

# **Estudo prospectivo sobre processos biotecnológicos para biossolubilização de agro-minerais.**

**Diego Valentim Crescente Cara**  
Biólogo, M.Sc

**Andrea Camardella de Lima Rizzo**  
Orientadora, Eng. Química, D. Sc.

**Claudia Duarte Cunha**  
Orientadora, Eng. Química, D. Sc.

## **Resumo**

O Brasil apresenta um grande potencial para o agronegócio devido ao seu privilegiado clima, porém muitas regiões necessitam ser suplementadas com fertilização química. O Brasil importa 92% do potássio utilizado na agricultura (950 US\$-FOB em 2008, preço este cerca de 10 vezes maior do que o praticado em 2001)(Brasil, 2009). A biossolubilização surge como proposta biotecnológica de utilização de minerais com teor de K como fonte deste macronutriente. No presente estudo, realizou-se o isolamento de linhagens potencialmente solubilizadoras de K, através de uma rochagem contendo flogopitito ou glauconita como fonte única de potássio e posterior semeadura em meio GEL agarizado pela técnica spread plate. Prosseguiu-se os estudos através da fermentação em meio Aleksandrov, e um planejamento experimental 2<sup>2</sup> variando a linhagem (IG 04 e Nigla 05) e presença ou ausência de Fe(III) no meio reacional por um total de 28 dias. Obteve-se 75 mg/l de K em 28 dias utilizando a linhagem Nigla 05 sem ferro no meio de cultura, valor este indicando potencial de utilização.

Seção: Metalurgia Extrativa e Bioprocesso.

## **1. Introdução**

O potássio é nutriente essencial a todos os seres vivos, um dos dez mais abundantes na crosta terrestre. Na fisiologia vegetal, em particular, desempenha funções importantes no controle das atividades enzimáticas envolvidas em diversos processos metabólicos como fotossíntese, síntese de proteínas e carboidratos. Além disso, o potássio tem influência direta no balanço hídrico e no crescimento de meristemas (van Straaten, 2007). A sua assimilação, em quantidades adequadas tem como principais consequências uma maior resistência a pragas e doenças e melhor qualidade de produto colhido. Pode-se afirmar que o potássio é um fator de normalidade em equilíbrio dinâmico: potássio mineral (minerais primários e secundários), potássio trocável e potássio da solução do solo (solúvel) (Nascimento & Lapido- Loureiro, 2004).

O Brasil encontra-se em situação crítica em relação à dependência de importação de fertilizantes, em especial ao potássio. A única mina em produção (mina Taquari-Vassouras, em Sergipe) satisfaz apenas 8% das necessidades do país. Os outros 92% do potássio consumido pelo Brasil é importado do Canadá, Rússia ou

Alemanha, sendo portanto, fortemente dependente de importações (Brasil, 2009; Nascimento & Lapido- Loureiro, 2004).

O Brasil apresenta uma geodiversidade de 355 Mkm<sup>2</sup> de solo com aptidão geoagrícola, aliado ao potencial dos solos, o clima tropical, as chuvas regulares e abundância de energia solar, destacam-se como principais vantagens comparativas para o agronegócio (Brasil, 2009).

Com o aumento da produção agrícola e conseqüentemente do uso do potássio na agricultura, aliado ao seu preço crescente (950 US\$-FOB em 2008, preço este cerca de 10 vezes maior do que o praticado em 2001, Figura 1) e a importação de 92% das necessidades internas, impulsionou-se a busca por alternativas fontes de potássio (Brasil, 2009). Com isso, pesquisas estão sendo feitas com minerais que apresentem teores relativamente altos de potássio em sua estrutura (maiores que 6% K<sub>2</sub>O). Alguns estudos (Bigam et al., 2001; Yuan et al., 2004; Badret et al., 2006; Paris et al., 2006; Calvaruso et al., 2008), demonstram que podem ocorrer microrganismos capazes de solubilizar rochas potássicas, devido a ação dos próprios microrganismos e/ou os subprodutos derivados do metabolismo desses atuando quimicamente sobre as rochas.

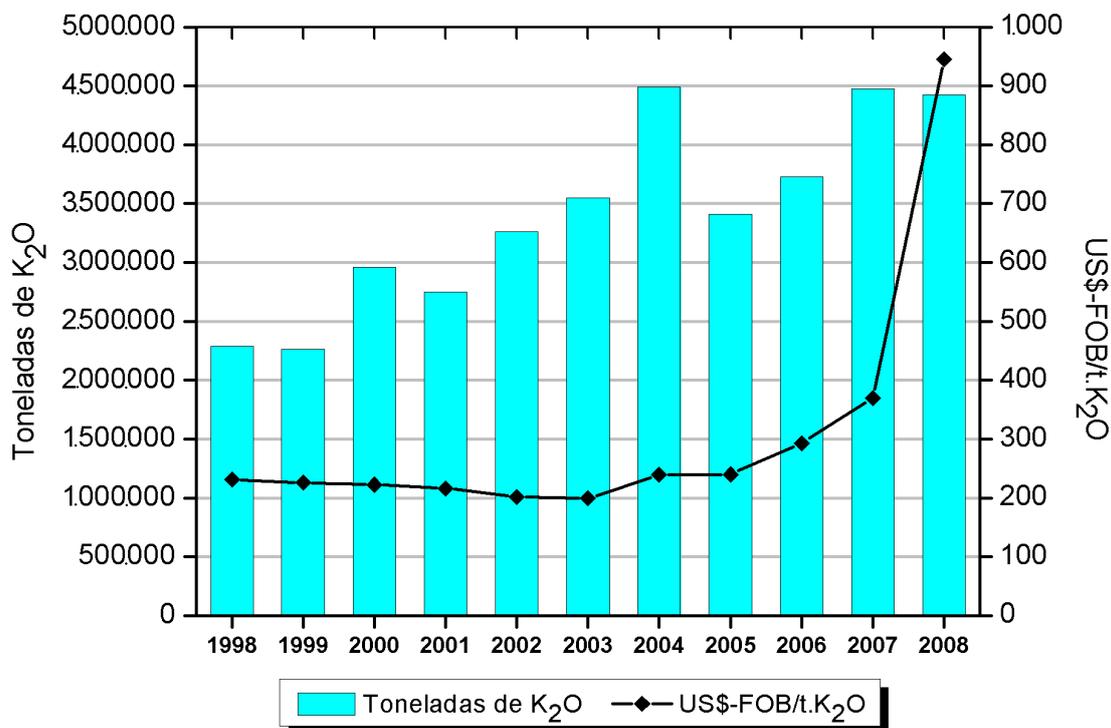


Figura 1. Consumo de potássio no Brasil (tonelada de K<sub>2</sub>O) e preço praticado no mercado internacional.

Portanto, o objetivo do presente estudo é realizar o isolamento de microrganismos rizosféricos presente em um solo brasileiro (com conteúdo pobre de potássio), suplementado com dois diferentes pós-de-rocha como fonte única de potássio e semeados com girassol (*Helianthus annuus* L.) como sistema vegetal. Posteriormente, utilizar os microrganismos isolados do solo como agentes de solubilização do potássio presente no flogopitito, em ensaios em meio líquido.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Lixiviação Química

Em erlenmeyers de 250 ml de capacidade contendo 10 g de flogopitito e 100 ml solução Mehlich-1 ( $H_2SO_4$  0,025N + HCl 0,05 N), foram mantidos sob agitação em mesa agitadora com rotação constante de 150 rpm e temperatura de 30°C. Os ensaios foram realizados em triplicatas (frascos de sacrifício), em diferentes tempos de contato (1,4,24,48,72,120 e 168 h), a fim de se avaliar a cinética de extração do potássio. O método analítico empregado para a determinação do potássio foi a potenciometria, utilizando eletrodo íon-seletivo modelo HI-4114 e potenciômetro modelo HI-253, ambos fabricados pela empresa *Hanna Instruments*. Objetivou-se com o estudo da lixiviação química obter resultados para posterior comparação com os obtidos na lixiviação biológica.

### 2.2 Isolamento e Seleção de Potenciais Microrganismos Solubilizadores de Potássio

Foram cultivados cinco aquênios de girassol (aquênio EMBRAPA V 122) em cada vaso contendo 2Kg de solo suplementados separadamente com os seguintes pós-de-rocha de minerais (gentilmente cedidos pela COPM/CETEM): flogopitito 3,6 g/kg de solo e glauconito 1,9 g/kg de solo. Análise prévia do conteúdo de potássio presente no flogopitito e glauconita era de 7% de  $K_2O$  e 9,5 % de  $K_2O$ , respectivamente, sendo esses valores utilizados para o cálculo de adição de K no solo para que fosse equivalente a 40 mg/kg de K no solo, como é o recomendado para a cultura de girassol. A granulometria de ambas as rochas utilizadas em todos os experimentos foi menor que 40 mesh.

Após surgimento dos capítulos (inflorescência) e desenvolvimento dos respectivos aquênios, o que levou cerca de 90 dias, as plantas foram colhidas e o solo das respectivas rizosferas separados e pesados, onde 20 g do solo foram adicionados em 250 mL meio GEL líquido (Dalcin, 2008), contendo o potássio sob a forma de pó-de-rocha, para cada cultivo. A composição do meio GEL utilizado foi: Glicose 10,0 g; Extrato de levedura 1,0 g; NaCl 0,01 g;  $Na_2HPO_4$  4,0 g;  $NH_4NO_3$  0,005 g; Solução de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  10% 2 ml; Solução de  $CaCl_2$  1% 2 ml; e Solução de micro-nutrientes 2 ml; Solução de Fe-EDTA 4 ml; Água 1000 ml. A composição da solução de micro-nutrientes empregada foi:  $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$  0,2 g;  $MnSO_4 \cdot 2H_2O$  0,235 g;  $H_3BO_3$  0,28 g;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0,008 g;  $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$  0,024 g; Água 200 ml. O meio GEL foi esterilizado a 115°C por 15 minutos. O potássio foi adicionado na forma do pó-de-rocha flogopitito ou glauconita, na densidade de polpa de 50 g/l, o mesmo utilizado por Dalcin (2008)

Os frascos erlenmeyers foram submetidos à agitação em mesa agitadora (200 rpm) e temperatura controlada de 30°C, por um período de 28 dias. O meio GEL fermentado foi trocado semanalmente, mantendo-se o mineral e 10% de volume do mesmo meio original como inóculo. Após o procedimento supracitado, uma amostra (1 ml) de cada erlenmeyer foi retirado e realizado diluições sucessivas (até  $10^{-7}$ ) em solução salina estéril NaCl 0,9% e posterior plaqueamento em meio GEL agarizado (15g/l), obtendo-se assim as colônias individuais. O pó-de-rocha foi distribuído superficialmente com o auxílio de uma alça de Drigalsky, utilizando 0,04 g de flogopitito e 0,02 g de glauconita por placa de Petri, esterilizado em tubos Eppendorfs a 121°C por 15 minutos,

Como o meio GEL apresenta muitos componentes e no intuito de simplificar o meio, através de pesquisa bibliográfica, selecionou-se um meio que atendesse as necessidades mínimas dos microrganismos. Hu et al. (2006) trabalhando com isolamento de microrganismos para a solubilização de potássio e fosfato a partir de aluminossilicato, trabalham com o meio Aleksandrov modificado, decidindo-se por utilizá-lo no presente trabalho e com a seguinte composição: Glicose 0,5%; FeCl<sub>3</sub> 0,0005%; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,05% e CaCO<sub>3</sub> 0,01%. Da mesma forma que realizada no meio GEL do isolamento, a fonte de potássio utilizada foi o pó-de-rocha flogopitito ou glauconita (0,04 g por placa de Petri) espalhado pela superfície da placa de Petri com o meio Aleksandrov agarizado (15 g/l).

A avaliação de crescimento foi visual, sendo selecionadas as colônias que apresentaram crescimento semelhante ao crescimento em meio GEL.

### 2.3 Lixiviação Biológica

Na lixiviação biológica do flogopitito utilizou-se o meio Aleksandrov, sendo o inóculo realizado a partir de uma alçada das respectivas colônias previamente isoladas e selecionadas como descrito no item 3.2. O meio acrescido de 10 g do flogopitito foi esterilizado a 115°C por 15 minutos.

Para avaliar a influência da presença do Fe(III) bem como do tipo de isolado, optou-se por utilizar um planejamento fatorial completo do tipo 2<sup>2</sup>, onde as variáveis estudadas são apresentadas na Tabela 1. O estudo da adição de Fe(III) deve-se ao fato de que este cátion, em algumas espécies de microrganismos induz a produção de agentes quelantes conhecidos como sideróforos.

A quantificação de potássio foi realizada pelo Laboratório de Análises Químicas-COAM-CETEM, utilizando-se a técnica de absorção atômica com chama de ar-acetileno.

Tabela 1. Variáveis reais e escalonadas (entre parênteses) utilizadas no planejamento experimental.

Ensaio	Isolado	Presença de Fe(III)
1	IG 04 (-)	Sem (-)
2	Nigla 05 (+)	Sem (-)
3	IG 04 (-)	Com (+)
4	Nigla05 (+)	Com (+)

IG 04 – Isolamento de Girassol (solo com flogopitito) e Nigla 05 – Isolamento de solo com glauconita.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Lixiviação Química

A figura 2 apresenta a concentração de potássio na solução extratora Merlich-1 após os diferentes tempos de contato.

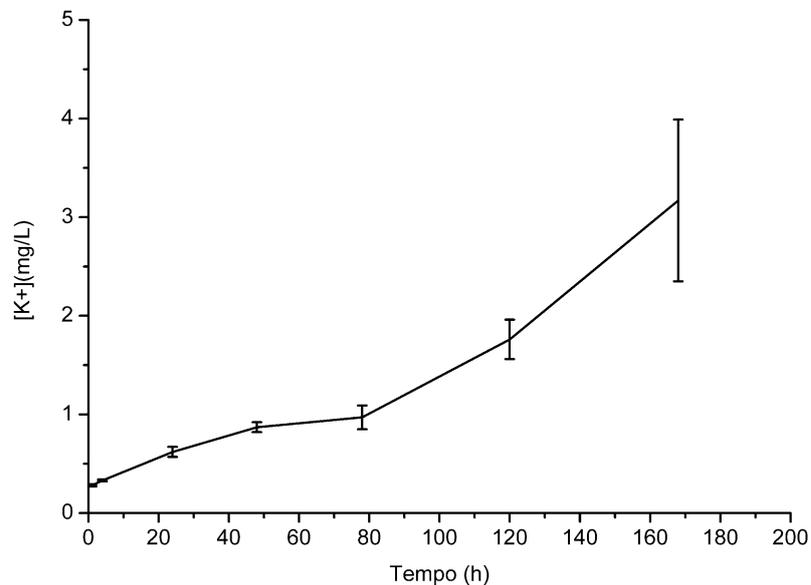


Figura 2. Solubilização de potássio presente no Flogopitito utilizando o extratante Mehlich-1.

Observa-se que a extração é crescente até o tempo estudado de 168 horas, não podendo ser avaliada a extração máxima, sendo necessário a continuação do processo. Como a solução Mehlich-1 é constituída por uma mistura de ácidos fortes  $H_2SO_4$  0,025N e HCl 0,05 N dissolvidos em 1 l de água destilada, os prótons ( $H^+$ ) oriundos da dissociação dos ácidos pode ser trocado com outros cátions, como por exemplo o potássio ( $K^+$ ) presente na rede cristalina dos minerais componentes da rocha utilizada (Bigham, 2001).

O erro encontrado na amostra de 168 h pode ser associado com problemas de amostragem.

#### 3.2 Isolamento e Seleção de Potenciais Microrganismos Solubilizadores de Potássio

Após o crescimento das plantas (*Helianthus annuus* L.) e a retirada do solo rizosférico, com o procedimento de diluições sucessivas e posterior plaqueamento em meio GEL agarizado, foram obtidas ao todo 9 linhagens, sendo 5 oriundas do solo contendo glauconita e 4 oriundas do solo contendo flogopitito. A linhagem IG 04 foi isolada a partir de solo contendo flogopitito e a linhagem Nigla 05 oriunda do solo suplementado com glauconita.

De todos os isolados supracitados, somente dois apresentaram crescimento satisfatório no meio Aleksandrov modificado, sendo estes os isolados IG 04 e Nigla 05. A linhagem IG 04 assemelha-se visualmente a uma levedura enquanto a linhagem Nigla 05 assemelha-se com uma bactéria. As linhagens serão devidamente caracterizadas e identificadas no decorrer do estudo.

### 3.3 Lixiviação Biológica

A Figura 3 apresenta o gráfico de solubilização de potássio a partir do flogopitito utilizando as duas linhagens selecionadas e com a presença ou ausência de Fe(III) na forma de seu cloreto, como descrito no item 2.3.

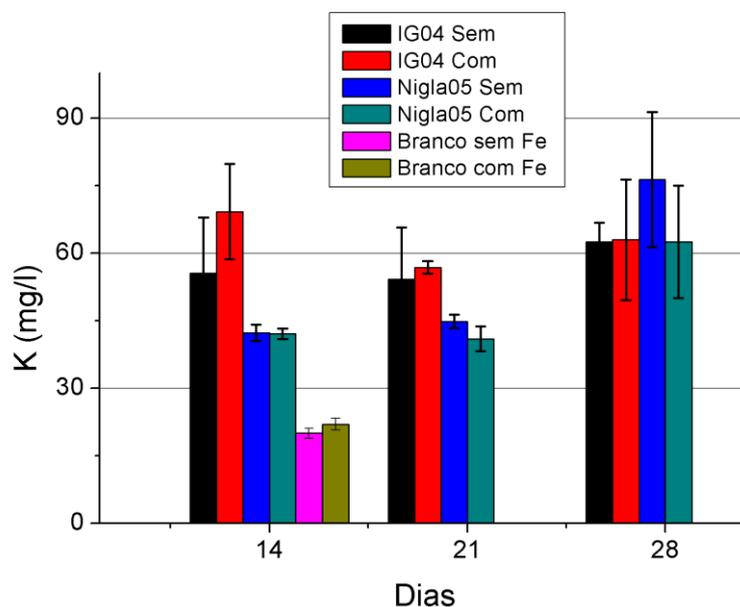


Figura 3. Solubilização de potássio a partir do flogopitito utilizando as linhagens IG04 e Nigla05 na presença e ausência de Fe(III).

Inicialmente (14 dias) a linhagem IG04 mostrou-se mais promissora, obtendo valores iniciais de solubilização superiores aos obtidos pela linhagem Nigla 05. Com o decorrer do processo, em 21 dias observa-se um aumento na extração de potássio da linhagem Nigla 05 sem ferro, atingindo os maiores valores em 28 dias. A glauconita utilizada possui teores expressivos de Ferro em sua constituição (3,8% de  $Fe_2O_3$ ), podendo este funcionar como indutor da produção de uma classe especial de agentes quelantes denominados sideróforos. Estas moléculas são excretadas por algumas bactérias quando encontram um meio deficiente em ferro. A importância dos agentes quelantes é sua habilidade de deslocar as reações, ou seja, no presente estudo, teoricamente o potássio sendo liberado no meio e quelado ficaria impossibilitado de voltar à estrutura cristalina do mineral (Uroz et al.,2009).

Comparando as Figuras 2 e 3, o tempo de 168 h com 14 dias, observa-se que os tempos estudados inicialmente para cada experimento, a lixiviação biológica mostra-se superior em cerca de 10 vezes mais, indicando a atuação ativa do microrganismos na solubilização do potássio.

Na Figura 4 são mostrados os gráficos de Pareto para o tempo 14 (A) e 28 dias (B) de processo.

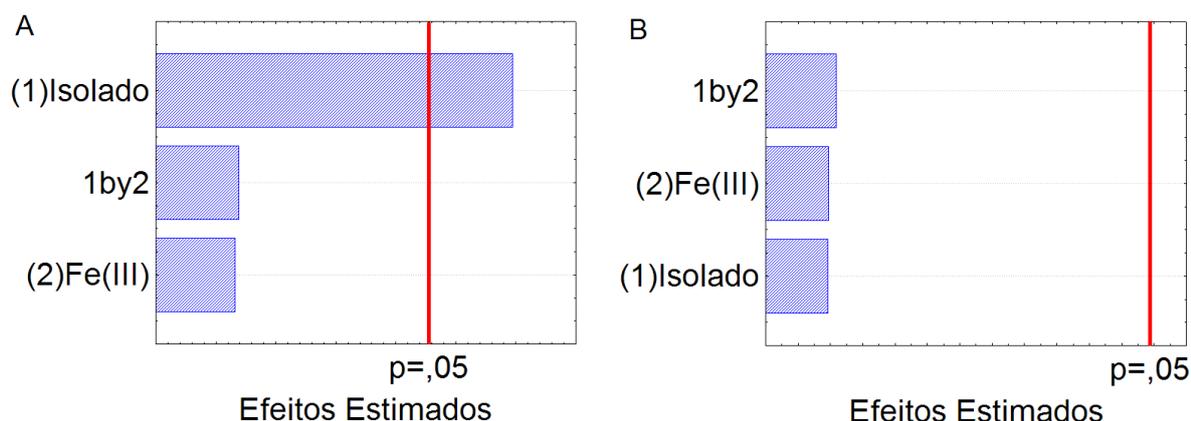


Figura 4. Gráfico de Pareto para os experimentos de lixiviação biológica. (A) 14 dias e (B) 28 dias.

Nota-se que no início do processo (até 21 dias – gráfico não mostrado) existe diferença estatística significativa entre as linhagens utilizadas, porém quando se atinge o tempo superior a 21 dias, não existe mais diferença estatística significativa. Uroz et al (2009) ressaltam que a composição do meio influencia na liberação de agentes solubilizadores. As linhagens são potenciais produtoras de EPS (do Inglês: *Extracellular Polymeric Substances*, em Português: substâncias poliméricas extracelulares). Segundo Uroz et al (2009), o EPS pode atuar na solubilização de nutrientes por criar um microambiente onde as reações se processam de forma mais acelerada do que seria se não houvesse essa camada pois os reagentes tendem a se concentrar. Outra característica importante desses biofilmes é aeração diferencial que podem auxiliar no intemperismo de alguns minerais.

#### 4. Conclusão

Os testes de lixiviação química demonstram que não se atingiu a extração máxima, devendo ter seu tempo estendido até que seja obtido os valores máximos. Porém, conclui-se dos experimentos iniciais de lixiviação biológica (14 dias) e química (168 h – 8dias), o potencial da utilização dos microrganismos (cerca de 20 vezes para a linhagem IG04 com ferro)

A partir dos resultados obtidos na lixiviação biológica, conclui-se que existem diferenças significativas nas linhagens empregadas somente nos primeiros 21 dias de processo, sendo sem significância estatística a partir de 28 dias.

Faz-se necessário prosseguir com os estudos, otimizando as condições de cultivo como aeração, composição do meio e temperatura de processo. Ressalta-se ainda a necessidade de se avaliar o crescimento celular bem como o consumo de substrato e os subprodutos do metabolismo serem quantificados e caracterizados.

## 5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao CETEM, pela disponibilidade da infraestrutura laboratorial, à Dra. Eliana Flávia Camporese Sérvulo (EQ/UFRJ) pelas discussões, à mestranda (EQ/UFRJ) Luana Oliveira por toda ajuda, à COPM pelo fornecimento das rochas utilizadas no presente estudo e ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica.

## 6. Referências Bibliográficas

BIGHAM, J. M., BHATTI, T. M., VUORINEN, A., TUOVINEN, O. H. (2001). Dissolution and structural alteration of phlogopite mediated by proton attack and bacterial oxidation of ferrous iron. **Hydrometallurgy**, 59, 301 – 309.

BRASIL, Departamento Nacional de Produção Mineral (2009). **Economia Mineral do Brasil**. Brasília – DF. Cidade Gráfica e Editora Ltda. 764p.

CALVARUSO, C.; TURPAULT, M-P.; FREY-KLETT, P. (2006). Root-Associated Bacteria Contribute to Mineral Weathering and to Mineral Nutrition in Trees: a Budgeting Analysis. **Applied And Environmental Microbiology** 72 (2): 1258–1266.

DALCIN, G. **Seleção de Microrganismos Promotores da Disponibilidade de Nutrientes Contidos em Rochas, Produtos e Rejeitos de Mineração**. 2008. 100p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis (Brasil).

NASCIMENTO, M. e LAPIDO-LOUREIRO, F. E. (2004). Fertilizantes e sustentabilidade: o potássio na agricultura brasileira, fontes e rotas alternativas. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 66p. (**Série Estudos e Documentos**, 61).

PARIS, F.; BONNAUD, P.; RANGER, J.; LAPEYRIE, F. (1995). In vitro weathering of phlogopite by ectomycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, 177 (2). 191-201.

van STRAATEN, P.(2007). **Agrogeology: The Use of Rocks for Crops**, Canada, Guelph, 440p.

UROZ S, CALVARUSO C, TURPAULT M, FREY-KLETT P.(2009). Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. **Trends in Microbiology**. 17(8):378-387.

YUAN, L.; HUANG, J.; LI, X.; CHRISTIE, P. (2004). Biological mobilization of potassium from clay minerals by ectomycorrhizal fungi and eucalypt seedling roots. **Plant and Soil** 262: 351–361.