 50%), não foram detectadas interferências desta no processo de seleção de MSP. Como esta seleção se baseia na quantidade total de P solubilizada ao final de 10 dias em meio de cultura contendo fitato em comparação ao controle sem microrganismos, esta possível perda de fitato na diálise não interferirá na análise de eficiência de isolados de MSP.

### Conclusões

A metodologia de diálise por membrana, avaliada neste trabalho, mostrou-se eficaz na remoção do P solúvel presente como contaminante no ácido fítico comercial. Esta remoção é crucial para a realização de “screenings” visando o isolamento e a identificação de microrganismos mineralizadores de P.

## Referências

ALMEIDA, R. S. **Identificação e caracterização de genes transportadores de fósforo em cana-de-açúcar**. 2002. 76 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

BARRIENTOS, L.; SCOTT, J. J.; MURTHY, P. P. N. Specificity of hydrolysis of phytic acid by alkaline phytase from lily pollen. **Plant Physiology**, Washington, v. 106, n. 4, p. 1489-1495, Dec. 1994.

GARGOVA, S.; ROSKOVA, Z.; VANCHEVA, G. Screening of fungi for phytase production. **Biotechnology Techniques**, Surrey, v. 11, p. 221-224, 1997.

GRANT, C. A.; PLATEN, D. N.; TOMAZIEWICZ, D. J.; SHEPPARD, S. C. **A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta**. Piracicaba: Potafos, 2001.

KONIETZNY, U.; GREINER, R. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 37, p. 791-812, 2002.

MILLER, S. S.; LIU, J.; ALLAN, D. L.; MENZHUBER, C. J.; FEDOROVA, M.; VANCE, C. P. Molecular control of acid phosphatase secretion into the rhizosphere of proteoid roots from phosphorus-stressed white lupin. **Plant Physiology**, Washington, v. 127, p. 594-606, 2001.

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

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J.; NUNES, F. N. Fósforo. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 471-550.

RAJAPAKSHA, R. M. C. P.; HERATH, D.; SENANAYAKE, A. P.; SENEVIRATHNE, M. G. T. L. Mobilization of rock phosphate phosphorus through bacterial inoculants to enhance growth and yield of wetland rice. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 42, n. 3, p. 301-314, 2011.

VANCE, C. P.; UHDE, S. C.; ALLAN, D. L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, Oxford, v. 157, p. 423-447, 2003.

### Circular Técnica, 189

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Milho e Sorgo**  
**Endereço:** Rod. MG 424 km 45 Caixa Postal 151  
 CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG  
**Fone:** (31) 3027 1100  
**Fax:** (31) 3027 1188  
**E-mail:** cnpms.sac@embrapa.br  
 1ª edição  
 1ª impressão (2013): on line

Ministério da  
 Agricultura, Pecuária  
 e Abastecimento



### Comitê de publicações

**Presidente:** Presidente: Sidney Netto Parentoni.  
**Secretário-Executivo:** *Elena Charlotte Landau.*  
**Membros:** *Dagma Dionísia da Silva, Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro, Monica Matoso Campanha, Maria Marta Pastina, Rosângela Lacerda de Castro e Antonio Claudio da Silva Barros.*

### Expediente

**Revisão de texto:** *Antonio Claudio da Silva Barros.*  
**Normalização bibliográfica:** *Rosângela Lacerda de Castro.*  
**Tratamento das ilustrações:** *Tânia Mara A. Barbosa.*  
**Editoração eletrônica:** *Tânia Mara A. Barbosa.*