

Brasília, DF / Dezembro, 2024



Ensaio colorimétrico como ferramenta para prospecção de microrganismos solubilizadores de fosfato

Kelly Barreto Rodrigues⁽¹⁾, Carolyne Caetano Gonçalves⁽¹⁾, Thais Demarchi Mendes⁽²⁾, Thályta Fraga Pacheco⁽²⁾, Léia Cecilia de Lima Fávaro⁽³⁾, Mônica Caraméz Triches Damaso⁽³⁾

⁽¹⁾ Bolsista, Embrapa Agroenergia, Brasília, DF. ⁽²⁾ Analista, Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

⁽³⁾ Pesquisadora, Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

Resumo – O método colorimétrico de Murphy e Riley (1962) é amplamente utilizado para determinação de fosfatos solúveis. Uma das possíveis aplicações desse método é a seleção de microrganismos que solubilizam fosfato insolúvel contido no solo. O método propõe a realização do ensaio em um volume suficiente para que a leitura espectrofotométrica seja feita em cubeta. Isso torna o ensaio mais dispendioso quando comparado à possibilidade de ser realizado em microplacas, tendo em vista o gasto com reagentes e amostras, tornando o ensaio em volume reduzido mais rápido e ambientalmente amigável. Além disso, a redução dos volumes do ensaio possibilita a avaliação de um número maior de microrganismos solubilizadores de fosfato, simultaneamente. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a equivalência do ensaio padrão de determinação de fosfatos solúveis com ensaio realizado com redução de volume em 20 vezes. A redução do volume possibilita que as reações e leituras dos ensaios sejam feitas em microplacas de 96 poços. A verificação da equivalência dos ensaios foi realizada com sobrenadantes obtidos do cultivo de cinco linhagens bacterianas solubilizadoras de fosfato: BRM 058102; BRM 057852; BRM 065072; BRM 058050; e BRM 058056. Foram realizados ensaios distintos e independentes para a comparação entre os teores de fosfato determinados pelos ensaios padrão e de volume reduzido. Os resultados dos ensaios mostraram a equivalência dos dois métodos, possibilitando a triagem de um número maior de microrganismos de maneira rápida, eficiente e econômica.

Termos para indexação: equivalência, fosfato solúvel, linhagens microbianas.

Colorimetric assay as a tool for prospecting phosphate solubilizing microorganisms

Abstract – The colorimetric method of Murphy and Riley (1962) is widely used for the determination of soluble phosphates. One of the possible applications of this method is the selection of microorganisms that solubilize insoluble phosphate contained in the soil. The method proposes performing the test in a volume sufficient for the spectrophotometric reading to be made in a cuvette. This makes the test more expensive when compared to

Embrapa Agroenergia

Parque Estação Biológica (PqEB), s/nº
Ed. Embrapa Agroenergia
Caixa Postal 40315
70770 901 Brasília, DF
www.embrapa.br/agroenergia
www.embrapa.br/fale_conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente
Juliana Evangelista da Silva Rocha
Secretária-executiva
Lorena Costa Garcia Calsing

Membros

Alexandre Nunes Cardoso,
Diogo Keiji Nakai, João Ricardo
Moreira de Almeida, Leonardo
Fonseca Valadares, Lívia Teixeira
Duarte Brandão, Priscila Seixas
Sabaini e Sílvia Belém Gonçalves

Edição executiva

Antonio Claudio da Silva Barros

Revisão de texto

Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica

Rosângela Galon Arruda
(CRB-1/2133)

Projeto gráfico

Leandro Sousa Fazio

Diagramação

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Publicação digital: PDF

Todos os direitos reservados à Embrapa.

the possibility of being performed in microplates, considering the expense of reagents and samples, making the test in reduced volume faster and more environmentally friendly. In addition, the reduction of the test volumes allows the evaluation of a greater number of phosphate-solubilizing microorganisms simultaneously. Thus, the objective of this study was to verify the equivalence of the standard test for the determination of soluble phosphates with a test performed with a 20-fold reduction in volume. The reduction in volume allows the reactions and readings of the tests to be performed in 96-well microplates. The equivalence of the assays was verified using supernatants obtained from the cultivation of five phosphate-solubilizing bacterial strains: BRM 058102; BRM 057852; BRM 065072; BRM 058050; and BRM 058056. Separate and independent assays were performed to compare the phosphate levels determined by the standard and reduced-volume assays. The assay results showed the equivalence of the two methods, enabling the screening of a larger number of microorganisms in a fast, efficient and economical manner.

Index terms: equivalence, soluble phosphate, microbial strains.

Introdução

O fósforo (P) é um nutriente essencial ao desenvolvimento das plantas, no entanto, sua forma solúvel, comumente, encontra-se em baixa disponibilidade no solo, dificultando a absorção pelas plantas. Dessa forma, a utilização de biofertilizantes contribui ativamente no ciclo do fósforo, aumentando a biodisponibilidade desse elemento para absorção pelas raízes e reduzindo o uso de fertilizantes químicos, que possuem preços elevados e podem ser danosos ao meio ambiente.

Nesse contexto, a disponibilização de microrganismos solubilizadores de fosfato no solo (MSP) se mostra uma alternativa promissora. Para que isso se concretize, é necessária a utilização de metodologias que permitam quantificar e analisar os fosfatos solubilizados por esses microrganismos, possibilitando, assim, comprovar sua eficiência como biofertilizantes agrícolas.

Assim, este presente trabalho contribui para atender aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) propostos pela Organização das Nações Unidas (ONU). O primeiro é o ODS 2 – “Fome Zero e Agricultura Sustentável”, especificamente contemplando as metas 2.3 e 2.4, em que há o comprometimento de dobrar a produtividade

agrícola, e garantir sistemas sustentáveis de produção de alimentos, por meio de pesquisa, assistência técnica e extensão rural até 2030, respectivamente. Também busca atender ao ODS 3 – “Saúde e Bem-estar”, em particular a meta 3.9, que busca reduzir mortes e doenças causadas por produtos químicos perigosos, bem como a contaminação de ar, água e solo. Este trabalho, igualmente, contempla o ODS 8 – “Trabalho Decente e Crescimento Econômico”, particularmente a meta 8.2, a qual busca atingir níveis mais elevados de produtividade agregando valor ao produto final, por meio de inovação tecnológica. Por fim, o trabalho também contribui com o ODS 12 – “Consumo e Produção Sustentáveis”, principalmente nas metas 12.4 e 12.5, as quais almejam reduzir a liberação de resíduos por meio da prevenção, redução, reciclagem e reuso, buscando minimizar os impactos negativos do manejo de resíduos químicos.

A deficiência de nutrientes em solos brasileiros é um problema amplamente descrito na literatura agrônômica. Dados divulgados em 2022 revelam que a quantidade de fertilizantes importados durante o ano de 2021 foi recorde, chegando a 41,6 milhões de toneladas, segundo a Conab (2022), o que representa um aumento de cerca de 8% em relação ao ano anterior, o maior dos últimos 5 anos. Ainda de acordo com a Conab (2023), o Brasil reduziu as importações de fertilizantes, no período de janeiro de 2022 a dezembro de 2022, em 8,1% na comparação com o mesmo período de 2021. Porém o montante pago pelos produtos quase triplicou no período, por causa do cenário de instabilidade gerado pela guerra no Leste Europeu, evidenciando a dependência externa do Brasil em relação aos fertilizantes.

O fósforo é um nutriente essencial para o crescimento das plantas, e, apesar de o P total da maioria dos solos ser relativamente elevado, encontra-se em baixa disponibilidade para as plantas. Em geral, apenas 0,1% do P total do solo existe em uma forma solúvel, prontamente disponível para absorção imediata pelas plantas (Zhou et al., 1992).

Dessa forma, o P precisa ser suplementado na maioria dos solos agrícolas, pela adição de fertilizantes químicos sintéticos. Apenas cerca de 5% a 30% dos fertilizantes fosfatados aplicados aos solos são aproveitados pelas plantas, estimando-se que uma grande proporção do P adicionado ao solo e não removido pelas culturas (mais de 70%) permanece no solo em formas não disponíveis para as plantas (Omar, 1998; Pavinato et al., 2020).

Dentro desse contexto, uma alternativa sustentável para o manejo integrado de fertilizantes é o uso de microrganismos capazes de maximizar

disponibilização de formas solúveis desse nutriente retido no solo. Os microrganismos solubilizadores de fosfato (MSP) têm se mostrado uma alternativa para aumentar a eficiência do uso de P para as plantas, e, no futuro, poderão contribuir para a diminuição do uso de fertilizantes fosfatados (Nautiyal, 1999; Mardad et al., 2013; Oliveira-Paiva et al., 2022).

A inoculação de MSP diretamente no solo é uma solução sustentável para a promoção do crescimento e a melhoria da nutrição de plantas, e é fundamental para o desenvolvimento de técnicas agrícolas inovadoras e ecológicas (Oliveira-Paiva et al., 2020). Para tal, é necessária a utilização de metodologias que permitam quantificar e analisar os fosfatos solubilizados por esses microrganismos, possibilitando, assim, comprovar a eficiência desses microrganismos como biofertilizantes agrícolas.

Uma estratégia que pode ser utilizada para triagem desses microrganismos em laboratório é a seleção, por meio da formação de halo de solubilização em meio específico, contendo fosfato tricálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), fosfato de ferro (FePO_4) ou fosfato de alumínio (AlPO_4). Para isso, os microrganismos são cultivados, preferencialmente, em meio NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium), em razão da baixa quantidade de sulfato de amônio e da ausência de extrato de levedura nesse meio, visto que esses reagentes apresentam efeito inibitório para a solubilização do fosfato (Nautiyal, 1999). Essa estratégia se baseia na formação de um halo translúcido ao redor da colônia microbiana que apresenta capacidade solubilizadora, evidenciando qualitativamente a solubilização de fósforo inorgânico (Pi) (Nautiyal, 1999; Souchie et al., 2005).

Segundo Berraquero et al. (1976), o halo de solubilização é medido pelo seguinte critério: diâmetro total (ϕ halo + ϕ colônia) dividido pelo diâmetro da colônia, considerando-se a média das repetições para cada amostra. O resultado obtido é expresso pelo Índice de Solubilização (IS) por meio da fórmula: $\text{IS} = \phi \text{ Halo (mm)} / \phi \text{ Colônia (mm)}$. De acordo com os índices de solubilização, os isolados podem ser classificados como cepas de baixa solubilização ($\text{IS} < 2$), média ($2 \leq \text{IS} \leq 4$) e alta solubilização ($\text{IS} > 4$).

Outra maneira de selecionar microrganismos solubilizadores de fosfato é por meio do método quantitativo descrito por Murphy e Riley (1962), o qual pode ser utilizado para a determinação e a quantificação relativa de fosfatos solúveis em amostras. Nesse método colorimétrico, o complexo fosfomolibdênio é oxidado pelo ácido ascórbico, formando a coloração azulada após 20 minutos de reação. Quanto maior o teor de fosfatos solubilizados, mais

escura será a coloração e, conseqüentemente, maior absorvância será obtida pela leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 880 nm (Murphy; Riley, 1962). É um método eficiente para quantificar o fosfato presente em amostras obtidas a partir do cultivo de microrganismos.

Contudo, ao se utilizar esse método em etapa de seleção de MSP, na qual é investigada uma grande quantidade de linhagens microbianas, gera-se um grande gasto de tempo e de reagentes, uma vez que o volume total do ensaio colorimétrico descrito por Murphy e Riley (1962) é de 6,5 mL, e a leitura das amostras é realizada individualmente em cubetas utilizando-se o volume de apenas 1 mL.

No presente trabalho, foi avaliada a redução do volume final de reação de 6,5 mL para 0,325 mL, mantendo-se as mesmas proporções do método padrão. Um volume final menor permite que as reações e as leituras de absorvância sejam realizadas em microplacas de 96 poços. A utilização do método descrito por Murphy e Riley (1962) e adaptado para um volume reduzido viabiliza, além de menor gasto de reagentes, uma maior celeridade na obtenção dos dados de concentração de PO_4 nas amostras, e, por conseguinte, a avaliação de um número maior de microrganismos.

Para mostrar a equivalência entre o método descrito por Murphy e Riley (1962) (padrão) e o método adaptado (volume reduzido) na determinação da concentração de fosfato solubilizado, cinco linhagens bacterianas previamente selecionadas foram aplicadas em ensaios com os volumes do protocolo padrão, reduzidos em 20 vezes, mantendo-se as proporções de cada reagente. Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 880 nm.

Materiais e métodos

Linhagens microbianas

Neste trabalho foram avaliadas 370 linhagens de bactérias, as quais se encontram conservadas por ultracongelamento na Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias (CMMAABio), localizada na Embrapa Agroenergia (<https://am.cenargen.embrapa.br/amconsulta/colecao?id=17>). A autorização de acesso foi registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número A50B5A2.

Prospecção de linhagens bacterianas solubilizadoras de fosfato em meio NBRIP sólido

Com o objetivo de selecionar bactérias solubilizadoras de fosfato, foram prospectadas 370 bactérias em placas de Petri contendo meio NBRIP sólido (Nautiyal, 1999) com as diferentes fontes de fosfatos $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 ou AlPO_4 (experimento realizado em quadruplicata; incubação a 28 °C durante 15 dias). Desse total, oitenta e quatro formaram halo em pelo menos um dos meios avaliados, indicando a ocorrência da solubilização do fosfato inorgânico.

Utilizando-se uma combinação de critérios, tais como valores de índice de solubilização e comparação de médias pelo teste de Tukey, precocidade de formação do halo de solubilização no meio sólido e identificação taxonômica (quando existente), cinco linhagens foram selecionadas para a próxima etapa, o cultivo em meio líquido: Bioenzi B-104A (BRM 058102); Bioenzi B-286B (BRM 057852); CNPAE 34_11E (BRM 065072); Bioenzi B-559B (BRM 058050) e *Pantoea* sp. Bioenzi B-570B (BRM 058056).

Cultivo das bactérias selecionadas em meio líquido e obtenção de amostras para quantificação de fosfato solubilizado

As linhagens selecionadas na primeira etapa (BRM 058102, BRM 057852, BRM 058056, BRM 065072 e BRM 058050) foram submetidas a uma segunda etapa de seleção, que consistiu em uma análise quantitativa do fosfato solubilizado nos sobrenadantes dos cultivos realizados em condições de fermentação submersa (cultivo líquido), em meios contendo $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 ou AlPO_4 .

Para o pré-inóculo, as bactérias foram cultivadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 20 mL de caldo triptona de soja (TSB, Tryptic Soy Broth). Os frascos foram incubados a 30 °C e 180 rpm por 20 horas. As linhagens foram inoculadas [densidade ótica (DO_{600nm}) inicial ajustada para 0,2] em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo NBRIP líquido (Nautiyal, 1999) suplementado com três fontes de fosfato (em triplicata): trifosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), e fosfatos de ferro (FePO_4) ou de alumínio (AlPO_4). A composição do meio NBRIP líquido foi a seguinte (para 1 L): 10 g de glicose; 5 g de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ou FePO_4 ou AlPO_4 ; 5 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g de KCl; 0,1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Nautiyal, 1999). O pH foi ajustado para 7,0 adicionando-se NaOH 1 M. Os meios foram distribuídos em frascos Erlenmeyers em triplicata para cada uma das fontes de fosfato, e esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 minutos. Após

inoculação das bactérias, os frascos foram incubados a 30 °C e 180 rpm por 10 dias, sendo retiradas alíquotas após 3 dias, 6 dias e 10 dias. Os controles negativos (sem nenhum microrganismo inoculado) foram incubados sob as mesmas condições de cultivo. Após cada tempo de cultivo, alíquotas foram centrifugadas, e o sobrenadante foi congelado em freezer (-20 °C), para posterior análise.

Para a quantificação do teor de PO_4 presente nas amostras, foi feita a quantificação utilizando-se ambos os ensaios (padrão e volume reduzido). A quantificação relativa de fosfato solúvel presente nas amostras foi obtida descontando-se o teor de PO_4 contido no meio de cultura sem inoculação (controle negativo).

Comparação das curvas de calibração obtidas em ensaio padrão e com volume reduzido

Para comparar a equivalência dos ensaios de determinação de fosfatos, foram realizados ensaios distintos e independentes nos dois formatos de ensaio, padrão e com volume reduzido em 20 vezes.

Para os ensaios colorimétricos, foram preparadas as soluções: A (ácido sulfúrico 5 N–70 mL de ácido sulfúrico concentrado (98%) dissolvidos em 500 mL de água destilada); B (20 g de molibdato de amônio dissolvidos em 500 mL de água destilada [32,36 mM]); C (ácido ascórbico 0,1 M–1,32 g dissolvido em 75 mL de água destilada, preparado no momento do uso); e D (tartarato de antimônio e potássio 1 mg Sb mL⁻¹–0,2743 g dissolvidos em 100 mL de água destilada). Para o preparo do mix de soluções, foram misturados 125 mL da solução A, 37,5 mL da solução B, 75 mL da solução C e 12,5 mL da solução D.

A curva padrão para quantificação de PO_4 é feita a partir do fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4). Esse reagente foi previamente seco a 105 °C, por 4 horas, e só então foram pesados 0,044 g de KH_2PO_4 , completando-se para um volume final de 100 mL de água destilada. A concentração da solução estoque foi de 100 mg L⁻¹ de PO_4 . A partir dessa solução, foram preparadas soluções de: 1,0 mg L⁻¹; 2,0 mg L⁻¹; 4,0 mg L⁻¹; 8,0 mg L⁻¹; 10,0 mg L⁻¹; 12,0 mg L⁻¹ e 14,0 mg L⁻¹ de PO_4 (Murphy; Riley, 1962).

A concentração de PO_4 presente em cada uma das soluções foi determinada pelo ensaio padrão proposto por Murphy e Riley (1962), e em ensaio com volume reduzido em 20 vezes, mantendo-se as mesmas proporções do ensaio padrão. As quantidades estão descritas a seguir:

- a) Ensaio padrão (6,5 mL de volume final):
1 mL do mix de soluções + 0,5 mL de amostra + 5 mL de água destilada. As reações

foram feitas em frascos de 25 mL, mantidos por 20 minutos em temperatura ambiente. Após o período de incubação, cerca de 1 mL foi transferido para cubeta, e a absorvância a 880 nm foi determinada.

- b) Ensaio com volume reduzido (325 μ L de volume final): 50 μ L de mix de soluções + 25 μ L de amostra + 250 μ L de água destilada. As reações foram feitas em microplacas de 96 poços, mantidas por 20 minutos em temperatura ambiente. Após o período de incubação, a absorvância a 880 nm foi determinada em leitora de microplaca.

As equações de calibração para o método padrão e o método com volume reduzido foram obtidas com auxílio do software Excel.

Verificação da equivalência dos dois formatos de ensaio, padrão e reduzido

A equivalência entre os ensaios no formato padrão e reduzido foi avaliada também na quantificação de PO_4 em amostras de fosfato solubilizado pela ação bacteriana. Foram utilizadas amostras do cultivo da bactéria Bioenzi B-559B (BRM 058050), em meio NBRIP suplementado com as três fontes de fosfato descritas anteriormente. O teor de PO_4 das amostras biológicas foi quantificado utilizando-se como referência os valores obtidos nas curvas de calibração (3 para ensaio padrão e 3 para ensaio com volume reduzido). As curvas de calibração e as amostras de fosfato solubilizado por ação bacteriana foram preparadas utilizando-se o mesmo mix de reagentes, para cada um dos formatos de ensaio. Foi utilizado teste t para verificação de possíveis

diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos pelos dois formatos de ensaio, considerando intervalo de confiança de 95%.

A relação estatística entre os teores de PO_4 obtidos pelos dois formatos de ensaio foi também avaliada pela determinação do coeficiente de correlação de Pearson.

Resultados e discussão

Seleção das linhagens bacterianas solubilizadoras de fosfato em meio NBRIP sólido

Após 15 dias de incubação, foi realizado registro fotográfico das bactérias formadoras de halo em meio NBRIP contendo $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Não foi detectada a formação de halo para as demais fontes de PO_4 (FePO_4 ou AlPO_4). A Figura 1 mostra o registro fotográfico das cinco bactérias selecionadas para cultivo em meio líquido e quantificação de PO_4 solúvel.

Avaliação do teor de PO_4 nos sobrenadantes dos cultivos das bactérias selecionadas

A Figura 2 mostra o registro fotográfico da quantificação do teor de PO_4 , por ensaio padrão (Figura 2A) e por ensaio com volume reduzido (Figura 2B), em soluções de diferentes concentrações de KH_2PO_4 .

As curvas de calibração para os ensaios nos dois formatos, padrão e de volume reduzido, foram obtidas. A representação gráfica está apresentada nas Figuras 3A e 3B. É possível notar que as curvas apresentam linearidade na mesma faixa de concentração de PO_4 .

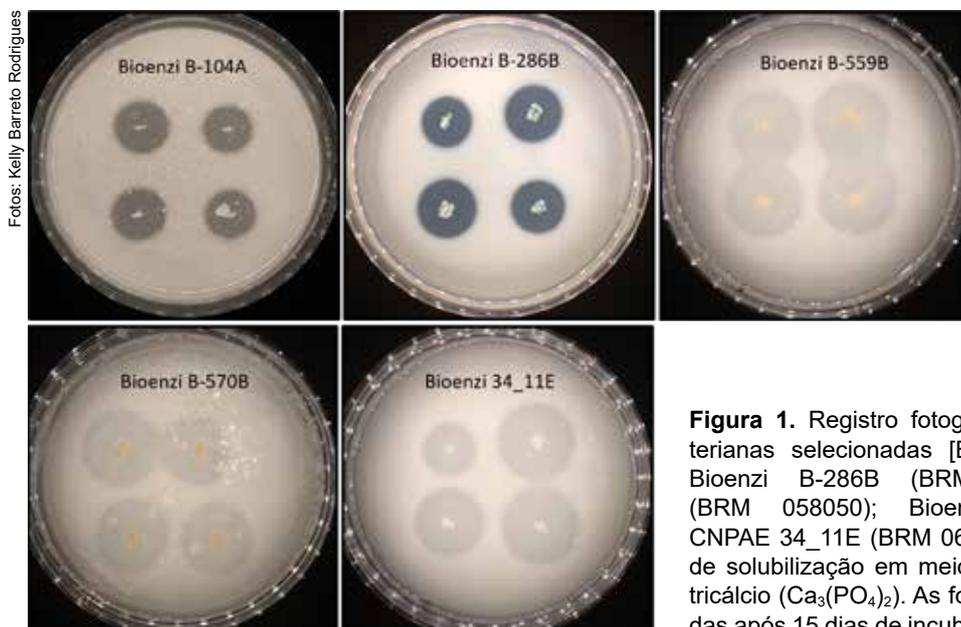


Figura 1. Registro fotográfico das cinco linhagens bacterianas selecionadas [Bioenzi B-104A (BRM 058102); Bioenzi B-286B (BRM 057852); Bioenzi B-559B (BRM 058050); Bioenzi B-570B (BRM 058056); CNPAE 34_11E (BRM 065072)]. O registro mostra o halo de solubilização em meio sólido NBRIP contendo fosfato tricálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). As fotos apresentadas foram registradas após 15 dias de incubação a 28 °C, na ausência de luz.

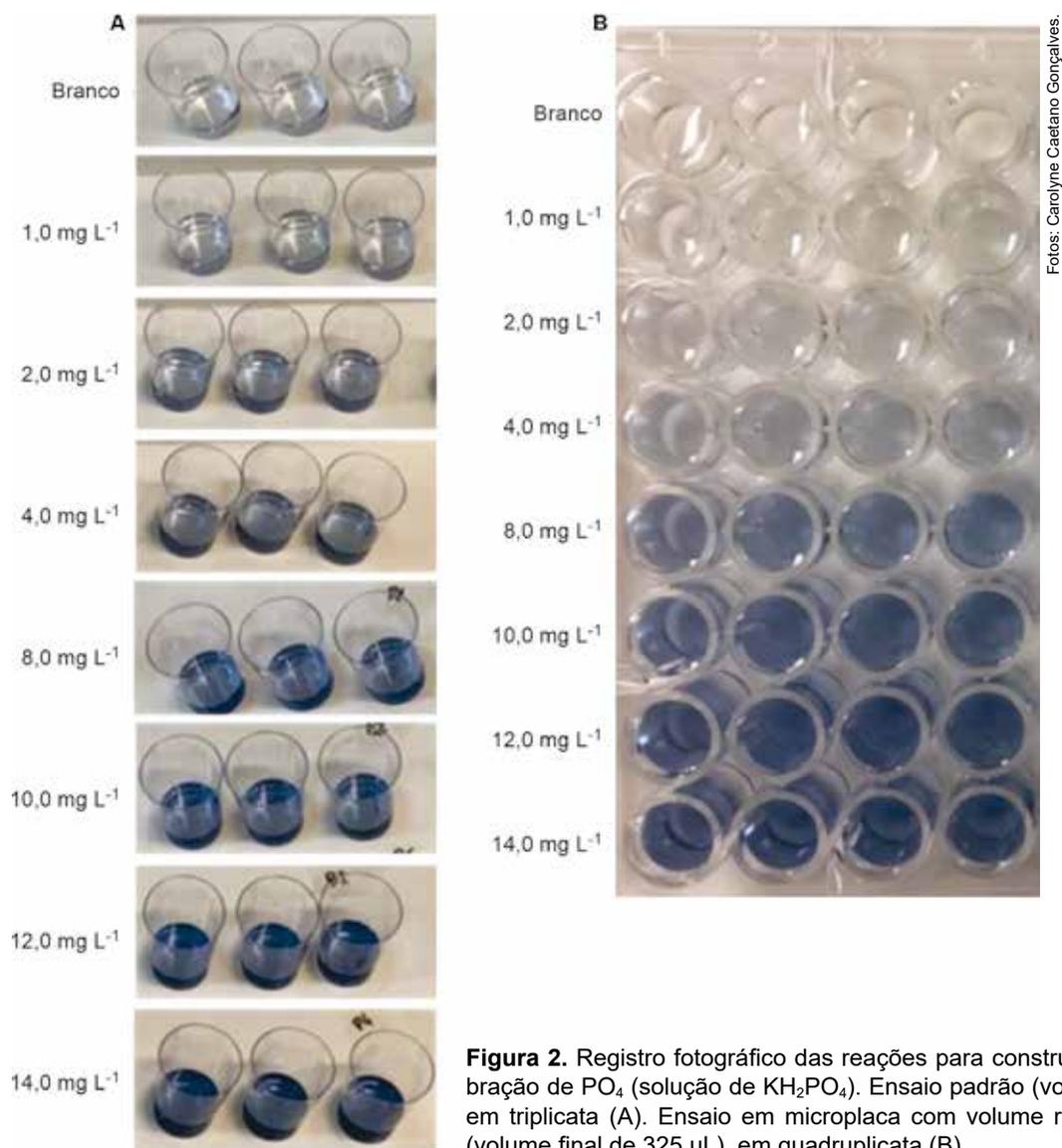


Figura 2. Registro fotográfico das reações para construção da curva de calibração de PO_4 (solução de KH_2PO_4). Ensaio padrão (volume final de 6,5 mL), em triplicata (A). Ensaio em microplaca com volume reduzido em 20 vezes (volume final de 325 μL), em quadruplicata (B).

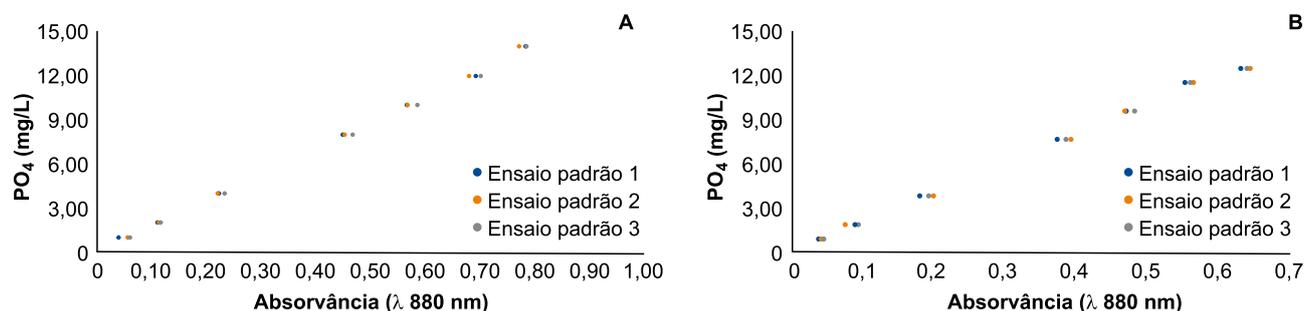


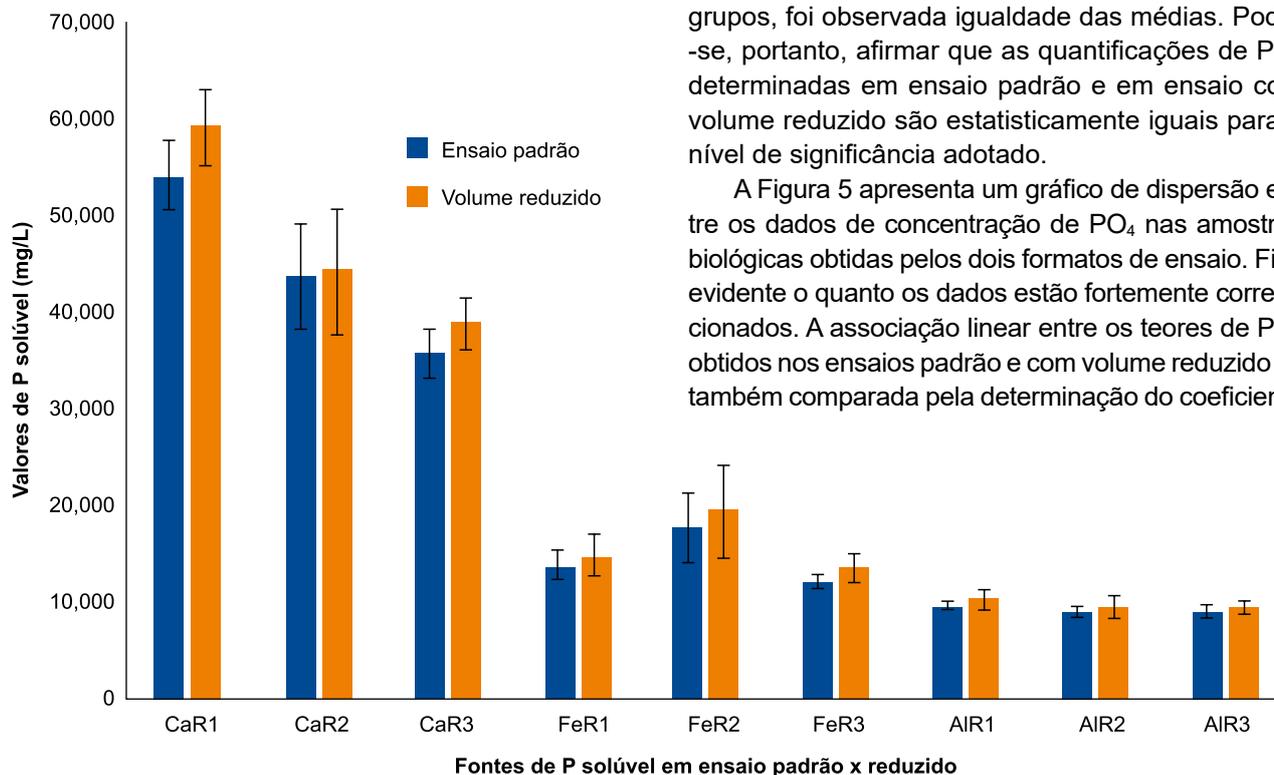
Figura 3. Curvas de calibração de PO_4 (solução de KH_2PO_4). Ensaio padrão (A). Ensaio volume reduzido (B).

Avaliação da equivalência dos dados obtidos dos formatos de ensaio padrão e de ensaio com volume reduzido

A concentração de fosfato nas amostras biológicas ($n = 9$) obtidas com os cultivos da bactéria Bioenzi B-559B (BRM 058050), em triplicata, em meio líquido NBRIP contendo diferentes fontes de

fosfato (cálcio (Ca), ferro (Fe) e alumínio (Al)), foi determinada utilizando-se cada uma das curvas de calibração obtidas (três curvas no ensaio padrão e três no ensaio com volume reduzido). Foram retiradas alíquotas após 3 dias, 6 dias e 10 dias de cultivo, originando um total de 135 amostras. Levando em consideração que os ensaios de quantificação

de fosfato são feitos em triplicata, obtêm-se, no mínimo, 405 análises a serem realizadas, pois, quando algumas análises extrapolam a curva de calibração, precisam ser repetidas. O elevado número de ensaios ressalta a importância de um método mais rápido e prático para a triagem de microrganismos solubilizadores de fosfato.



Os valores obtidos nos ensaios com volume padrão foram comparados aos obtidos nos ensaios com volume reduzido, para cada uma das amostras. A Figura 4 mostra o gráfico comparativo dos valores de PO_4 solubilizado obtidos do cultivo da bactéria Bioenzi B-559B (BRM 058050). Para todos os casos, foram observadas variâncias iguais. Após aplicação do teste t para comparação das médias dos grupos, foi observada igualdade das médias. Pode-se, portanto, afirmar que as quantificações de PO_4 determinadas em ensaio padrão e em ensaio com volume reduzido são estatisticamente iguais para o nível de significância adotado.

A Figura 5 apresenta um gráfico de dispersão entre os dados de concentração de PO_4 nas amostras biológicas obtidas pelos dois formatos de ensaio. Fica evidente o quanto os dados estão fortemente correlacionados. A associação linear entre os teores de PO_4 obtidos nos ensaios padrão e com volume reduzido foi também comparada pela determinação do coeficiente

Figura 4. Comparação dos métodos ensaio padrão e volume reduzido para quantificação do teor de PO_4 solubilizado pela bactéria Bioenzi B-559B (BRM 058050), após 10 dias de cultivo das triplicatas biológicas (R1, R2 e R3) em meio NBRIP contendo $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (CaR1, R2, R3), FePO_4 (FeR1, R2, R3) e AlPO_4 (AIR1, R2, R3). O gráfico mostra a quantidade real de fosfato solúvel (mg L^{-1}), já descontado o valor de fósforo do controle negativo (C-). Barras verticais indicam o desvio padrão da média de três repetições.

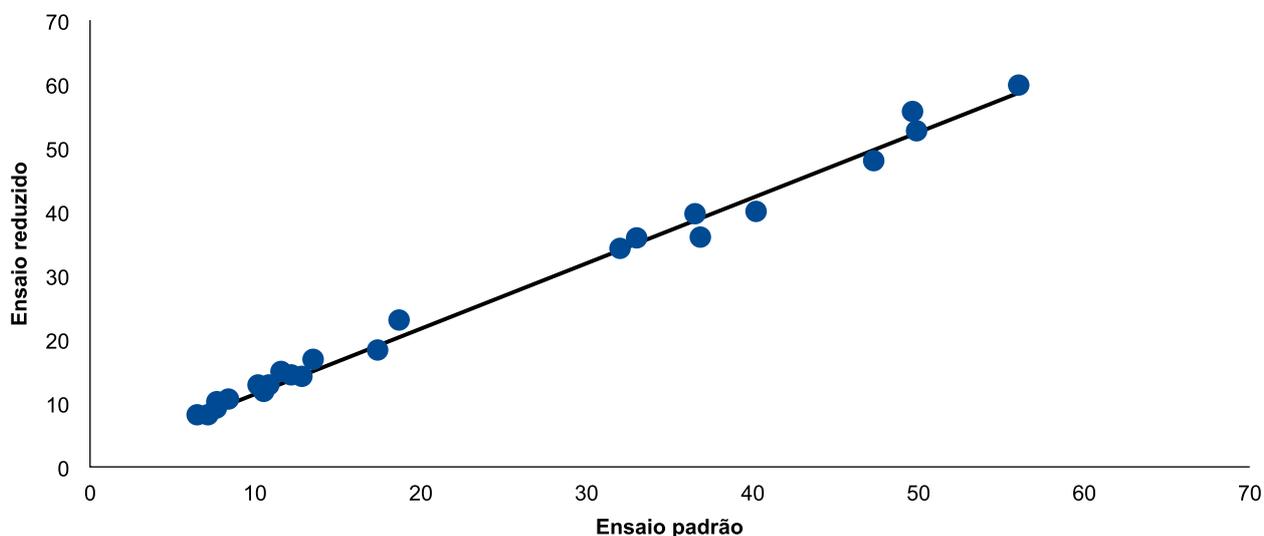


Figura 5. Gráfico de dispersão correlacionando os resultados de determinação de teor de PO_4 em mg L^{-1} , obtidos pelo ensaio padrão e ensaio volume reduzido.

de correlação de Pearson, equivalente a 0,9975, o que demonstra forte correlação entre os dados obtidos. Um teste de significância para o coeficiente de correlação obtido mostra que existe correlação entre as variáveis do ensaio padrão e ensaio com volume reduzido, com nível de significância de 0,05%.

Conclusões

O método colorimétrico de Murphy e Riley (1962) é um dos mais utilizados para a determinação de fosfatos solúveis em amostras. O protocolo originalmente descrito é realizado com um volume de reagentes maior que o necessário para a leitura espectrofotométrica em cubetas, gerando um gasto de reagentes desnecessário. Além disso, a leitura em cubetas consome muito mais tempo quando comparada à leitura realizada em microplaca de 96 poços, uma vez que é feita individualmente. A realização do ensaio de Murphy e Riley (1962) adaptado para microplacas é uma alternativa que economiza tempo e reagentes, além de gerar menos resíduos. Com base nos resultados apresentados, é possível afirmar que existe equivalência entre os teores de fosfato determinados pelo método padrão proposto por Murphy e Riley (1962) e pelo ensaio com volume reduzido em 20 vezes. Sendo assim, pode-se atestar a qualidade e a equivalência dos dados obtidos em ensaios com volume reduzido, podendo ser utilizado para triagem de microrganismos solubilizadores de fosfato.

Agradecimentos

À empresa Satis Indústria e Comércio Ltda., pela parceria, pelo apoio financeiro ao projeto e pela confiança no trabalho desenvolvido.

À Empresa Brasileira de Pesquisa e Inovação Industrial (Embrapii), pelo apoio financeiro ao projeto que tornou possível o desenvolvimento experimental para a geração dos resultados apresentados neste Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento.

Às pesquisadoras Christiane Abreu de Oliveira Paiva e Eliane Aparecida Gomes, da Embrapa Milho e Sorgo, por terem compartilhado com a nossa equipe suas experiências no tema.

Referências

BERRAQUERO, F. R.; BAYA, A. M.; CORMENZANA, A. R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, v. 17, p. 399-406, 1976. Disponível em: <https://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/24869>. Acesso em: 27 jun. 2023.

CONAB. Importação de fertilizantes é record e chega a 41,6 milhões de toneladas. **Boletim Logístico**, ano VI, jan. 2022. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4486-importacao-de-fertilizantes-e-recorde-e-chega-a-41-6-milhoes-de-toneladas>. Acesso em: 27 jun. 2023.

CONAB. Mercado de fretes e conjuntura de exportação. **Boletim Logístico**, ano VI, jan. 2023. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/boletim-logístico?start=10>. Acesso em: 27 jun. 2023.

MARDAD, I.; SERRANO, A.; SOUKRI, A. Solubilization of inorganic phosphate and production of organic acids by bacteria isolated from a moroccan mineral phosphate deposit. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 8, p. 626-635, 2013. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJMR12.1431>

MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 27, p. 31-36, 1962. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5).

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 265-270, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>.

OLIVEIRA-PAIVA, C. A. ; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; COTA, L. V.; SANTOS, F. C. dos; TINOCO, S. M. de S.; LANA, U. G. de P.; OLIVEIRA, M. C.; MATTOS, B. B.; ALVES, V. M. C.; RIBEIRO, V. P.; VASCO JUNIOR, R. **Recomendação agrônômica de cepas de Bacillus subtilis (CNPMS B2084) e Bacillus megaterium (CNPMS B119) na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2020. 18 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 260). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/214364/1/Circ-Tec.-260.pdf> Acesso em: 27 jun. 2023.

OLIVEIRA-PAIVA, C. A.; ALVES, V. M. C.; GOMES, E. A.; SOUSA, S. M. de; LANA, U. G. de P.; MARRIEL, I. E. Microrganismos solubilizadores de fósforo e potássio na cultura da soja. In: MEYER, M. C.; BUENO, A. de F.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. da (ed.). **Bioinsumos na cultura da soja**. Brasília, DF: Embrapa, 2022. p. 163-179. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1143389/1/Microrganismos-solubilizadores-de-fosforo-e-potassio-na-soja.pdf>. Acesso em: 27 jun. 2023.

OMAR, S. A. 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 Biotechnology**, v. 14, p. 211-218, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1008830129262>.

PAVINATO, P. S.; CHERUBIN, M. R.; SOLTANGHEIS, A.; ROCHA, G. C.; CHADWICK, D. R.; JONES, D. L. Revealing soil legacy phosphorus to promote sustainable agriculture in Brazil. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 15615, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72302-1>.

SOUCHIE, E. L.; ÁZCON, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN JUNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. da. Solubilização de fosfatos em meio sólido e líquido por bactérias e fungos

do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1149-1152, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2005001100015>.

ZHOU, X.; BINKLEY, D.; DOXTADER, K. G. A new method for estimating gross phosphorus mineralization and immobilization rates in soils. **Plant and Soil**, v. 147, p. 243-250, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00029076>.