

# SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO BACTERIANA: IMPLEMENTAÇÃO DE UM NOVO E PRECISO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO

Pohlmann, NB<sup>1</sup>; Moreira, FS<sup>1</sup>; Costa, PB<sup>1</sup>; Passaglia, LMP<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil  
 natalia\_bp@yahoo.com.br

## INTRODUÇÃO

Fósforo é um nutriente essencial para as plantas, porém geralmente é encontrado em baixa disponibilidade no solo e o uso de fertilizantes fosfatados requer altas dosagens para promover alta produtividade, uma vez que a maior parte do fósforo adicionado se torna indisponível para a planta. Micro-organismos solubilizadores de fosfato têm uma função importante em prover formas inorgânicas de fosfato e estudar seus mecanismos é uma alternativa para prover o suprimento de fósforo para plantas.

## OBJETIVOS

A detecção da habilidade de solubilizar fosfato por micro-organismos é geralmente baseada em avaliações qualitativas de solubilização de fosfato tricálcio (TCP) em meio sólido (Fig 1). A validade do método tem sido criticada tanto pelas medições quantitativas imprecisas (tamanho do halo e diâmetro da colônia), quanto por suas aplicações práticas, já que TCP não é a fonte menos solúvel de fosfato, apesar do teste em placa já ter sido muito utilizado. Ainda, quando usando o meio líquido, o volume de meio usado não é prático para testes em grande escala. Nós buscamos a miniaturização do ensaio em meio líquido e trouxemos a implementação de uma nova metodologia usando, além de TCP, fosfato de ferro (FeP) e fosfato de alumínio (AIP) em meio líquido resultando em quantificações mais precisas (Fig. 2).



Fig 1: Placa de TCP utilizada em testes de solubilização de fosfato.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.529	0.490	0.365	-0.164	-0.128	-0.100	2.005	1.975	2.083	0.000	0.000	0.000
B	0.518	0.426	0.556	-0.331	-0.368	-0.241	1.592	1.692	1.415	0.000	0.000	0.000
C	0.954	0.720	1.032	-0.214	-0.221	-0.208	1.859	1.824	1.782	0.105	0.342	0.591
D	0.919	1.004	0.995	-0.334	-0.365	-0.284	2.505	1.963	2.083	0.827	0.936	1.063
E	0.696	0.836	0.828	-0.239	-0.261	-0.143	1.757	1.715	1.703			
F	0.784	1.057	1.071	-0.126	-0.357	-0.181	1.766	1.647	1.706			
G	0.980	0.941	0.937	-0.444	-0.538	-0.270	1.679	1.578	1.530			
H	0.579	0.642	0.484	-0.316	-0.294	-0.188	1.753	1.764	2.008			

Fig 2: Leituras das absorvâncias para quantificar a solubilização de fosfato (Colunas 1-3: AIP; 4-6: FeP; 7-9: CaP. Linhas A-E: isolados 68, 51, 4PAC, 7PAC, 174; linhas F-H: isolados 45, 5PAC, 95. Brancos (0,000) com cores respectivas; curva padrão para fosfato abaixo dos brancos).

## MATERIAL E MÉTODOS

Nós buscamos a miniaturização do ensaio em meio líquido desenvolvendo uma metodologia de solubilização de fosfato que pode ser aplicada em teste de grande escala, sendo mais preciso que os testes com placa de TCP.

Foram testados dez isolados bacterianos originados de diversas plantas e tipos de solo. Para medir a solubilização de fosfato nós usamos o sobrenadante da cultura reagindo com uma solução de ácido ascórbico que atua como um indicador colorimétrico para quantificação por espectrometria.

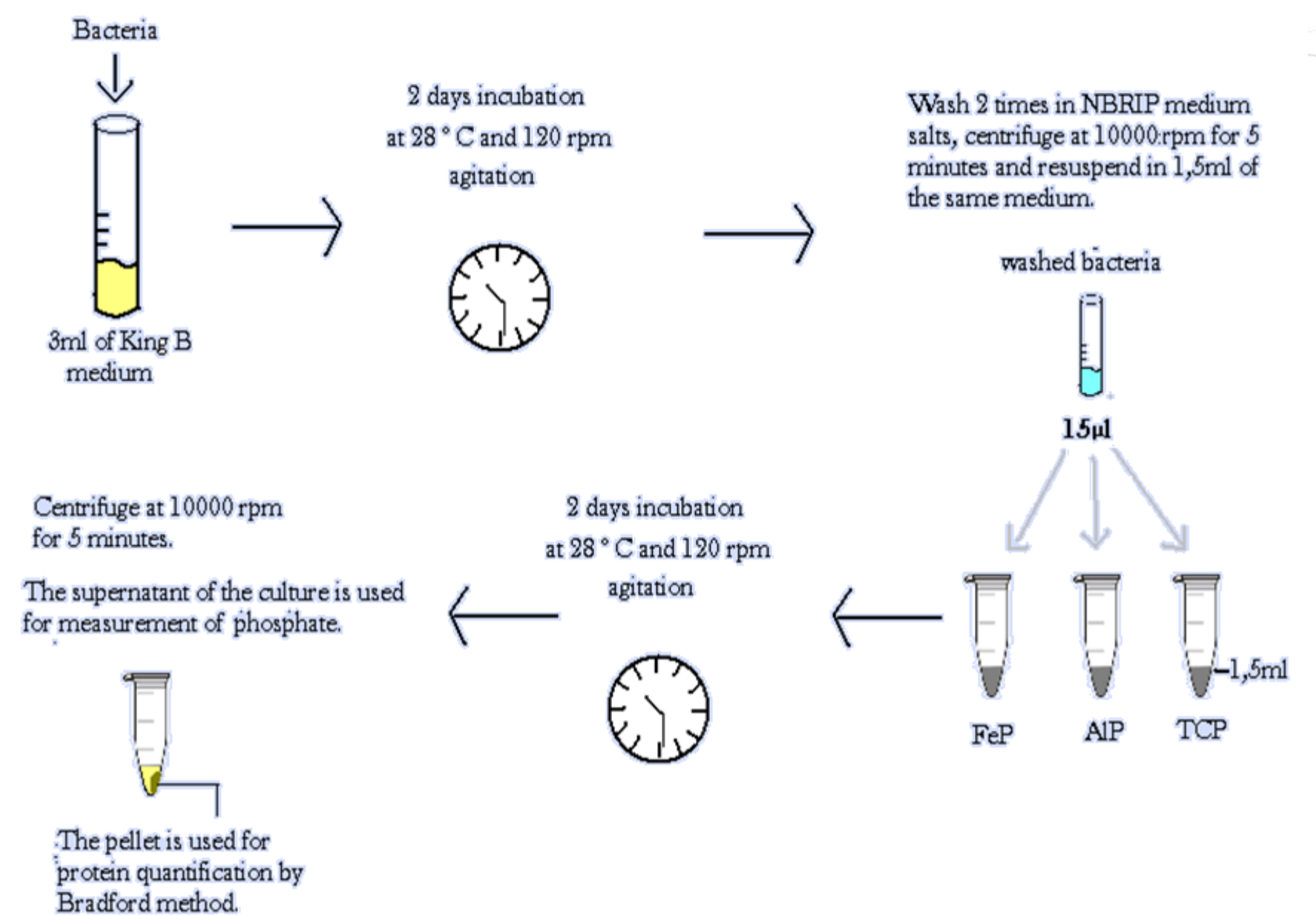


Fig. 3: Esquema do ensaio de solubilização de fosfato em meio líquido.

A absorvância obtida foi relacionada com a curva padrão para determinar quanto fosfato foi dissolvido no meio líquido, e então relacionado à quantificação de proteína (método de Bradford) para cada amostra, como mostrado na Figura 3.

Quando tentamos implementar o teste em meio líquido, foram levantadas algumas questões e a metodologia teve que sofrer ajustes.

Primeiro, nós testamos se era possível miniaturizar o ensaio e se diferentes tamanhos de inóculo causariam resultados diferentes. A miniaturização dos volumes dos meios de 50 ml para 1.5 ml foi possível e nenhuma diferença relativa ao tamanho do inóculo foi observada.

Depois, nós observamos que o NaOH, utilizado para a lise celular para quantificação de proteínas, reagia com o ferro do meio FeP, o qual se tornava amarelado. Uma vez que o método de Bradford é dependente de cor, nós fizemos um teste de quantificação de proteína adicionando quantidades conhecidas de BSA em meio FeP e comparamos com a curva padrão, que apresentou interferência da cor amarela. Assim, nós decidimos fazer a lise celular em todas as amostras por fervura das culturas bacterianas. Os limites de detecção do método, para cada meio também foram determinados.

## RESULTADOS E PERSPECTIVAS

Dos dez isolados avaliados, nenhum foi capaz de solubilizar FeP ou AIP e todos foram capazes de solubilizar TCP (Fig. 4). Nós pretendemos testar novos isolados para diferentes habilidades de solubilização de fosfato em experimentos *in vivo* para avaliar a aquisição de fosfato pelas plantas hospedeiras. Além disso, tentaremos detectar os genes *gdh* e *pqqE*, envolvidos na expressão do fenótipo de solubilização de fosfato.

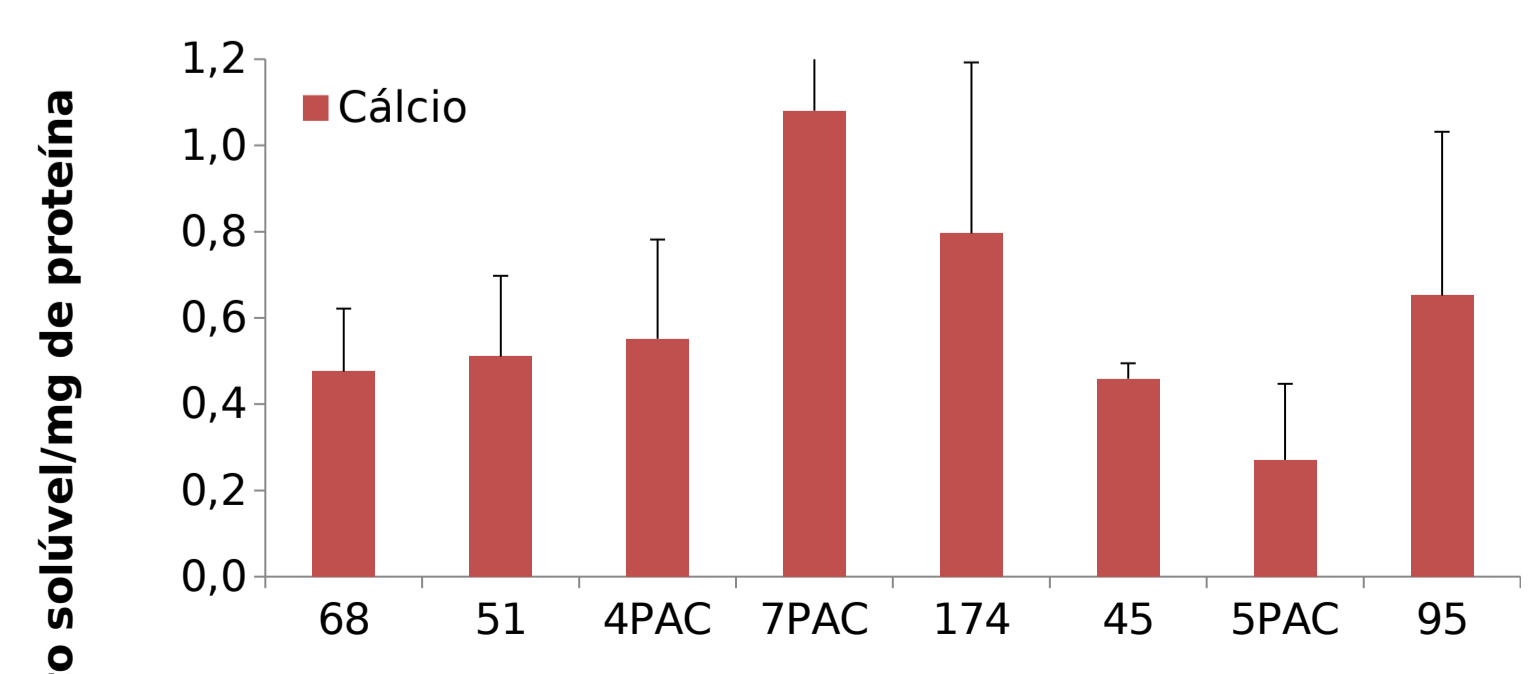


Fig 4: Solubilização de fosfato tricálcio por linhagem.