



SOLUBILIZAÇÃO DE P DE GOETHITA SINTETIZADA E HIDROXIAPATITA POR *Bacillus* sp.

Dione Aguiar¹; Marlon Henrique Hahn²; Glaciela Kaschuk³; Vander de Freitas Melo³

RESUMO: Uma alternativa sustentável para reduzir a dependência da agricultura em fertilizantes minerais e atender à crescente demanda por alimentos é a bioprospecção de micro-organismos solubilizadores. Este trabalho objetivou investigar a eficiência de *Bacillus* sp. na solubilização de P a partir de fontes minerais insolúveis. Para isto a goethita foi sintetizada através de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 M e KOH 3,5 M. O ferro amorfo foi extraído através de oxalato de amônio 0,2 M e a goethita foi então saturada com KH_2PO_4 . Foram utilizados *Bacillus subtilis* (Isolado 4) e *Bacillus* sp. (Isolado 9) para o experimento. Estes foram inoculados em meio sólido contendo goethita ou hidroxiapatita ou KH_2PO_4 como fonte de fósforo, e após 5 dias foram avaliados quanto à formação de halo. Posteriormente, foram preparados meios de cultura líquido onde as cepas foram inoculadas nos tratamentos com três doses de hidroxiapatita (11, 77 e 132 mg), 2,77 g de KH_2PO_4 e grupo controle (sem fonte de fósforo). Após 14 dias, os extratos foram analisados quanto à concentração de P-lábil. Os resultados mostraram que a formação de halo foi baixa (Índice de Solubilização <2) e que não houve formação de halo para o meio com goethita. Houve uma correlação negativa entre concentração de P e pH para todos os tratamentos. Os níveis de P-lábil aumentaram ao longo do tempo nos tratamentos dos Isolado 4 e Isolado 9, mostrando que estas bactérias são capazes de solubilizar fontes insolúveis de P.

PALAVRAS-CHAVE: Dessorção, fósforo, micro-organismos

INTRODUÇÃO

Dentre os óxidos de Fe, a goethita (gt) é o mais abundante na fração argila dos solos brasileiros. Sua estabilidade termodinâmica, em condições aeróbias, e a presença de grupos hidroxílicos a tornam um sorbente efetivo para um grande número de íons, como por exemplo o Fósforo (P) (Gérard, 2016). Em relação a este nutriente, em virtude de sua característica eletronegativa e da formação de ligações mono ou bidentadas entre Ferro (Fe) e Fósforo, quando quimissorvido, o P dificilmente retornará para a solução do solo, uma vez que a energia necessária para desfazer esta ligação deve ser alta o suficiente para superar as forças de atração entre as moléculas (Jones et al., 2015). Essa interação com os óxidos e hidróxidos no solo reduz sua disponibilidade e com isso surge a necessidade da aplicação de quantidades crescentes de adubo fosfatado para sustentar a produção agrícola.

¹Doutoranda, Solos-UFPR, Curitiba, dioneaguiarr@gmail.com

²Doutorando, Produção Vegetal-UFPR, Curitiba.

³Docente, UFPR, Curitiba.

Considerando-se que se trata de um recurso não renovável e que as reservas de alta qualidade estão se tornando escassas, encarecendo o seu custo, e que há uma crescente demanda para a produção de alimentos, torna-se imprescindível a compreensão dos mecanismos de dessorção do P aos óxidos de Fe, não apenas para aumentar o tempo de vida das jazidas, mas também como uma alternativa sustentável para o gerenciamento da deficiência deste nutriente nos solos agrícola (Alori et al, 2017). É conhecida a capacidade dos micro-organismos em disponibilizar o P para as plantas, contudo os principais mecanismos bioquímicos e fisiológicos utilizados para promover a dessorção do P quimissorvido ainda não foram elucidados (Singh et al., 2018). Este trabalho objetivou investigar a eficiência de *Bacillus* sp. na solubilização de P a partir de fontes minerais insolúveis.

MATERIAL E MÉTODOS

A goethita foi sintetizada conforme metodologia proposta por Schwertmann e Murad, (1983). A verificação da pureza do material sintetizado foi realizada por Difração por Raio X (DRX), utilizando-se difratômetro com goniômetro vertical Philips modelo PW 3020 com monocromador de grafite e feixes de $\text{CuK}\alpha$ a 50 kV e 20 mA, na velocidade de $1^\circ 2\Theta \text{ min}^{-1}$. A amplitude de varredura utilizada foi de 10 a $60^\circ 2\Theta$. A Área Superficial Específica (ASE) foi realizada por meio do equipamento Gemini III 2375 (Micromeritics). O ferro referente aos óxidos de ferro de baixa cristalinidade (FeO) foi extraído com oxalato de amônio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e o excesso do sal foi removido com a utilização de uma membrana de diálise. As amostras foram saturadas com uma solução de 40.000 ppm de KH_2PO_4 e agitadas constantemente por 140h a $28 \pm 1^\circ\text{C}$. O P-lábil foi removido até que sua concentração ficasse abaixo do requerido pelos micro-organismos ($<11 \text{ mg}$) através da Resina de Troca Aniônica (AR 103 QDP 434 Ionics) e Mehlich-1.

Para caracterização da goethita saturada com P foram realizadas análises de DRX sob as mesmas condições citadas anteriormente, Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada à Espectroscopia por Dispersão de Energia (MEV-EDS), modelo Tescan Vega 3. A Espectroscopia de Infravermelho (IFV) foi realizada no espectrômetro VERTEX 70 e o espectro foi obtido por refletância difusa de 4000 a 400 cm^{-1} (região do infravermelho médio), com resolução de 4 cm^{-1} , os dados espectrais foram registrados em modo de refletância (R).

Os teores de P –total foram realizados por digestão com temperatura e pressão controlados segundo o método 3051A (EPA, 2017). O P-lábil foi analisado pela metodologia de extração com a solução Mehlich-1. As concentração foram lidas por Espectrometria de



Emissão Atômica por Plasma Indutivamente Acoplado (ICP- OES).

No primeiro experimento microbiológico a solubilização de P pelas linhagens *Bacillus subtilis* isolado 4 e *Bacillus sp.* isolado 9, foi avaliada medindo o halo formado durante o crescimento em meio sólido em pH 7,0, contendo por litro: glicose (10 g); ágar (15 g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,5 g), NaCl (0,2 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g), KCl (0,2 g), extrato de levedura (1 g), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,002 g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,002 g), como fonte de fósforo: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (5 g, equivalente a 2,77 g de KH_2PO_4) ou hidroxiapatita (11 g, equivalente a 2,77 g de KH_2PO_4) ou goethita saturada com P (11,88 g, equivalente a 2,77 g de KH_2PO_4). No segundo experimento, as mesmas bactérias foram crescidas em um tubo contendo 30 mL de meio líquido contendo por litro: glicose (10 g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,5 g), NaCl (0,2 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g), KCl (0,2 g), extrato de levedura (1 g), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,002 g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,002 g), sob os seguintes tratamentos: Controle (sem P); com 2,77g/L KH_2PO_4 (T1), com 11 mg/L de hidroxiapatita (T2); com 77 mg/L de hidroxiapatita (T3) e com 132 mg/L de hidroxiapatita (T4). Após o crescimento bacteriano por 14 dias, sob agitação 240 rpm a 30°C os extratos microbianos foram digeridos e o P desorvido da hidroxiapatita foi analisado pelo método 3015 A (EPA, 2017) e Mehlich-1. As concentrações foram lidas por ICP- OES.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para análise do difratograma foi utilizado o padrão do ICCD (International Centre for Diffraction Data) para Goethita nº 29-0713, onde $a=4.608\text{Å}$, $b=9.956\text{Å}$, $c=3.02\text{Å}$. Os principais picos encontrados nas posições 2θ foram 17.7245°, 21.2614°, 26.2755°, 33.1877°, 34.6516, 36.0454°, 36.5922, 39.9225°, 41.1423°, 53.1460°, 58.9701°, e estão de acordo com o documento ICCD para Goethita. A área superficial específica (ASE) da gt sintetizada sem extração do Fe amorfo foi de 36,87 m²/g, e com a extração do Fe com oxalato a ASE foi para 38,16m²/g. Com o processo de adsorção com KH_2PO_4 e remoção das formas lábeis de P foi possível verificar que a ASE apresentou uma diminuição para 33,1 m²/g.

As micrografias eletrônicas de varredura evidenciaram que o método empregado neste trabalho foi capaz de formar cristais com morfologia característica ao de goethitas com elevado grau de cristalinidade (formato alongado em direção ao eixo a e acicular) e uniformes. Após o processo de saturação e remoção das formas lábeis de P da estrutura do mineral, a mesma foi submetida à análise de Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada à Espectroscopia por Energia Dispersiva (MEV-EDS) a fim de verificar a presença e porcentagem do P por massa do mineral amostrado. A microanálise confirmou a presença

¹Doutoranda, Solos-UFPR, Curitiba, dioneaguairr@gmail.com

²Doutorando, Produção Vegetal-UFPR, Curitiba.

³Docente, UFPR, Curitiba.

de P compondo em média 0,35% da massa total das áreas amostradas.

O espectro de Infravermelho (IFV) foi medido de uma faixa de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} . As bandas formadas em 3214 , 1297 , 922 , 823 , 689 e 563 cm^{-1} são consideradas características da goethita. A adsorção do P à estrutura do mineral promoveu mudanças em todos as bandas dos grupos característicos da goethita em decorrência das ligações monodentadas e bidentadas do P a partir de 1000 cm^{-1} . As medições dos halos no meio sólido contendo $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e hidroxiapatita indicaram que o índice de solubilização P das bactérias Isolado 4 e Isolado 9 foi baixo (Índice de Solubilização <2), não houve formação de halo em meio sólido com goethita. O P-lábil no meio líquido aumentou com a redução do pH, indicando que este pode ser um provável mecanismo de dessorção. Os menores valores de pH foram medidos nos tratamentos contendo HPA12 com Isolado 4 e HPA 7 com Isolado 9.

CONCLUSÕES

A metodologia foi adequada para síntese adequada de óxidos para utilização em experimentos de adsorção/dessorção de P.

Os níveis de P-lábil aumentaram ao longo do tempo em todos os tratamentos para os Isolado 4 e Isolado 9, mostrando que estas bactérias são capazes de solubilizar fontes insolúveis de P.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação Araucária e Capes pela bolsa e à Total Biotecnologia pelo fornecimento dos micro-organismos e apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Alori ET, Glick BR, Babalola OO. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Front Microbiol.* 2017;8:1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>
- EPA. Method 3015A (SW-846): Microwave Assisted Acid Digestion of Aqueous Samples and Extracts. Washington, DC, 2017 < <https://www.epa.gov/homeland-security-research/epa-method-3015a-microwave-assisted-acid-digestion-aqueous-samples-and>>
- Gérard F. Clay minerals, iron/aluminum oxides, and their contribution to phosphate sorption in soils - A myth revisited. *Geoderma.* Elsevier B.V.; 2016;262:213–226. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2015.08.036>
- Jones C, Nomosatryo S, Crowe SA, Bjerrum CJ, Canfield DE. Iron oxides, divalent cations, silica, and the early earth phosphorus crisis. *Geology.* 2015;43:135–138. <https://doi.org/10.1130/G36044.1>
- Schwertmann U, Carlson L, Murad E. Properties of iron oxides in two finnish lakes in relation to the environment of their formation. *Clays Clay Miner.* 1987;35:297–304.
- Singh J, Sharma D, Kumar G, Sharma NR. *Microbial Bioprospecting for Sustainable Development.* Springer Berlin Heidelberg; 2018. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-0053-0>