

# **BIOLIXIVIAÇÃO DE FLOGOPITTO POR ISOLADOS BACTERIANOS ORIUNDOS DE RIZOSFERA DE *Helianthus annuus* L.: UM ESTUDO PRELIMINAR**

Diego V.C. Cara<sup>1,2</sup>, Daniele L. da Rocha<sup>1</sup>, Cláudia D. Cunha<sup>1</sup>, Eliana. F.C. Sérvulo<sup>2</sup> Andréa C.L. Rizzo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Tecnologia Mineral, CPMA

Avenida Pedro Calmon, 900, Rio de Janeiro, Rj, 21941-908. e-mail: diego.cara@gmail.com

<sup>2</sup>Departamento de Engenharia Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Av. Athos da Silveira Ramos, 149, Rio de Janeiro, Rj, 21941-909. e-mail: eliana@eq.ufrj.br

## **RESUMO**

O potássio é um nutriente essencial a todos os seres vivos e se encontra entre os 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. A sua assimilação, em quantidades adequadas, tem como principais consequências uma maior resistência a pragas e doenças e melhor qualidade do produto colhido. 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 no Brasil é importado do Canadá, Rússia ou Alemanha, sendo, portanto, fortemente dependente de importações, com valor comercial crescente deste insumo agrícola (US\$950-FOB em 2008, preço este cerca de 10 vezes maior do que o praticado em 2001). A biolixiviação surge como proposta biotecnológica de utilização de rochas e minerais, com teores atraentes em potássio, que se configuram como fontes deste macro nutriente. No presente estudo, realizou-se o isolamento de linhagens potencialmente solubilizadoras de potássio, a partir de rizosfera de girassol, contendo flogopitito ou glauconito como fonte única de potássio no solo, utilizando meio mineral (GEL) contendo glicose como fonte de carbono. Foram isolados 12 morfotipos bacterianos, sendo 2 escolhidos para realização dos experimentos subseqüentes de biolixiviação. Prosseguiram-se os estudos de biolixiviação através do crescimento destas estirpes em meio mineral simples contendo glicose (Aleksandrov modificado), acrescido de 10% (p/v) de flogopitito, por 21 dias. Ambas as estirpes promoveram a liberação de valores próximos a 60-70 mg/L de K<sup>+</sup> em 2 semanas (336 h), indicando potencial para utilização em ensaios futuros de otimização do processo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biolixiviação, Potássio, Agrominerais

## 7. INTRODUÇÃO

O elemento potássio é um dos dez mais abundantes na crosta terrestre e ocorre na natureza somente sob a forma de compostos, podendo ser encontrado em minérios e águas salgadas. Além dos minérios formados por cloretos e sulfatos, o potássio está presente em estruturas com teores acima de 10% e em muitos outros com valores entre 2% e 10%. Com o tempo, o intemperismo provoca sua alteração química gerando compostos de potássio solúveis que são transportados pelo rio para o mar (Nascimento *et al.*, 2008).

É o segundo macro nutriente em quantidade utilizada no manejo da adubação das culturas, ficando atrás apenas do fósforo (Lopes-Assad *et al.*, 2006). Cerca de 95% da produção mundial de potássio é utilizada na fabricação de fertilizantes sendo, desses, 90% para a fabricação de cloreto de potássio (KCl) e 5% para a fabricação de sulfato de potássio ( $K_2SO_4$ ) (Nascimento *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2008).

O aumento da produção agrícola e conseqüente uso de potássio na agricultura, aliado ao seu preço crescente (950 US\$-FOB em 2008, preço cerca de 10 vezes maior do que o praticado em 2001), como mostra a Figura 1, impulsionou o desenvolvimento de pesquisas sobre fontes alternativas para a produção de fertilizantes de potássio. Há ainda previsões de que a demanda de óxido de potássio ( $K_2O$ ) cresça 50% até 2015 (Martins *et al.*, 2008), tendo como conseqüência a importação de 92% das necessidades internas. Neste sentido, rochas ou minerais que apresentem teores elevados de potássio (maiores que 6% de  $K_2O$ ) poderão ser fontes alternativas potenciais para a produção de sais de potássio, termofosfatos potássicos ou ainda para aplicação direta nos solos como fertilizantes de potássio de liberação lenta (Nascimento e Lapido-Loureiro, 2004).

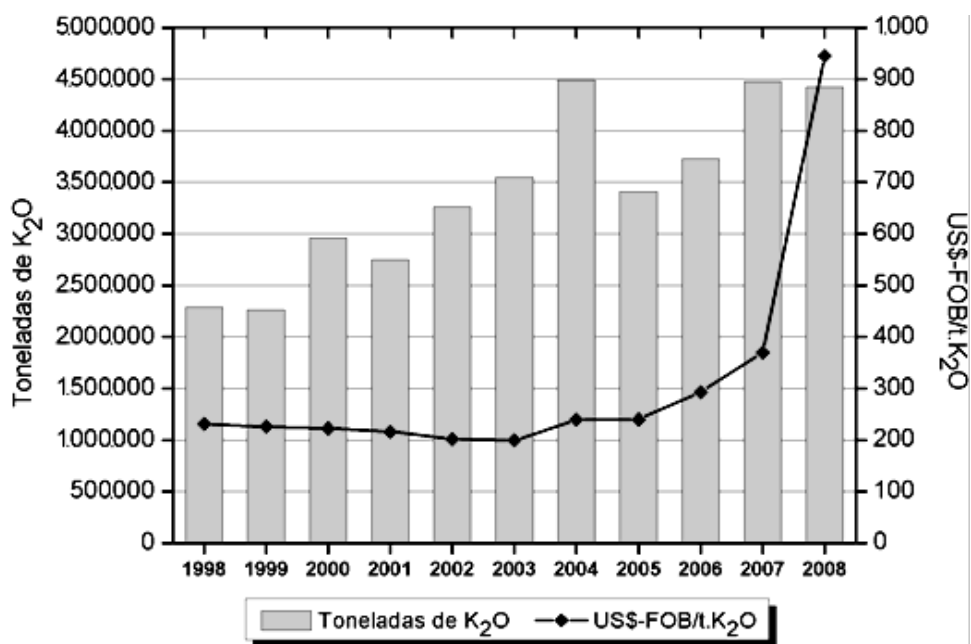


Figura 1 – Consumo aparente em toneladas de  $K_2O$  e preço da tonelada de  $K_2O$  em US\$-FOB (ver referência Brasil, 2009).

O potássio está presente em numerosos minerais, a maioria com presença significativa de potássio na sua rede cristalina, mas apenas um pequeno número deles, constituído por cloretos e/ou sulfatos, é considerado de interesse econômico devido, principalmente, ao seu conteúdo em potássio e à sua fácil solubilização. A maioria dos minerais contendo potássio em sua rede cristalina (caso do grupo dos

feldspatos e alguns do grupo da mica) é insolúvel e o processo de dissolução só é possível a partir de forte ataque químico acompanhado de tratamento térmico (Nascimento e Lapido-Loureiro, 2004).

As micas, pela sua estrutura aberta e teores significativos de potássio, são bons indicadores de rochas favoráveis para aplicação na remineralização dos solos. A seguir são apresentados alguns teores de  $K_2O$  em micas: biotita (7-12%), flogopita (17-11%), muscovita (7-10%), ilita (4-8%) e glauconita (5-8%).

O  $K^+$  é o cátion mais abundante no citoplasma e, juntamente com os ânions que o acompanham, tem importantes funções nas células e tecidos das plantas (Dalcin, 2008). O potássio regula a osmose da planta atuando sobre a abertura e fechamento de estômatos através de alterações da turgidez das células-guarda induzidas por uma bomba de potássio na parede celular. Como os estômatos são importantes na regulação da perda de água pelas plantas, o potássio ajuda a diminuir perdas de água e aumenta a tolerância a secas. Ativa a catálise biológica de enzimas e promove o metabolismo do N e a síntese de proteínas. O  $K^+$  tem alta mobilidade entre as células, sendo rapidamente translocado das folhas mais velhas para as mais novas e regiões meristemáticas, com o conseqüente surgimento de sintomas de deficiência nas primeiras (Taiz e Zeiger, 2004; van Straaten, 2007). Tem importância fundamental no desenvolvimento dos frutos, translocação de metais e balanço iônico. Tudo isso o torna um macro nutriente responsável por produtos de boa qualidade a alta produtividade (Lopes-Assad *et al.*, 2006).

A maioria dos solos de plantio contém concentrações significativas do íon metálico ( $K^+$ ). São centenas de quilos de potássio por hectare, mas somente uma pequena quantidade está disponível para as plantas durante todo o período do seu desenvolvimento, provavelmente menos do que 2%, devido às suas diferentes formas de ocorrência no solo:

- I. presente na fase solúvel do solo, na forma do cátion  $K^+$ , disponível para a biota.
- II. adsorvido na superfície dos minerais do solo e da matéria orgânica, formando o que se chama de K-trocável.
- III. presente na estrutura de diferentes minerais, indisponível para os seres vivos.

Portanto, para a disponibilização da forma (III) é necessário que o mineral sofra algum tipo de intemperismo (van Straaten, 2007).

A grande área superficial de alguns tipos de minerais oferece uma capacidade de interagir com substâncias orgânicas e microrganismos, sendo que alguns dos compostos minerais do solo são mais sensíveis às variações de pH e Eh induzidos pela presença de ácidos orgânicos produzidos por bactérias e/ou fungos. Portanto, o intemperismo resultante da atividade biológica é bastante interessante, pois, a microbiota do solo atua intensamente nesse processo, onde os produtos e subprodutos do metabolismo vão atuar sobre as partículas minerais. O impacto dos organismos que vivem em tais ambientes específicos sobre os processos de intemperismo é muito mais importante do que as reações inorgânicas (Velde e Meunier, 2008; Uroz *et al.*, 2009).

Rochas e minerais industriais que apresentam elevados teores de potássio, podem ser utilizados como fontes alternativas deste elemento para utilização agrícola, sendo na produção de sais solúveis, para aplicação direta ao solo, ou ainda na produção de fertilizantes de liberação lenta. Mica é um grupo de minerais constituídos por silicatos hidratados de alumínio, potássio, sódio, ferro, magnésio e por vezes, lítio (Baltar *et al.*, 2008). Alguns representantes do grupo das micas vêm ganhando especial atenção, pois apresentam elevados teores de potássio. Neste grupo, entre outros, incluem-se a flogopita, glauconita, vermiculita, moscovita. Em função destes altos teores de potássio presentes, uma tecnologia possivelmente viável para obtenção de potássio solúvel é a biolixiviação a partir de rochas por intermédio de microrganismos.

## 8. MATERIAIS E MÉTODOS

Os resultados da composição elementar da amostra de flogopitito, obtidos pela técnica de fluorescência de raios X, expressa em óxidos, são apresentados na Tabela 1, sendo os mesmo fornecidos pela COPM/CETEM.

Tabela 1 – Composição elementar da amostra de flogopitito (% peso) expressa em óxidos

<b>Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	<b>CaO</b>	<b>Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	<b>Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	<b>K<sub>2</sub>O</b>	<b>MgO</b>
12,1	0,4	0,5	8,1	9,0	20,8
<b>MnO</b>	<b>NiO</b>	<b>Rb<sub>2</sub>O</b>	<b>SiO<sub>2</sub></b>	<b>TiO<sub>2</sub></b>	<b>Total</b>
0,2	0,2	0,4	43,9	0,2	<b>98,2</b>

Foi realizado, inicialmente, o plantio de aquênios de Girassol Embrapa V 122 (*Helianthus annuus* L.), gentilmente cedidos pela Embrapa, em solo contendo baixo teor de potássio (proveniente do município de Carmópolis, estado de Sergipe) na presença de dois diferentes tipos de rocha como fonte principal de potássio, sendo eles: Flogopitito (9,0% K<sub>2</sub>O), e Glauconito (9,5% K<sub>2</sub>O), na fração menor que 40 mesh. Cada vaso continha 1,8 kg de solo úmido e cinco aquênios distribuídos em forma de X. As relações nutricionais utilizadas foram 40:70:80 NPK (em kg/ha). O Nitrogênio foi adicionado na forma de nitrato de amônio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>), o fósforo na forma de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e, posterior a semeadura, houve adição de cerca de 300 ml de água em cada vaso.

Os experimentos foram realizados em duplicata para cada tipo de rocha e mais dois controles, sendo um positivo (fornecimento de potássio na forma de KCl com proporção de 40 mg/kg de solo) e um negativo, sem adição de fonte de potássio. O período de crescimento foi 45 dias.

Após o período de crescimento da planta, foi realizado o isolamento de microrganismos presentes na rizosfera do girassol, com a retirada de 20g de solo rizosférico e posterior adição em frascos Erlenmeyers de 500 ml de capacidade, contendo 250 ml de meio mineral (meio GEL) com a seguinte composição: Glicose 1% (p/v); extrato de levedura 0,1% (p/v); NaCl 0,001% (p/v); Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,4% (p/v); NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0,0005% (p/v), solução de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (10% p/v) 0,2% (v/v); solução de CaCl<sub>2</sub> (1% p/v) 0,2% (v/v); solução de micronutrientes ( NaMoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,1% p/v; MnSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,118% p/v; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,14% p/v; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,004% p/v; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,012% p/v) 0,2% (v/v); solução de Fe-EDTA 0,4% (v/v), como descrito por Dalcin (2008).

Os frascos continham o mesmo mineral que aquele presente no solo como fonte primária de potássio na concentração de 10% (p/v). Foram feitas transferências sucessivas (10% v/v), a cada semana, para meio fresco mantendo todo o conteúdo do mineral. Após quatro semanas, seguindo o procedimento anteriormente descrito, foi retirada uma alíquota onde se realizou a técnica de diluições seriadas para posterior plaqueamento pela técnica *spread plate*, onde as placas de Petri, previamente preparadas com o mesmo meio solidificado, foram recobertas com o mineral de interesse (0,04 g por placa).

Posteriormente ao isolamento, como forma de reduzir o número de microrganismos a serem testados nos ensaios de biolixiviação, foi realizado experimento para avaliar o crescimento destes isolados em meio mineral mais simples, também contendo glicose como fonte de carbono (meio Aleksandrov modificado), com a seguinte composição: Glicose 0,5%; FeCl<sub>3</sub> 0,0005%; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,05%; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0,05%; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,05% e CaCO<sub>3</sub> 0,01%. A avaliação do crescimento microbiano foi visual e após a seleção das colônias, procedeu-se o esgotamento por estrias no mesmo meio sólido. O processo foi repetido até obtenção de colônias puras, que foram, posteriormente, caracterizadas pelo método de Gram após o preparo de lâminas e observação ao microscópio ótico.

As estirpes isoladas foram mantidas em tubos contendo meio GEL agarizado, armazenadas a 4°C e mantidas através de repiques sucessivos.

Foi realizada, então, em uma segunda etapa, a biolixiviação do flogopitito utilizando as duas estirpes isoladas e pré-selecionadas, empregando-se o meio mineral simples (Aleksandrov modificado). O meio foi acrescido de 10 g de flogopitito, previamente esterilizado a 1,0 atm por 15 minutos. Os ensaios foram realizados em frascos erlenmeyer de 250 mL de capacidade contendo 100 mL de meio e 10% (v/v) do inóculo, preparado em meio líquido com crescimento após 24 horas. Os frascos foram incubados por 21 dias, sob agitação de 150 rpm à 30 °C. Foram retiradas amostras em diferentes tempos (7, 14 e 21) empregando-se frascos de sacrifício.

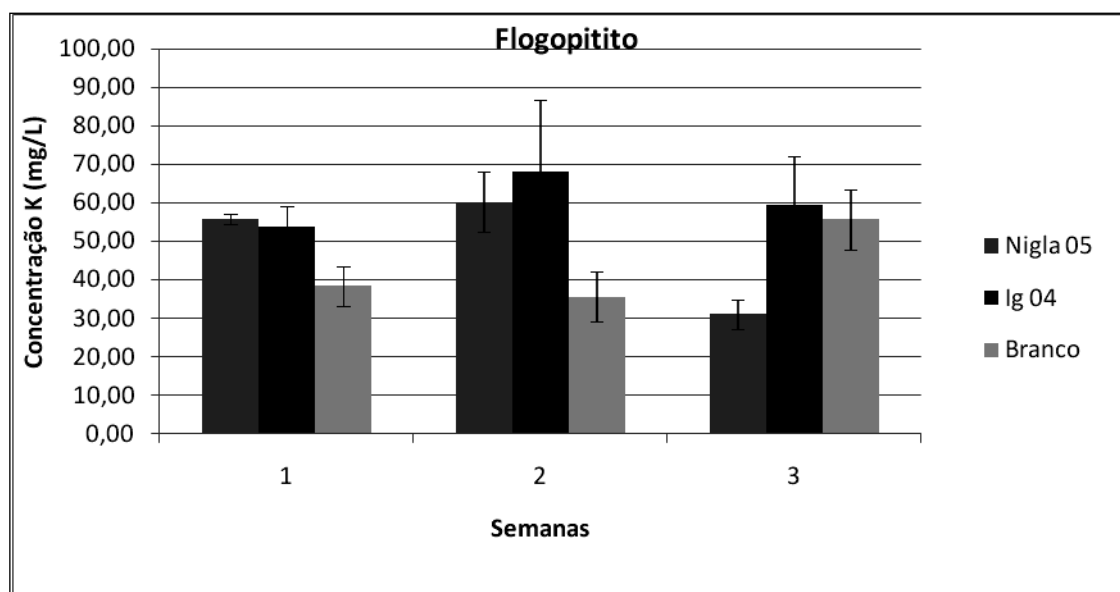
Foi realizado um ensaio controle (branco) contendo somente 100 mL do meio mineral simples, Aleksandrov modificado, e 10 gramas do pó de rocha testado (flogopitito). Os frascos foram mantidos sob as mesmas condições descritas anteriormente.

A quantificação de potássio foi realizada através da técnica de fotometria de chama pelo laboratório da Coordenação de Processamento Mineral (COPM), do CETEM/MCT

## 9. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram isolados 12 diferentes morfotipos a partir da rizosfera de girassol contendo a rocha flogopitito ou glauconito como fonte única de potássio. Os 12 isolados foram avaliados quanto ao crescimento em meio mineral simples agarizado (Aleksandrov modificado) tendo o pó de rocha como fonte de potássio, e apenas dois (NIGLA 05 e IG04) foram selecionados por apresentarem crescimento intenso neste mesmo meio. Estes dois isolados foram então utilizados nos ensaios de biolixiviação. Os resultados de biolixiviação pelas estirpes NIGLA 05 e IG04 estão apresentados na Figura 2. É possível observar que para ambas as estirpes foram alcançados valores próximos a 60-70 mg/L de K<sup>+</sup> em 2 semanas (336 h), e em 3 semanas (540 h), o valor foi praticamente mantido pela estirpe IG04. De forma inesperada, houve decréscimo do teor de K para a estirpe NIGLA 05 em 3 semanas, o que pode estar relacionado a erros de análise ou amostragem. No caso do acréscimo do branco (controle) neste mesmo tempo, é necessário levar em consideração o desvio padrão obtido nos tempos de 2 e 3 semanas.

Dalcin (2008) em estudo de biolixiviação realizado com diferentes rochas (1% p/p), em contato com microrganismos provenientes do banco de culturas do Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal de Santa Catarina, verificou que onze isolados promoveram aumento da solubilização de potássio em relação ao controle sem inoculação. Nos ensaios utilizando flogopitito, os teores médios de K em solução variaram de 35 a 81 mg/L. No presente trabalho, apesar de ter sido usada uma concentração maior de rocha (10% p/p), os valores máximos de K liberado para o meio ficaram em torno de 60-70 mg/L.



**Figura 2.** Solubilização de potássio a partir do flogopitito utilizando as linhagens IG04 e Nigla05 em meio Aleksandrov modificado.

Apesar dos resultados obtidos serem preliminares, as estirpes NIGLA05 e IG04 apresentam potencial para solubilização de potássio a partir de flogopitito, ressaltando que faltam parâmetros a serem estudados e variáveis a serem otimizadas para se tentar alcançar valores ótimos e, portanto, mais expressivos de extração de potássio.

## 10. CONCLUSÕES

- Foram isoladas 12 colônias, com diferentes morfotipos, a partir de rizosfera de girassol em meio mineral rico contendo glauconito ou flogopitito, sendo caracterizadas como bactérias Gram positivas.

- Duas estirpes apresentaram crescimento visual intenso no meio simples Aleksandrov modificado sendo selecionadas para os experimentos de biolixiviação.
  - As estirpes IG04 e NIGLA05, nos ensaios de biolixiviação, proporcionaram a liberação de potássio a partir de flogopitito, alcançando valores próximos a 60-70 mg/L de K<sup>+</sup>.
  - Os valores obtidos até o momento são baixos quando comparados ao teor do mineral (extração abaixo de 1%), além de o controle (branco) ter atingido valores mais altos que os biológicos (3 semanas), necessitando, assim, de novos ensaios que visem à otimização das condições de processo para que haja um aumento significativo na liberação de potássio destas rochas testadas e, conseqüentemente, viabilidade econômica para um aumento de escala.

## 11. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CETEM, pela disponibilidade da infra-estrutura laboratorial, à COPM pelo fornecimento das rochas utilizadas no presente estudo e ao CNPq pela concessão das bolsas de Iniciação Científica e a CAPES pela bolsa de Doutorado.

## 12. CITAÇÕES BIBLIOGRÁFICAS

- Baltar, C. A.; Sampaio, J. A.; Cavalcante, P. M. Mica. in: Luz, A. B.; Lins, F. A. F.(Ed.) Rochas e Minerais Industriais. CETEM/MCT, Rio de Janeiro. 2008.
- Brasil, Departamento Nacional de Produção Mineral. Economia Mineral do Brasil. Cidade Gráfica e Editora Ltda. 764p, 2009.
- Dalcin, G. Seleção de Microrganismos Promotores da Disponibilidade de Nutrientes Contidos em Rochas, Produtos e Rejeitos de Mineração. 100p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis (Brasil)2008.
- Lopes-Assad, M. L.; Rosa, M. M.; Erler, G.; Ceccato Antonini, S. R. Solubilização de pó de rocha por *Aspergillus niger*. Esp. Geogr. 9: 1- 17. 2006.
- Martins, E. S.; Oliveira, C. G.; Resende, A. V.; Matos, M. S. F. Agrominerais – Rochas silicáticas como fontes minerais alternativas de potássio na agricultura. in: Luz, A. B.; Lins, F. A. F.(Ed.) Rochas e Minerais Industriais. CETEM/MCT, Rio de Janeiro. 2008.
- Nascimento M, Lapido-Loureiro FE. Fertilizantes e sustentabilidade: o potássio na agricultura brasileira, fontes e rotas alternativas. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 66p. (Série Estudos e Documentos, 61). 2004.
- Nascimento, M.; Monte, M. B. M.; Lapido-Loureiro, F. E. Agrominerais – Potássio. in: Luz, A. B.; Lins, F. A. F.(Ed.) Rochas e Minerais Industriais. CETEM/MCT, Rio de Janeiro. 990 p, 2008.
- Taiz L, Zeiger E. Plant Physiology. 4th ed. Sinauer Associates, Inc.; 2004.
- Uroz S, Calvaruso C, Turpault M, Frey-Klett P. Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. Trends in Microbiology. 17:378-387, 2009.
- van Straaten, P., Agrogeology: The use of rocks for crops. Canada, Universidade de Guelph / P. van Straaten. 440p. 2007.
- Velde B, Meunier A. The Origin of Clay Minerals in Soils and Weathered Rocks. 1° ed. Springer; 2008.