

BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE POTÁSSIO PRESENTES EM SOLO RIZOSFÉRICO DE ALGODÃO



Camila Ferreira Chaves Mattos

Aluna de Eng. de Bioprocessos, 5º período, UFRJ
Período PIBIC/CETEM : janeiro de 2010 a julho de 2011,
cmattos@cetem.gov.br

Cláudia Duarte da Cunha

Orientadora, Eng. Química, D.Sc.
ccunha@cetem.gov.br

1. INTRODUÇÃO

A agricultura no Brasil tem uma grande importância na economia, contudo a mesma é muito dependente da importação de fertilizantes, dentre eles, destaca-se o potássio, visto que sua taxa de importação chega a 90%. No Brasil, a produção agrícola ainda pode crescer muito, tanto para fins alimentícios como para produção de biocombustíveis (com o cultivo de cana-de-açúcar e oleaginosas). Entretanto, associado a esse crescimento há o aumento do consumo de fertilizantes, sendo assim, é necessário o estudo de rotas alternativas para obtenção dos mesmos, dentre eles o potássio.

Uma das rotas alternativas que vem sendo explorada e é objeto deste estudo é a biossolubilização de potássio presente em resíduos de rochas ornamentais.

2. OBJETIVO

Realizar uma bioprospecção a partir do isolamento de microrganismos presentes na rizosfera de algodão, e por meio de ensaios *in vitro*, verificar o potencial de biossolubilização de potássio oriundo de um resíduo proveniente do corte de rochas ornamentais.

3. METODOLOGIA

3.1. Germinação *in vitro*

Primeiramente as sementes foram submetidas a um tratamento ácido (H_2SO_4 PA) por um período de 2 horas, lavadas em água corrente e por fim foram submetidas a uma embebição por 26 horas. Ao final, as sementes foram colocadas em placas de Petri com papel de filtro na parte superior (tampa) e na base, e incubadas na estufa a 33°C. Reajustes de umidade foram realizados até atingir a etapa de germinação.

3.2. Cultivo do Algodão

O solo utilizado (proveniente da região nordeste) foi adotado por apresentar baixo teor de K ($0,02 \text{ Cmol/dm}^3$), enquanto, o resíduo, proveniente do corte de rochas ornamentais, foi obtido da região norte do Espírito Santo apresentando 3,4% de K_2O em sua composição. As sementes de algodão foram cedidas pela Embrapa Algodão, sendo submetidas a uma germinação *in vitro*, conforme descrito anteriormente, antes de sua semeadura.

Foram montados 18 sistemas sob 6 diferentes condições de cultivo, em triplicata (Tabela 1). Cada sistema continha 300 g de solo, onde se semeou 3 sementes germinadas por vaso, em uma profundidade de aproximadamente 2 cm.

Nos sistemas onde houve ajuste de N:P:K, adotou-se a relação de 10:100:120 quando se usou o cloreto de potássio e o dobro da quantidade de potássio quando se usou o resíduo. Os vasos foram dispostos à temperatura ambiente por 35 dias, com o ajuste de umidade feito regularmente.

Tabela 1. Sistemas de tratamento e as condições de cultivo.

Tratamento	Condição de Cultivo
1	Solo Puro
2	Solo com adição de cloreto de potássio (KCl)
3	Solo com adição de resíduo
4	Solo com a adição de cloreto de potássio (KCl), fosfato monobásico de sódio (NaH_2PO_4) e nitrato de amônio (NH_4NO_3)
5	Solo com a adição de resíduo, fosfato monobásico de sódio (NaH_2PO_4) e nitrato de amônio (NH_4NO_3)
6	Solo com a adição de fosfato monobásico de sódio (NaH_2PO_4) e nitrato de amônio (NH_4NO_3)

3.3. Isolamento

Ao fim dos 35 dias de cultivo adicionou-se apenas as raízes em erlenmeyer de 500 mL contendo 100 ml de solução salina (0,9% p/p) e 2,0 g de pérolas de vidro. Os frascos foram postos sob agitação (150 rpm a 30° C) durante 3 horas e meia. Posteriormente, transferiu-se 5,0 ml da suspensão para frascos de 250 mL contendo 100 ml de meio Bushnell Haas modificado (0,2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,88 g/L NaH_2PO_4 , 1,0 g/L $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$, 0,39g/L NH_4NO_3 , 2,0 g/L glicose) e 37,0 g/L de resíduo que ficaram sob as mesmas condições de temperatura e agitação por uma semana. Após esta semana, houve uma segunda transferência para meio fresco, ficando por mais 5 dias sob as mesmas condições de agitação. Por fim, foi realizado o plaqueamento pela técnica *spread plate* utilizando o mesmo meio de cultivo, contendo 20 g/L de agar. As placas foram incubadas por 48 horas a 30°C. A partir do plaqueamento, isolaram-se os microrganismos com diferentes morfotipos, que cresceram predominantemente.

3.4. Ensaio de biossolubilidade

Os ensaios foram realizados com 10 isoladas obtidas na etapa anterior e mais uma estirpe isolada a partir do próprio resíduo (R1.4). Foram utilizados frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do mesmo meio (Bushnell Haas modificado) e 3,7 g do resíduo. Foi adicionado um inoculo de 10%(v/v) de cada estirpe testada, após crescimento em mesmo meio de cultivo por 24 h. Os frascos foram colocados sob agitação em shaker (150 rpm), à 30 °C por 27 dias. Os experimentos foram realizados em duplicata, além de um ensaio controle, sem adição do inoculo. Amostras foram retiradas no tempo inicial (T 0h) e no tempo final (T 27 dias) para avaliação da concentração de potássio por espectrometria de absorção atômica e consumo de glicose pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A germinação *in vitro* foi bem sucedida, visto que praticamente todas as sementes submetidas ao tratamento germinaram conforme o esperado (Figura 2).



Figura 1. A. Sementes antes do tratamento ácido. B. Sementes após tratamento ácido e embebição. C. Sementes incubadas na estufa. D. Sementes germinadas antes do semeio.

Do cultivo do algodão, as plantas dos 6 tratamentos, após os 35 dias de cultivo, não apresentaram diferenças entre si. No entanto, as do tratamento 4 apresentaram um retardo no seu desenvolvimento, sendo que as raízes das mesmas não mostraram diferenças significativas com relação ao comprimento e volume das demais.

O isolamento resultou em um total de 50 estirpes, com diferentes morfotipos, algumas apresentando características mucóides, distribuídas uniformemente entre os diferentes sistemas montados. Como é possível observar na Tabela 2, não houve diferença entre o número de morfotipos isolados e as condições de tratamento.

Tabela 2. Relação do número de morfotipos isolados em cada tratamento.

Tratamento	Número de morfotipos isolados
1	9
2	9
3	8
4	8
5	7
6	9

A partir do ensaio preliminar de biossolubilização realizado neste trabalho, os resultados da análise da concentração de glicose residual indicaram que todas as estirpes testadas consumiram praticamente 100% do substrato no período avaliado (27 dias). Sendo assim, tais resultados indicam que a concentração da glicose a ser utilizada em testes futuros deve ser aumentada, verificando no entanto seu efeito inibitório.

Os resultados das análises da concentração de K em solução estão presentes no gráfico da Figura 3. É possível verificar que houve um resultado positivo de solubilização de K presente no resíduo pelas isoladas 5.7, R1.4 e 1.9, indicando um potencial de biossolubilização por parte das mesmas, em relação ao controle não inoculado (CONT). Valores semelhantes foram obtidos por Dalcin (2008) utilizando também resíduos provenientes do corte de rochas, como o granito.

É importante destacar que a maiorias das isoladas usadas nesse experimento apresentavam um aspecto mucóide, sendo então, possíveis produtoras de EPS (substância polimérica extracelular) que como já foi relatado na literatura (Girgis et al, 2008; Liu et al 2006), possui a capacidade de adsorver íons, dentre eles o K^+ . Sendo assim, é possível que parte do potássio liberado tenha sido adsorvido pelo EPS, não estando portanto disponível na matriz líquida, o que justificaria as baixas concentrações de potássio obtidas. É necessário portanto, desenvolver uma nova metodologia para quantificação do K^+ possivelmente adsorvido pelo EPS. Vale também ressaltar que no resíduo proveniente do corte das rochas estão presentes outros componentes como a granalha, que pelos resultados obtidos, não provocou inibição no crescimento dos microrganismos. No entanto, como houve consumo praticamente total da glicose por todas as estirpes testadas no tempo analisado, o crescimento das mesmas ficou limitado, subestimando o potencial de solubilização de potássio a partir do resíduo, assim como a produção do exopolímero.

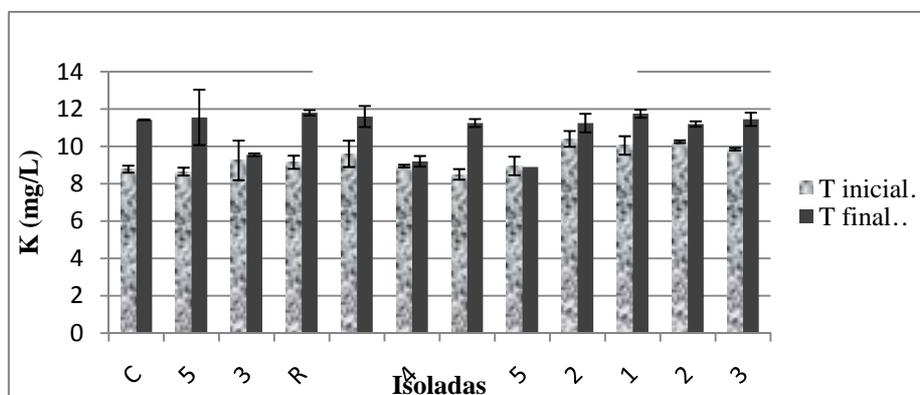


Figura 3. Gráfico da concentração de potássio em solução.

Os resultados obtidos mostram o potencial de algumas estirpes para solubilização de potássio *in vitro*, porém, há mais parâmetros a serem investigados a fim de se ter um maior detalhamento da ação das mesmas no processo, visando uma maior biossolubilização.

5. CONCLUSÃO

É possível concluir a partir dos resultados deste trabalho, que as estirpes isoladas aparentam ter potencial de solubilização de potássio em meio Bushnell Haas modificado, a partir do resíduo proveniente do corte de rochas ornamentais, porém, a quantidade de glicose utilizada não foi suficiente para o período analisado. Será necessário, portanto, em uma próxima etapa, a otimização de alguns parâmetros importantes ao processo, através da utilização do planejamento fatorial visando a redução do número de experimentos.

6. AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ pela concessão da bolsa, ao CETEM/MCT pela infra-estrutura, à EMBRAPA Algodão pelo fornecimento das sementes e a pesquisadora Regina Carrisso pelo suporte técnico na Coordenação do Projeto no qual este trabalho está inserido.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DALCIN, G. **Seleção de Microrganismos Promotores da Disponibilidade de Nutrientes Contidos em Rochas, Produtos e Rejeitos de Mineração**. 2008. 101p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina (Brasil).

GIRGIS, M.G.Z.; KHALIL, H.M.A.; SHARAF, M.S. In vitro evaluation of rock phosphate and potassium solubilizing potential of some *Bacillus* strains. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**. v.2, p.68-81, 2008.

LIU, W. et al. Decomposition of silicate minerals by *Bacillus mucilaginosus* in liquid culture. **Environmental Geochemistry and Health**, v.28, p.133/140, 2006.