

# Determinação da redução do pH e do teor de sulfato resultante da oxidação de enxofre por bactérias em meio de cultura<sup>1</sup>

Cristiano Ramon Dias Melo<sup>2</sup>, Francisco Adriano de Souza<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Trabalho financiado pelo CNPq/Fapemig

<sup>2</sup> Estudante do Curso Técnico em Química da Escola Técnica Municipal de Sete Lagoas, Bolsista PIBIC (ou BIC JR) do Convênio Fapemig/CNPq/Embrapa/ FAPED

<sup>3</sup> Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

## INTRODUÇÃO

A acidificação de rochas fosfáticas é uma das principais vias de produção de fertilizantes fosfatados solúveis. Na indústria de fertilizantes o enxofre elementar e utilizado para produção de ácido sulfúrico o qual é utilizado no ataque ácido de fosfatos de rocha. Esse processo resulta na produção de ácido fosfórico utilizado na produção fertilizante solúvel e tem como subproduto a geração de gesso agrícola ( $\text{CaSO}_4$ ).

Alguns tipos de bactérias quimiolitotróficas são capazes de gerar ácido sulfúrico a partir da oxidação de formas inorgânicas de enxofre como sulfetos, ácido sulfídrico, tiosulfato e enxofre elementar. A eficiência desse processo biológico depende do organismo envolvido e das condições de crescimento. Neste sentido a avaliação da eficiência do processo de oxidação biológica de S é feita através da determinação no teor de sulfatos produzido a partir da oxidação de formas reduzidas de S sob condições controladas.

O enxofre em amostras de solo pode ser encontrado na forma inorgânica e orgânica, sendo, este último, predominante em 90% dos solos, mas a falta desse elemento principalmente em solos degradados torna-se uma preocupação. As plantas absorvem o enxofre na forma de sulfato.

O sulfato apresenta fórmula molecular  $\text{SO}_4^{2-}$  e massa molar 96,06 g/mol e é um íon formado pelo elemento enxofre (S) da família 6A (calcogênio), com 4 oxigênios também da família 6A, através de ligações covalentes. O ânion  $\text{SO}_4^{2-}$  forma substâncias químicas iônicas que têm boa solubilidade em meio aquoso, exceto os produtos químicos:  $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{SrSO}_4$  e  $\text{BaSO}_4$ , em razão da forte ligação que acontece entre os vários cátions e ânions do composto ambos de valência +2 e -2 respectivamente.

Os métodos mais utilizados para a determinação de sulfato em amostras de água é a gravimetria e a turbidimetria, através de leitura em espectrofotômetro. A metodologia empregada neste estudo é uma adaptação do método de Vitti (1989).

Este trabalho teve como principal objetivo a padronização e adaptação dos métodos de Vitti (1989) para análise do sulfato obtido de meios de cultura. É parte deste trabalho também, como forma de avaliação dos resultados, o acompanhamento das alterações sofridas no pH e produção de sulfatos das amostras referentes aos solos e bactérias utilizadas.

## MATERIAL E MÉTODOS

O método de Vitti (1989) foi desenvolvido para a análise de sulfato em amostras de solo para fins de avaliação da fertilidade do solo. E é baseada espectrometria (turbidimetria). As amostras deste estudo são provenientes de meio de cultura e não requerem as etapas de uso de extratores. Neste sentido, as amostras foram centrifugadas

14.000 RCF (Relative Centrifugal Force) por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e congelado até o momento da análise.

### **PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS**

Para montagem do experimento foram coletadas amostras de solos no Estado do Rio de Janeiro, no município de Itaguaí, das profundidades de 0-20; 20-40; 40-60 e 60-80 cm. Após período de incubação de 14 dias e constatação da redução do pH para a faixa de 2-3, alíquotas foram retiradas, uma por repetição. E utilizadas para estabelecer diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  em tubos com solução salina.

Após a diluição seriada, alíquotas de 100  $\mu$ l da amostra diluída nas concentrações de  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  foram plaqueadas em quatro meios de cultura distintos: (1) BS4, (2) BS7, (3) TA e (4) AA (BABANA et al., 2011) com o auxílio de alça de Drigalsky. Anteriormente foi verificado que na concentração a  $10^{-7}$  não houve crescimento. Foram utilizadas três repetições por tratamento. Após o espalhamento, as placas foram incubadas na temperatura de 30 °C. Posteriormente, bactérias que apresentaram boa capacidade de acidificação do meio foram selecionadas para a fase seguinte. Nesta fase, foi avaliada a produção de sulfatos em meio de cultura a partir de duas fontes de enxofre (1g de enxofre elementar (S) ou 1g de tiosulfato (T)) e na presença ou não de solução de micronutrientes (Meio MS – MURASHIGE; SKOOG, 1962). Utilizaram-se frascos contendo 90 ml de meio BS4 (BABANA et al., 2011); as condições de crescimento foram descritas acima. Após vinte dias de crescimento, alíquotas foram retiradas para determinação do pH e do teor de sulfato.

Após a fase de incubação retirou-se 1,8 ml de cada repetição, em triplicada, os tubos contendo as amostras foram centrifugados a 14.000 RCF por 5 minutos. O sobrenadante foi pipetado para um novo microtubo de 2 ml e levado ao freezer para congelamento até o momento da análise.

### **PREPARO DA CURVA PADRÃO**

- Em erlenmeyers de 125 ml foram adicionadas alíquotas de 25 ml da solução-padrão de sulfato;
- Em seguida, adicionou-se 50 g de carvão ativado e a amostra foi homogeneizada por 6 minutos;
- Filtrada para erlenmeyer limpos com a ajuda do funil e papel filtro, para obtenção uma solução límpida;
- Posteriormente, pipetou-se 10 ml da solução (extrato) e transferiu-se para erlenmeyer de 125 ml;
- Adicionou-se a cada erlenmeyer 1 ml da solução de ácido clorídrico 6,0 M;
- Em seguida, adicionou-se 0,5 g de Cloreto de Bário di-hidratado ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ );
- Após 1 minuto de descanso, as amostras foram agitadas por 30 segundos.
- Posteriormente 2,5 ml de cada amostra foram transferidas para cubetas e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 420 nm em no máximo 8 minutos.
- Em seguida, utilizou-se a curva padrão para relacionar as concentrações de (micrograma ( $\mu\text{g}$ ) de  $\text{S-SO}_4^{2-}/\text{ml}$ ) com a absorbância obtida na leitura do espectrofotômetro.

### **LEITURA EM ESPECFOTOMETRO DAS AMOSTRAS**

- Inicialmente, as amostras foram descongeladas em banho de gelo;

- Em seguida 1 mL das amostras foi transferida para erlenmeyer de 125 ml contendo 9 ml de água deionizada tipo 1;
- Posteriormente foi adicionado 1 ml de solução de HCL 6,0 M;
- E adicionado 0,5 g de BaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O;
- Após 1 minuto de incubação, as amostras foram agitadas por 30 segundos;
- Em seguida, foram retiradas alíquotas de 2,5 ml das soluções e transferidas para cubetas de 1 cm de largura;
- A leitura em espectrofômetro a 420 nm foi realizada em até 8 minutos após a adição do cloreto de bário.
- Os valores de absorvância foram convertidos em concentração pelo uso da curva padrão.

## RESULTADOS E DISCUSÃO

Dentre os ajustes metodológicos realizados para adaptação da metodologia de Vitti foram realizadas duas modificações. A primeira visou substituir a etapa de filtragem da amostra por uma etapa de centrifugação (14.000 rcf a 5 min) para retirada de partículas sólidas. Posteriormente, a segunda modificação foi o congelamento da amostra para seu processamento posterior. O sobrenadante obtido foi mantido congelado até análise da amostra. No momento da análise, a amostra foi descongelada em banho de gelo e diluída para realização da leitura em espectrofômetro, sendo necessário no mínimo 10 ml de solução para o processo.

Um ponto ainda a ser avaliado, trata-se do efeito do congelamento da amostra até o momento da análise. Outro ponto observado, que se necessita de avaliação posterior é o efeito da incubadora, pois foi verificada que na mudança do experimento de uma para outra, ocorreu mudança do pH. Desta forma é necessário que o experimento seja realizado num mesmo equipamento.

Para os procedimentos de leitura em espectrofômetro, alguns pontos devem ser destacados:

- A adição do carvão ativado para filtração pode ser feita com 50 mg, diretamente na vidraria de erlenmeyer.
- Do momento em que se adiciona o Cloreto de Bário até o momento da leitura no espectrofômetro, gasta-se em torno de 5 a 6 minutos.
- Para uma curva mais exata, o equipamento deve ser zerado com água deionizada, e depois deve ser feita a leitura das amostras lavando-se a cubeta com a água deionizada, visto que o equipamento possui apenas 8 cubetas e a curva padrão proposta possui 8 pontos. Alguns valores discrepantes podem ocorrer por causa da contaminação da amostra já que nem todo processo é realizado em fluxo, pode ocorrer no momento de pipetagem, com problemas no aparelho, problemas com as cubetas, então é de extrema importância a verificação do material a ser utilizado e se possível a utilização dos mesmos equipamentos, para uma padronização.

Os dados experimentais obtidos indicaram o efeito da profundidade, sendo que as amostras obtidas da profundidade de 60-80 apresentaram os menores valores de pH e os maiores valores de sulfato. Possivelmente, as comunidades microbianas obtidas dessa profundidade são mais eficientes nesse processo. Assim, coletas podem ser direcionadas para essa faixa de profundidade. Esse resultado está de acordo com o levantamento de solos da Embrapa Solos que indicou que as profundidades das amostras de TFSA (Terra Finas Seca ao Ar) apresentou menor faixa de pH.

Com relação à adição de fontes de enxofre e micronutrientes, verificou-se que, em termos absolutos, o enxofre elementar apresentou maiores valores de concentração de sulfato e menores valores de pH na ausência de micronutrientes (Tabela 1), porém os dados não estão apresentando uma tendência clara (Tabela 1), sugerindo assim a condução de um novo experimento utilizando um número maior de repetições.

Com relação a evolução do pH ao longo do tempo, verificou-se que amostras suplementadas com enxofre elementar apresentam uma redução mais rápida do pH do que aquelas suplementadas com tiosulfato. Com relação à profundidade, os dados de pH, seguem a mesma tendência dos descritos anteriormente para a leitura de sulfato, ou seja, sugerindo que o processo biológico de oxidação do enxofre a sulfato e formação de ácido sulfúrico esteja ocorrendo com maior eficiência nas amostras de solos coletadas das camadas mais profundas do perfil do solo tiomórfico, em relação as camadas mais superficiais.

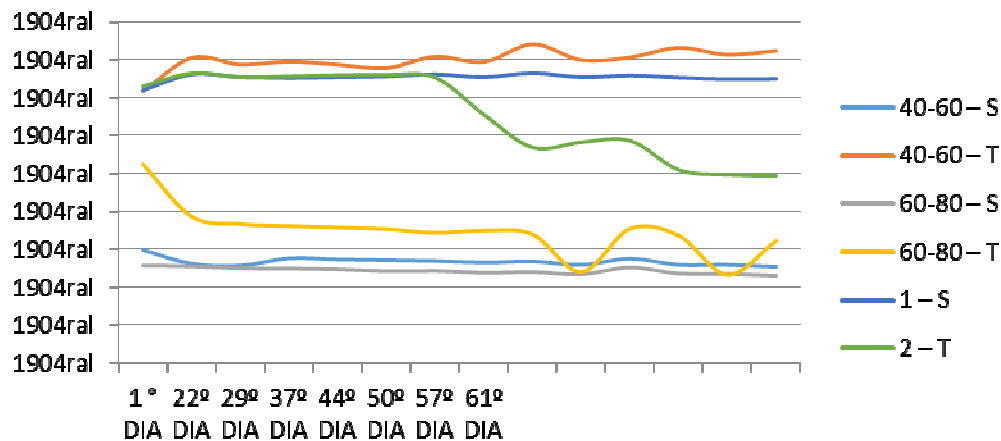
**Tabela 1. Teor de Sulfato e pH após oxidação de Tiosulfato (T) ou Enxofre elementar (S) por comunidades bacterianas obtidas de diferentes profundidades de um solo Tiomórfico coletado no município de Itaguaí- RJ**

PROFUNDIDADE (cm)	ADIÇÃO de MICRONUTRIENTES (com, + ou sem, -)	FONTE DE ENXOFRE	[SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ]** µg /ml	pH**
CONTROLE*			138,88	3,87
40-60	+	S	231,48	3,07
40-60	-	T	266,84	3,32
40-60	-	S	151,41	3,11
40-60	+	T	130,47	3,31
60-80	+	S	775,76	2,99
60-80	-	S	2053,54	2,99
60-80	+	T	1674,24	2,23
60-80	-	T	1320,48	2,32

\*Média dos controles obtidos pelos tratamentos sem adição de microrganismos

\*\* Valores médios de três repetições.

**Figura 1. Evolução do pH ao longo do tempo em meio BS suplementado com Tiosulfato (T) ou Enxofre Elementar (S) em resposta a comunidade microbiana obtida de diferentes profundidades de um solo Tiomórfico coletado no município de Itaguaí- RJ**



\* No 37º dia houve a contaminação do controle de tiosulfato

Com relação a evolução do pH ao longo do tempo, verificou-se que amostras suplementadas com enxofre elementar apresentam uma redução mais rápida do pH do que aquelas suplementadas com tiosulfato. Com relação a profundidade dos dados de pH, seguem a mesma tendência dos descritos anteriormente para a leitura de sulfato, ou seja, sugerindo que o processo biológico de oxidação do enxofre a sulfato e formação de ácido sulfúrico esteja ocorrendo com maior eficiência nas amostras de solos coletadas das camadas mais profundas do perfil do solo tiomórfico, em relação as camadas mais superficiais.



Figura 2- Alteração do pH do meio, em função da inoculação de bactérias isoladas de solo tiomórfico. Tubos da esquerda com solução amarela indicando mudança de cor do indicador verde de bromocresol. A direita tubos controle – solução coloração azulada.

## CONCLUSÃO

- 1- O método de Vitti (1989) adaptado demonstrou-se adequado para a análise de amostras coletadas de meio de cultura BS inoculadas com comunidades bacterianas, para as ambas as fontes de S, enxofre elementar e tiosulfato.
- 2- Os valores de pH parecem estar inversamente relacionados com os valores de concentração de sulfato, ou seja, quanto menores os valores de pH, maiores os valores das leituras de sulfato.
- 3- O processo de conversão de fontes reduzidas de enxofre em sulfato foi mais eficiente quando os microrganismos foram isolados de camadas mais profundas, até a camada de 60-80.

## REFERÊNCIAS

BABANA, A. H.; SAMAKÉ, F.; MAÏGA, K. Characterization of some agricultural soils: presence and activity of tilemsi rock phosphate-solubilizing thiobacilli. **British Microbiology Research Journal**, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2011.

MELO, C. R. D. **Caderno de atividades desenvolvidas no laboratório de ecologia microbiana - NBA**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2016.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 15, p. 473-479, 1962.

SILVA, A. L. S. da. **Sulfatos**. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/compostos-químicos/sulfatos/>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

SILVA, F. C. da; EIRA, P. A. da; BARRETO, W. de O.; PÉREZ, D. V.; SILVA, C. A. **Análises químicas para a avaliação da fertilidade do solo, métodos usados na Embrapa Solos**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1998. Disponível em: <[http://hotsites.cnps.embrapa.br/blogs/paqlf/wp-content/uploads/2008/08/analises\\_quimicas\\_fertilidade.pdf](http://hotsites.cnps.embrapa.br/blogs/paqlf/wp-content/uploads/2008/08/analises_quimicas_fertilidade.pdf)>. Acesso em: 2 out. 2015.

SULFATO. In: WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre. Flórida: Wikimedia Foundation, 2015. Disponível em: <<https://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Sulfato&oldid=43395301>>. Acesso em: 16 fevereiro. 2016.

VITTI, G. C. **Avaliação e interpretação do enxofre no solo e na planta**. Jaboticabal : UNESP: FUNEP, 1989. 37 p.