

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS POR *Aspergillus niger*, *Penicillium islandicum* E ÁCIDOS ÔRGANICOS**

Josiane Leal Duarte  
*Magister Scientiae*

VIÇOSA  
MINAS GERAIS- BRASIL  
2016

JOSIANE LEAL DUARTE

**SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS POR *Aspergillus niger*, *Penicillium islandicum* E ÁCIDOS ÔRGANICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS- BRASIL  
2016

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

D812s  
2016 Duarte, Josiane Leal, 1990-  
Solubilização de fosfatos por *Aspergillus niger*, *Penicillium islandicum* e ácidos orgânicos / Josiane Leal Duarte. - Viçosa, MG, 2016.

ix, 43f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maurício Dutra Costa.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Fosfato - Solubilização. 2. Fosfato no solo. 3. Micro-organismos do solo. 4. *Aspergillus niger*. 5. *Penicillium islandicum*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22 ed. 631.85

JOSIANE LEAL DUARTE

**SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS POR *Aspergillus niger*, *Penicillium islandicum* E ÁCIDOS ÔRGANICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 21 de julho de 2016

---

André Narvaes da Rocha Campos

---

Matheus Loureiro Santos

---

Maurício Dutra Costa  
(Orientador)

Aos meus pais.  
Às minhas irmãs.  
A minha família.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser meu guia, minha inspiração, minha companhia, e ser presente em minha vida, principalmente nos momentos mais difíceis.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de ingressar no curso.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao professor Maurício Dutra Costa, pela orientação, pelo apoio, pelo incentivo e pela confiança.

Aos professores, José Ivo Ribeiro e Leonardus Vergutz, pela co-orientação e por acreditarem neste projeto.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia, pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, pela grande ajuda.

Ao Hiunes, Christiano e Rafael, pela enorme contribuição para o êxito desta pesquisa.

Aos estagiários Lucas e Ramon, pela ajuda e pela convivência durante todo o desenvolvimento deste trabalho, pela dedicação e, principalmente pela execução do peneiramento do solo.

A todos os colegas do Laboratório de Ecologia Microbiana, pela amizade e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos colegas de outros laboratórios do Departamento de Microbiologia, principalmente os do Laboratório de Associações Biológicas Micorrízicas, pelo convívio, pelo apoio e pelo auxílio na utilização de equipamentos e execução de procedimentos.

Aos meus pais. Maurício e Ângela, pelo amor incondicional, pelo carinho, pela compreensão e por serem minha força nos momentos mais difíceis.

Às minhas irmãs, pelo companheirismo.

A todos que contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

O apoio financeiro para este estudo foi também fornecido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, FAPEMIG.

## **BIOGRAFIA**

Josiane Leal Duarte, filha de Maurício Lopes Duarte e de Ângela Maria das Dores Leal Duarte, nasceu no dia 10 de agosto de 1990 na cidade de Viçosa, Minas Gerais. Iniciou a graduação em Agronomia na Universidade Federal de Viçosa em março de 2009, graduando-se em março de 2014. Nesse mesmo mês e ano, iniciou o curso de mestrado em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

## CONTEÚDO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	9
Solubilização de fosfatos por <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium islandicum</i> e ácidos orgânicos	14
RESUMO.....	14
4. INTRODUÇÃO .....	15
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	18
5.1. Solubilização de P a partir de diferentes FN por <i>Aspergillus niger</i> FS1 e <i>Penicillium islandicum</i> .....	18
5.2. Solubilização de fosfato de rocha de Araxá e Catalão por meio da combinação de diferentes ácidos orgânicos .....	20
5.3. Solubilização de P a partir de fração do solo < 75 µm por meio de ácidos orgânicos	21
6. RESULTADOS.....	24
6.1. Solubilização de P a partir de diferentes FN por <i>Aspergillus niger</i> FS1 e <i>Penicillium islandicum</i> .....	24
6.2. Solubilização de fosfato de rocha de Araxá e Catalão por meio da combinação de diferentes ácidos orgânicos .....	27
6.3. Solubilização de P a partir de fração do solo < 75 µm por meio de ácidos orgânicos	33
7. DISCUSSÃO .....	36
8. CONCLUSÕES .....	40
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICASAS.....	41



## RESUMO

DUARTE, Josiane Leal, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016. **Solubilização de fosfatos por *Aspergillus niger*, *Penicillium islandicum* e ácidos orgânicos.** Orientador: Maurício Dutra Costa. Coorientadores: Ivo Ribeiro da Silva e Leonardus Vergutz.

O uso de micro-organismos solubilizadores de fosfato (MSF) constitui alternativa viável para produção agrícola sustentável, devido à redução do consumo de adubos fosfatos solúveis de elevado custo. Os MSF podem potencialmente mobilizar P a partir de fosfatos de rocha pouco reativos ou a partir do solo. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar a solubilização de oito fosfatos naturais distintos (Araxá, Catalão, Bayovar, Argélia, Abaeté, Patos de Minas, crandalita e Gafsa) por *Aspergillus niger* FS1 ou *Penicillium islandicum* FS41 e alguns de seus metabólitos ácidos. Adicionalmente, avaliou-se a mobilização de P a partir de uma fração granulométrica < 75 µm de dois Latossolos distintos pelos ácidos cítrico e oxálico. O isolado de *A. niger* FS1 foi o mais eficiente em solubilizar a maioria dos fosfatos naturais testados. O P solúvel não se correlacionou com as concentrações de ácido oxálico e cítrico detectadas no meio de cultura, sugerindo que a maior solubilização de P por *A. niger* FS1 resultou da extrusão de H<sup>+</sup> e, ou da ação de outros metabólitos ácidos não detectados. A crandalita foi a fonte de P mais recalcitrante à solubilização microbiana. Para a solubilização de fosfato de Araxá e Catalão, o ácido oxálico, a 50 mmol L<sup>-1</sup>, foi o mais eficiente na solubilização de P. Observou-se interação sinérgica entre o ácido cítrico e o málico na solubilização dos fosfatos de rocha testados. O ácido oxálico foi capaz de disponibilizar P a partir da fração de 75 µm do Latossolo de Patos de Minas, levando a aumentos de até 9 vezes na concentração de P solúvel em comparação ao tratamento controle, sem ácido. O efeito do ácido oxálico foi solo-específico, não ocasionando aumentos significativos no P solúvel no Latossolo TG. O tratamento da fração < 75 µm dos solos com ácido cítrico levou à redução ou a pequenos aumentos no P solúvel, a depender do tipo de solo e horizonte avaliado. Este trabalho demonstrou a ampla diversidade de fosfatos naturais passíveis de sofrerem solubilização microbiana. O ácido oxálico foi mais eficiente em solubilizar a maioria das fontes de P testadas, bem como aquelas nativas de um dos solos testados. Os dados obtidos evidenciaram pela primeira vez o potencial do ácido oxálico em aumentar a disponibilidade de P em solução a partir da fase sólida do

solo. O uso de micro-organismos e de seus metabólitos na disponibilização de P a partir de fontes pouco solúveis pode contribuir para a realização de práticas agrícolas menos custosas do ponto de vista econômico e ambiental.

## ABSTRACT

DUARTE, Josiane Leal, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **Phosphate solubilization by *Aspergillus niger*, *Penicillium isalndicum*, and organic acids.** Advisor: Maurício Dutra Costa. Co-advisors: Ivo Riberio da Silva and Leonardus Vergutz.

The use of phosphate solubilizing microorganisms (PSM) constitute an alternative for a sustainable agricultural production, promoting decreases in the use of costly soluble phosphate fertilizers. The PSM can potentially solubilize P from low reactivity phosphate rocks or from the soil. Thus, the objective of this work was to evaluate the solubilization of eight different rock phosphates (Araxá, Catalão, Bayovar, Argélia, Abaeté, Patos de Minas, crandallite, and Gafsa) by *Aspergillus niger* FS1 and *Penicillium islandicum* FS41 and some of their acid metabolites. Additionally, P solubilization from a granulometric fraction  $< 75 \mu\text{m}$  of two distinct Oxysols by oxalic and citric acids was also evaluated. *A. niger* FS1 was the most effective isolate at P solubilization from most of the rock phosphates tested. Soluble P did not correlate with the oxalic and citric acid concentrations detected in the culture medium, suggesting that the higher P solubilization observed for *A. niger* FS1 resulted from  $\text{H}^+$  extrusion and, or the action of other acid metabolites that remained undetected. Crandallite was the P source found to be the most recalcitrant to microbial solubilization. For the solubilization of Araxá and Catalão rock phosphates, oxalic acid at  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  was the most efficient. A synergic interaction at phosphate solubilization between malic and citric acid was observed. Oxalic acid was capable of solubilizing P from a  $< 75\text{-}\mu\text{m}$  fraction of the Patos de Minas Oxysol, leading to increases of up to nine times the concentration of soluble P found in the control treatment without organic acids. The effect of oxalic acid on P solubilization was soil-specific and did not cause increases in soluble P in the TG Oxysol. The treatment of the granulometric fraction of the soils with citric acid led to slight increases or significant decreases in soluble P depending on the soil type and soil horizon analyzed. The present work demonstrated the wide variety of rock phosphate amenable to microbial solubilization. Oxalic acid was the most efficient to solubilize most of the rock phosphates, as well as those P sources native to one of the soils tested. The data obtained evidenced for the first time the potential of oxalic acid of increasing P availability in the soil solution from a fraction of the soil solid phase. The use of microorganisms and their metabolites for P solubilization from low-

solubility sources can contribute to the adoption of agricultural practices that are less costly from an economic and environmental point-of-view.

## 1. INTRODUÇÃO

A essencialidade do fósforo (P) para o metabolismo e o desenvolvimento das plantas deve-se ao fato do elemento atuar na respiração, na produção e armazenamento de energia, na divisão e crescimento celulares, além de ser constituinte do DNA e do RNA. Juntamente com outros fatores ambientais, o P desempenha papel central na fertilidade do solo e sua deficiência constitui restrição à produção vegetal.

A forte adsorção do P às partículas do solo leva à baixa disponibilidade do nutriente, limitando a produção vegetal. Como consequência dessa adsorção o solo atua como dreno, fixando o P adicionado de forma que o elemento não se encontrará livre em solução para ser absorvido pelas plantas. Da mesma maneira, o solo pode atuar como fonte, operando como reservatório natural do elemento.

Vários fatores alteram a disponibilidade e a mobilidade dos nutrientes no solo, a exemplo da adsorção às partículas minerais e das interações com íons orgânicos e inorgânicos. Em solução, o P possui alta capacidade de adsorção correlacionada aos óxidos de Al e Fe, em solos ácidos, e ao Ca, em solos alcalinos. Solos intemperizados, mais eletropositivos e ácidos, possuem maior capacidade de retenção de ânions, reduzindo a acessibilidade das plantas aos nutrientes.

O manejo ideal visa sincronizar a oferta de P de acordo com as exigências da cultura durante os estágios críticos de desenvolvimento de modo a aumentar a eficiência de recuperação dos nutrientes aplicados, diminuir os custos de produção e evitar perdas. As fontes de P disponíveis às plantas no decorrer do crescimento correspondem aos recursos próprios do solo e aos fertilizantes fosfatados aplicados, de modo que a captura do íon é dirigida pelo crescimento radicular e a quantidade do elemento no solo. A concentração de nutrientes na solução do solo é decisiva para suportar a taxa de absorção das plantas. Seu reabastecimento ocorre rapidamente com a adição de fertilizantes, de modo que essa prática tornou-se essencial para manutenção de altas produtividades, tornando a utilização desses insumos prática indispensável.

Os fertilizantes fosfatados são obtidos de fosfatos de rocha tratados quimicamente e possuem elevada concentração de P facilmente acessível às plantas. Os fosfatos naturais, de origem geológica ígnea ou metamórfica, apresentam baixa

reatividade, em contraste com os fosfatos de rochas de origem sedimentar, que são mais reativos. Os fosfatos naturais brasileiros apresentam, em geral, baixa eficiência de suprimento de P, o que torna necessária a utilização de fertilizantes fosfatados solúveis a fim de se atender as necessidades das culturas.

Para contornar a menor disponibilidade de P na solução do solo, altas doses de fertilizantes fosfatados solúveis têm sido aplicadas na agricultura. No Brasil, recentemente, a produção de fertilizantes fosfatados ( $P_2O_5$ ) registrou redução de 9,8%, passando de 240 mil toneladas em 2015 para 217 mil toneladas em 2016. Contudo, o País continua dependente de importações e do mercado externo e acredita-se que esta redução possui apenas caráter pontual. As fontes de P naturais que poderiam ser exploradas para atender a demanda de P são finitas e não renováveis, sendo a velocidade de exploração das jazidas muito superior às taxas de retorno do P ao seu ciclo natural, o que poderá levar ao colapso do fornecimento desse nutriente para a agricultura no futuro próximo.

Grande é o interesse na capacidade de micro-organismos do solo de efetuarem a mobilização do fósforo fixado à fase sólida do solo ou presente na manta orgânica visando o suprimento das culturas com esse elemento. Nesse aspecto, micro-organismos solubilizadores de fosfato, por meio da produção de ácidos orgânicos e enzimas fosfatases, podem atuar como agentes de liberação de P a partir das frações menos lábeis do solo, contribuindo para a redução do uso de fertilizantes e a maior conservação dos reservatórios naturais do nutriente. Além disso, a solubilização microbiana de fosfatos de rocha pode oferecer alternativa de suprimento de P com o uso de fosfatos pouco reativos e menos dispendiosos.

Assim, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar a solubilização de fosfatos naturais por *Aspegillus niger* e *Penicillium islandicum*, fungos obtidos no Instituto de Biotecnologia Aplicada á Agropecuária – BIOAGRO, Campus UFV, Viçosa, MG ou ácidos orgânicos selecionados. Adicionalmente, avaliou-se a mobilização de P a partir de uma fração granulométrica do solo por ácido cítrico e ácido oxálico.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A industrialização da agricultura tem promovido aumento significativo da produtividade agrícola, levando a maiores quantidades de alimentos disponíveis para a população. Juntamente com essa abundância, houve o aparecimento de graves problemas ambientais resultantes do uso contínuo de fertilizantes químicos (Pérez-Montañó et al., 2014; Lukowiak et al., 2016).

Entre os nutrientes necessários às plantas, o P destaca-se pelo papel fundamental que exerce no funcionamento celular, operando como componente estrutural ou metabólico (Marschner, 1995). O P constitui elemento-chave para o desenvolvimento e produtividade das culturas, atuando nas reações de transferência de energia, fixação de nitrogênio, síntese de glicose e na respiração, sendo, ainda, constituinte de ácidos nucleicos e fosfolipídios, dentre outras moléculas importante para a célula (Marschner, 1995; Barker e David, 2015).

Em virtude da grande capacidade de adsorção de P às partículas do solo, as áreas cultivadas têm recebido, nos últimos anos, grandes quantidades de adubos fosfatados com o propósito de se aumentar a disponibilidade do elemento para as plantas (Wang et al., 2014). A manutenção de níveis adequados de P para as culturas por intermédio da aplicação de fertilizantes tornou-se prática tão comum quanto danosa, muitas vezes levando a alterações negativas dos ecossistemas (Lukowiak et al., 2016). A manutenção de altas produtividades, com o mínimo possível de perturbação ambiental, é, atualmente, desafio de âmbito mundial (Seroa da Motta, 1997).

Em condições de baixa disponibilidade de nutrientes, especialmente N e P, as raízes transformam-se em forte dreno de carboidratos, causando limitação ao crescimento da parte aérea. A redução do crescimento da parte aérea ocorre logo após a deficiência de P, enquanto que o crescimento radicular só passa a ser limitado após intervalo de tempo maior, porém, com menor intensidade. Em situações de deficiência de P, as raízes tornam-se mais finas para explorar melhor o volume de solo, elevando ainda mais o consumo de energia, visto que são substituídas mais facilmente. Por outro lado, quando há excesso de P, a planta previne a toxidez convertendo fósforo inorgânico (Pi) em compostos de reserva (ácido fítico), diminuindo a taxa de absorção ou perdendo Pi por efluxo (Hewitt e Smith, 1974; Mengel e Kirkby, 1987; Marschner, 1995; Barker e David, 2015).

O manejo agrícola ideal visa sincronizar a oferta de P de acordo com as exigências da cultura durante os estágios críticos de desenvolvimento de modo a aumentar a eficiência de recuperação dos nutrientes aplicados, diminuir os custos de produção e evitar perdas (Fageria, 1998; Lukowiak et al., 2016). As maiores taxas de absorção de P pelas plantas ocorre durante o florescimento e continua até a maturação. As fontes de P disponíveis para as plantas são o próprio P do solo e os fertilizantes fosfatados aplicados, sendo a absorção do elemento pelas plantas influenciada pelo crescimento radicular e pela quantidade do nutriente no solo (Horn et al., 2006; Wang et al., 2014; Lukowiak et al., 2016). Haja vista a baixa disponibilidade de P na solução do solo torna-se necessária a aplicação sistemática de fertilizantes fosfatados visando suprir a demanda da planta por esse nutriente (Grant et al., 2001).

A dinâmica do P no solo pode ser medida por meio da transformação das frações orgânicas e inorgânicas do elemento (Stewart e Tiessen, 1987). O conteúdo total de P e a distribuição dessas frações variam de acordo com o material de origem e com fatores relacionados à gênese do solo, tais como clima, relevo, organismos vivos e tempo (Walker e Syers, 1976). Logo, está associada a fatores ambientais que controlam a atividade de micro-organismos e as propriedades físico-químicas e mineralógicas do solo (Novais e Smyth, 1999). Em solos mais jovens, o P ainda ocorre em minerais primários, mas a maior parte do elemento encontra-se na forma orgânica (Po) ou na forma mineral (Pi), adsorvida fracamente a minerais secundários. Nos solos altamente intemperizados, predominam as formas inorgânicas ligadas à fração mineral com alta energia e as formas orgânicas estabilizadas física e quimicamente (Santos e Kaminskii, 2008).

O P presente na fase sólida do solo pode ser dividido em duas frações: a fração lábil e a não lábil. Na fração lábil, caracterizada pelo fato do P se encontrar em forma trocável, o elemento pode ser encontrado em formas orgânicas e inorgânicas (Mendes e Reis Junior, 2003). A fração lábil é representada pelo conjunto de compostos fosfatados capazes de repor rapidamente o P à solução do solo, quando o nutriente é absorvido pelas plantas ou por micro-organismos. A fração não lábil corresponde ao P presente na estrutura dos minerais, bem como ao P fixado às partículas do solo (Marschner, 1995).

Com a dissolução lenta dos minerais primários durante o intemperismo, o Pi (P inorgânico) é liberado para a solução do solo, mantendo-se em equilíbrio com a



fase sólida (Marschner, 1995). Parte de Pi na solução é precipitado na forma de minerais secundários, podendo ser convertido em formas oclusas e a outra parte é absorvido pelas plantas. A liberação de P após a lise celular, fornece Po (P orgânico) ao solo, e este, ao sofrer a mineralização, fornece Pi novamente à solução (Guerra et al., 1996).

O Po é derivado de micro-organismos, plantas ou resíduos de origem animal e pode ser reciclado pela biomassa microbiana ou estabilizado na fase mineral do solo (Oehl et al., 2004). A mineralização a qual está sujeito pode ser dividida em dois processos: 1) mineralização bioquímica, no qual o Pi é liberado de compostos orgânicos através de exoenzimas fosfatases, sendo reguladas pela demanda de P; e 2) mineralização biológica, no qual a liberação de Pi de compostos orgânicos ocorre durante a oxidação de carbono (C), dentro da célula, sendo realizada pelos micro-organismos do solo e regulada pela demanda de energia (Mcgill e Cole, 1981). O conteúdo de Po no solo está associado, também, à proteção física da matéria orgânica do solo, por meio da oclusão dentro de agregados e pequenos poros, reduzindo a biodisponibilidade e acessibilidade aos micro-organismos e às enzimas do solo (Oehl et al., 2004).

A fração Pi presente no solo consiste em fosfatos minerais insolúveis e ânions fosfatos adsorvidos a minerais de Fe e Al e carbonatos de Ca (Oehl et al., 2004). Em solos brasileiros, o P é encontrado em maior quantidade como fosfatos de alumínio e ferro (Oehl et al., 2004). A disponibilidade de Pi depende de sua solubilidade que é influenciada pela atividade das raízes das plantas e dos micro-organismos do solo (Mendes e Reis Junior, 2003).

Na agricultura brasileira, o uso dos fertilizantes fosfatados solúveis, totalmente acidulados, obtidos a partir do tratamento ácido de rochas fosfáticas, é predominante. Esses fertilizantes possuem elevada concentração de P facilmente acessível às plantas (Corrêa et al., 2005; Fontoura et al., 2010). O alto custo desses insumos tem despertado o interesse pelos fosfatos naturais (FN), que custam bem menos por unidade de P do que os fertilizantes solúveis (Resende et al., 2006).

Os FN de origem geológica ígnea e metamórfica apresentam baixa reatividade, enquanto que os de origem sedimentar são considerados mais reativos. No Brasil, os FN apresentam baixa reatividade, sendo constituídos em sua maioria de rochas de origem ígnea (Novais e Smyth, 1999; Corrêa et al., 2005). Em geral, a

lenta liberação de P a partir desses materiais dificulta a utilização direta dos mesmos na fertilização do solo.

Alguns micro-organismos do solo são eficazes em liberar P a partir de fontes orgânicas ou inorgânicas por meio de processos de solubilização e mineralização. Deste modo, participam ativamente das transformações do nutriente no solo (Chabot et al., 1993). Várias populações de bactérias e fungos rizosféricos, a exemplo do *Penicillium e Aspergillus*, contribuem para o melhor crescimento e desenvolvimento das plantas por aumentarem a disponibilidade de P próximo às raízes, por meio de mecanismos de solubilização de fosfato (Behera et al., 2014).

A inoculação de micro-organismos solubilizadores de fosfatos (MSF) no solo tem sido sugerida como alternativa para se substituir ou se diminuir o uso de fertilizantes fosfatados solúveis, mediante a mobilização das formas nativas de P do solo ou de FN (Vessey, 2003). O uso de FN, conjuntamente com tais micro-organismos, é prática promissora, podendo reduzir custos e a dependência nacional por insumos estrangeiros. No entanto, durante o processo de solubilização efetuado por MSF, ocorre a liberação de outros elementos químicos a partir do FN, a exemplo o flúor, que são capazes de inibir o crescimento microbiano, sendo necessário estudar estratégias de aplicação de MSF (Mendes et al., 2013 a; Mendes et al., 2013 b; Mendes et al., 2014).

A produção de ácidos orgânicos e a extrusão de prótons ( $H^+$ ) são estratégias comumente utilizadas por diversos micro-organismos para promover a solubilização de FN, entretanto, os mecanismos responsáveis ainda não são plenamente conhecidos (Raij, 1991; Mendes et al., 2014).

Ácidos orgânicos, incluindo acetato, lactato, malato, oxalato, succinato, citrato, gluconato, podem formar complexos com o ferro, alumínio ou com outros cátions estáveis, como o cálcio, liberando o P disponível para as plantas no solo (Gyaneshwar et al., 2002). A solubilização de fosfato correlaciona-se com a capacidade de produção de ácidos orgânicos e, ou polissacarídeos extracelulares pelo micro-organismo (Omar, 1997).

A capacidade de complexação dos ácidos orgânicos está relacionada com a posição dos grupos OH/COOH da cadeia carbônica da molécula, sendo os ácidos mais eficientes o cítrico, o tartárico, o oxálico e o málico (Kpombrekou-A e Tabatabai, 1994). Os de eficiência moderada são o salicílico e o malônico; e dentre os de baixa eficiência, citam-se o succínico, o láctico e o fórmico (Menosso et al.,

2001). Em princípio, ácidos orgânicos alifáticos, com maior número de grupos carboxil, com grupos  $\beta$ -hidroxil, ou com grupos carboxil próximos, são mais efetivos na quelação de cátions bivalentes como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Al}^{3+}$ , presentes na estrutura dos FN (Kpombrekou-A e Tabatabai, 1994). De modo geral, os FN influenciam distintamente o crescimento e produção de ácidos orgânicos pelos MSF, interferindo na solubilização microbiana (Chuang et al., 2007; Mendes et al., 2014). Mendes et al. (2014) estudaram os mecanismos de solubilização de fosfato por isolados de fungos quando expostos a diferentes fontes de fósforo e, dentre os isolados testados, *Aspergillus niger* FSI foi o isolado com maior capacidade de solubilização para todos os tipos de fosfatos insolúveis testados ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ;  $\text{AlPO}_4$ ;  $\text{FePO}_4$  e FN). Esse estudo demonstrou que as fontes de fósforo influenciam fortemente o metabolismo e crescimento fúngico, bem como a produção de ácidos orgânicos.

A exsudação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular pode ser tanto constitutiva como induzida pela deficiência de fósforo (Chen et al., 2006). Também, a depender das condições de cultivo, uma única espécie microbiana pode secretar conjunto diferente de ácidos orgânicos, variando de um a vários tipos de compostos (Chen et al., 2006). No solo, os ácidos orgânicos podem constituir importante fonte de C lábil para a microbiota e, portanto, são rapidamente degradados, com meia-vida variando entre 0,5 e 12 horas (Van Hees et al., 2003). A taxa de mineralização, no entanto, é dependente de alguns fatores, tais como a biomassa e a estrutura da comunidade microbiana e a adsorção desses compostos às partículas do solo, que pode reduzir significativamente as taxas de decomposição (Van Hees et al., 2003).

Os ácidos orgânicos podem também aumentar a disponibilidade de P pelo bloqueio de sítios de adsorção às partículas do solo ou pela formação de complexos com cátions na superfície de minerais (Behera et al., 2014). O efeito da matéria orgânica do solo, bem como dos ácidos orgânicos dela provenientes, sobre o bloqueio dos sítios de adsorção, é transitório, mas pode ser vantajoso a depender da época de aplicação de fosfato (Afif et al., 1995). A capacidade dos ácidos orgânicos em competir com P pelos sítios de adsorção depende das concentrações do ácido, de sua forma — polimerizado ou não — do pH, da força iônica da solução e, principalmente, da persistência do ácido orgânico no solo (Cessa et al., 2010).

A produção de ácidos orgânicos resulta na acidificação do ambiente onde o micro-organismo se encontra, existindo correlação entre a diminuição do pH e a liberação de P (Kucey, 1983; Behera et al., 2014).

Asea et al. (1988) demonstraram a eficiência de micro-organismos em solubilizar FN, não via produção de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, mas promovendo a extrusão de prótons acompanhada pela assimilação de amônio. Os autores concluíram que, sob condições ideais de meio de cultura, o mecanismo dependente da absorção de amônio era capaz de efetuar a solubilização de P em maiores níveis do que os obtidos com o uso de ácidos orgânicos, estando relacionado com o decréscimo do pH.

O P orgânico pode ser liberado por três grupos de enzimas: 1) fosfatases, que executam a desfosforilação de ligações fosfo-éster ou fosfoanidrido da matéria orgânica; 2) fitases, que especificamente causam a liberação de P a partir do ácido fítico; e 3) fosfonatases e liases C-P, enzimas que realizam a clivagem de C-P em organofosfonatos (Behera et al., 2014). As fosfatases quebram as ligações fosfo-éster, proporcionando a liberação de fosfatos inorgânicos e de nucleotídeos. Dependendo do pH ótimo de atividade, são classificadas como fosfatases alcalinas (pH >7) ou ácidas (pH <6) (Behera et al., 2014).

Algumas fosfatases ácidas de alto peso molecular são denominadas fitases. O fitato é a principal reserva de formas orgânicas de P no solo (Rodriguez et al., 2006). A capacidade das plantas de obter fósforo diretamente a partir de fitato é muito limitada. No entanto, o crescimento e a nutrição fosfatada de plantas de *Arabidopsis thaliana*, na presença de fitato, foi significativamente melhorada em transformantes contendo o gene da fitase (phyA) de *Aspergillus niger* (Richardson et al., 2001). O teor de P e o crescimento dos transformantes foi equivalente aos das plantas controle, adubadas com fosfato inorgânico (Behera et al., 2014).

A redução das doses de adubos fosfatados solúveis associada ao uso de FN e MSF são tendências promissoras para o futuro. Diversos estudos demonstram a eficiência de MSF aplicados ao solo, na ausência de FN, em promover melhor absorção de P pelas plantas, sugerindo a capacidade dos mesmo de mobilizar os reservatórios de Pi e Po pouco lábeis (Asea et al., 1988; Jain et al., 2010; Cássia Silva et al., 2014). O uso de tais micro-organismos levará ao melhor aproveitamento de fertilizantes de alta ou baixa solubilidade, evitando perdas e diminuindo os custos de produção.

Embora a eficiência desses micro-organismos seja comprovada, o solo é ambiente complexo, onde há a interveniência de diversos fatores que podem afetar a disponibilização de P pelos MSF. Dessa forma, torna-se importante conhecer a dinâmica do P no solo do ponto de vista microbiológico, bem como entender como a microbiota e seus metabólitos atuam nas transformações de minerais aí presentes. Esse conhecimento contribuirá para o desenvolvimento de novas tecnologias de aplicação de MSF com maior capacidade de disponibilização de P para as plantas, reduzindo o consumo de fertilizantes de alto custo.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFIF E.; BARRON V.; TORRENT J. Organic matter delays but does not prevent phosphate sorption by cerrado soils from Brazil. *Soil Science* 159: 207-207, 1995.
- ASEA P.E.A.; KUCEY R.M.N.; STEWART J.W.B. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. *Soil Biology and Biochemistry* 20(4): 459-464, 1988.
- BARKER A.V.; DAVID J. P. *Handbook of plant nutrition*. CRC press, 2015.
- BEHERA B.C.; SINGDEVSACHAN S.K.; MISHRA R.R.; DUTTA S.K.; THATOI H.N. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3(2): 97-110, 2014.
- CÁSSIA SILVA U.; DE OLIVEIRA MENDES G.; SILVA N.M.R.; DUARTE J.L.; SILVA I.R.; TÓTOLA M.R.; COSTA M.D. Fluoride-Tolerant Mutants of *Aspergillus niger* Show Enhanced Phosphate Solubilization Capacity. *Revista PLOS ONE*, 2014.
- CESSA R.M.A.; VITORINO A.C.T.; CELI L.; NOVELINO J.O.; BARBERIS E. Adsorção de fósforo em frações argila na presença de ácido fúlvico. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 34(5): 1535-1542, 2010.
- CHABOT R.; ANTOUN H.; CESCAS M.P. Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. *Canadian Journal of Microbiology* 39: 941-947, 1993.
- CHEN Y.P.; REKHA P.D.; ARUN A.B.; SHEN F.T.; LAI W.A.; YOUNG C.C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 34: 33-41, 2006.
- CHUANG C.C.; KUO Y.L.; CHAO C. C.; CHAO W.L. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biology and Fertility of Soils* 43(5): 575-584, 2007.

- CORRÊA R.M.; NASCIMENTO C.W.A.D.; SOUZA S.K.D.S.; FREIRE F.J.; SILVA G.B.D. Gafsa rock phosphate and triple superphosphate for dry matter production and P uptake by corn. *Scientia Agricola* 62(2): 159-164, 2005.
- FAGERIA N. K. Otimização da eficiência nutricional na produção das culturas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 2(1): 6-16, 1998.
- FONTOURA S.M.V.; VIEIRA R.C.B.; BAYER C.; ERNANI P.R.; MORAES R.P.D. Eficiência técnica de fertilizantes fosfatados em Latossolo sob plantio direto. *Revista brasileira de ciência do solo. Campinas* 34(6): 1907-1914, 2010.
- GRANT C.A.; FLATEN D.N.; TOMASIEWICZ D.J.; SHEPPARD S.C. A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. *Piracicaba: ESALQ*, 2001.
- GUERRA J.G.M.; DE ALMEIDA D.L.; DE ARAÚJO SANTOS G.; FERNANDES M.S. Conteúdo de fósforo orgânico em amostras de solo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 31(4): 291-299, 1996.
- GYANESHWAR P.; KUMAR G.N.; PAREKH L.J.; POOLE P.S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Food Security in Nutrient-Stressed Environments: Exploiting Plants' Genetic Capabilities*. Springer Netherlands 133-143, 2002.
- HEWITT E.J.; SMITH T.A. *Plant mineral nutrition*. English Universities Press Ltd., 1974.
- HORN D.; ERNANI P.R.; SANGOI L.; SCHWEITZER C.; CASSOL P.C. Parâmetros cinéticos e morfológicos da absorção de nutrientes em cultivares de milho com variabilidade genética contrastante. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 30: 77-85, 2006.
- JAIN R.; SAXENA J.; SHARMA V. The evaluation of free and encapsulated *Aspergillus awamori* for phosphate solubilization in fermentation and soil-plant system. *Applied Soil Ecology* 46(1): 90-94, 2010.
- KPOMBLEKOU-A K; TABATABAI M.A. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Science* 158(6):442-453, 1994.
- KUCEY R.M.N. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Canadian Journal of Soil Science* 63(4): 671-678, 1983.
- LUKOWIAK R.; GRZEBISZ W.; SASSENATH G. F. New insights into phosphorus management in agriculture-A crop rotation approach. *Science of The Total Environment* 542: 1062-1077, 2016.
- MARSCHNER H. Mineral nutrition of higher plants. *New York: Academic Press* 889, 1995.

- MCGILL W.B.; COLE C.V. Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. *Geoderma* 26(4): 267-286, 1981.
- MENDES G.O.; DIAS C.S.; SILVA I.R.; JÚNIOR J.I.R.; PEREIRA O.L.; COSTA M.D. Fungal rock phosphate solubilization using sugarcane bagasse. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29(1): 43-50, 2013 a.
- MENDES G.O.; FREITAS A.L.M.; PEREIRA O.L.; DA SILVA I.R.; VASSILEV N.B.; COSTA M.D. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Annals of Microbiology* 64 (1): 239-249, 2014.
- MENDES G.O.; VASSILEV N.B.; BONDUKI V.H.A.; DA SILVA I.R.; RIBEIRO J.I.; COSTA M.D. Inhibition of *Aspergillus niger* phosphate solubilization by fluoride released from rock phosphate. *Applied and environmental microbiology* 79(16): 4906-4913, 2013 b.
- MENDES I.D.C.; REIS JUNIOR F.B. Microrganismos e disponibilidade de fósforo (P) nos solos: uma análise crítica. *Embrapa Cerrados. Documentos*, 2003.
- MENGEL K.; KIRKBY E.A. *Principles of plant nutrition* (No. Ed. 4). International Potash Institute, 1987.
- MENOSSE O.G.; COSTA J.A.; ANGHINONI I.; BOHNEN, H. Crescimento radicular e produção de ácidos orgânicos em cultivares de soja com diferentes tolerâncias ao alumínio. *Pesq. Agrop. Bras* 36: 1339-1345, 2001.
- NOVAIS R.F.; SMYTH, T.J. Fósforo em solo e planta em condições tropicais. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa 399, 1999.
- OEHL F.; FROSSARD E.; FLIESSBACH A.; DUBOIS D.; OBERSON A. Basal organic phosphorus mineralization in soils under different farming systems. *Soil Biology and Biochemistry* 36(4): 667-675, 2004.
- OMAR S.A. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular–arbusular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14(2): 211-218, 1997.
- PÉREZ-MONTAÑO F.; ALÍAS-VILLEGAS C.; BELLOGÍN R.A.; DEL CERRO P.; ESPUNY M.R.; JIMÉNEZ-GUERRERO I.; LÓPEZ-BAENA F.J.; OLERO F.J.; CUBO T. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research* 169(5): 325-336, 2014.
- RAIJ, B.V. Fertilidade do solo e adubação. *Ceres*, 1991.
- RESENDE A.V.; FURTINI NETO A.E.; ALVES V.M.C.; MUNIZ J.A.; CURI N.; FAQUIN V.; KIMPORA D.I.; SANTOS J.Z.L.; CARNEIRO L.F. Fontes e modos

- de aplicação de fósforo para o milho em solo cultivado da região do Cerrado. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 30:453-466, 2006.
- REYES I.; BERNIER L.; SIMARD R.R.; ANTOUN H. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiology Ecology* 28(3): 281-290, 1999.
- RICHARDSON A.E.; HADOBAS P.A.; HAYES J.E. Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. *The Plant Journal* 25(6): 641-649, 2001.
- RODRIGUEZ H.; FRAGA R.; GONZALEZ T.; BASHAN Y. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and soil* 287(1-2): 15-21, 2006.
- SANTOS D.R.; KAMINSKII L.C.G.J. Fatores que afetam a disponibilidade do fósforo e o manejo da adubação fosfatada em solos sob sistema plantio direto. *Ciência Rural* 38(2): 576-586, 2008.
- SEROA DA MOTTA R. Desafios ambientais da economia brasileira. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), 1997.
- STEWART J.W.B.; TIESSEN H. Dynamics of soil organic phosphorus. *Biogeochemistry* 4(1): 41-60, 1987.
- VAN HEES P.A.W.; VINOGRADOFF S.I.; EDWARDS A.C.; GODBOLD D.L.; JONES D.L. Low molecular weight organic acid adsorption in forest soils: effects on soil solution concentrations and biodegradation rates. *Soil Biology and Biochemistry* 35(8): 1015-1026, 2003.
- VESSEY J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255(2): 571-586, 2003.
- WALKER T.W.; SYERS J.K. The fate of phosphorus during pedogenesis. *Geoderma* 15(1): 1-19, 1976.
- WANG E.; BELL M.; LUO Z.; MOODY P.; PROBERT M.E. Modelling crop response to phosphorus inputs and phosphorus use efficiency in a crop rotation. *Field Crops Research* 155: 120-132, 2014.



**SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS POR *Aspergillus niger*, *Penicillium islandicum* E ÁCIDOS ÔRGANICOS**

## Solubilização de fosfatos por *Aspergillus niger*, *Penicillium islandicum* e ácidos orgânicos

Josiane Leal Duarte

### RESUMO

O uso de micro-organismos solubilizadores de fosfato (MSF) constitui alternativas para produção agrícola sustentável, pois permite a redução do consumo de adubos fosfatos solúveis de custo elevado. Os MSF podem mobilizar P a partir de fosfatos de rocha pouco reativos ou a partir do solo. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a solubilização de oito fosfatos naturais distintos (Araxá, Catalão, Bayovar, Argélia, Abaeté, Patos de Minas, crandalita e Gafsa) por *Aspergillus niger* FS1 ou *Penicillium islandicum* FS41 e ácidos orgânicos. Adicionalmente, avaliou-se a mobilização de P a partir de uma fração granulométrica < 75 µm de dois Latossolos distintos pelos ácidos cítrico e oxálico. O isolado de *A. niger* FS1 foi o mais eficiente em solubilizar a maioria dos fosfatos naturais testados. O P solúvel não se correlacionou com as concentrações de ácido oxálico e cítrico detectadas no meio de cultura. A crandalita foi a fonte de P mais recalcitrante à solubilização microbiana. Para a solubilização de fosfato de Araxá e Catalão, o ácido oxálico, a 50 mmol L<sup>-1</sup>, foi o mais eficiente na solubilização de P. Observou-se interação sinérgica entre o ácido cítrico e o málico na solubilização dos fosfatos de rocha testados. O ácido oxálico foi capaz de disponibilizar P a partir da fração de 75 µm do Latossolo de Patos de Minas, levando a aumentos de até 9 vezes na concentração de P solúvel em comparação ao tratamento controle. O efeito do ácido oxálico foi solo-específico, não ocasionando aumentos significativos no P solúvel no Latossolo TG. O tratamento da fração granulométrica < 75 µm dos solos com ácido cítrico levou à redução ou a pequenos aumentos no P solúvel, a depender do tipo de solo e horizonte avaliado. O ácido oxálico foi mais eficiente em solubilizar a maioria das fontes de P testadas, bem como aquelas nativas de um dos solos testados. Os dados obtidos evidenciaram o potencial do ácido oxálico em aumentar a disponibilidade de P em solução a partir da fase sólida do solo. O uso de micro-organismos e de seus metabólitos na disponibilização de P a partir de fontes pouco solúveis pode contribuir para o desenvolvimento de práticas agrícolas sustentáveis.

#### 4. INTRODUÇÃO

A disponibilidade de fósforo (P) é um dos fatores mais limitantes à produção agrícola nos solos tropicais em face da forte adsorção desse nutriente às partículas de solo (Corrêa et al., 2005). Tradicionalmente, esse fato leva à necessidade de aplicação de doses elevadas de fontes de P altamente solúveis, visando incrementar a fertilidade do solo, com consequentes aumentos da produtividade das culturas (Wang et al., 2014).

Contudo, o uso contínuo de fertilizantes químicos de alta solubilidade, além de encarecer os custos de produção, pode ocasionar problemas ambientais, a exemplo da eutrofização de mananciais hídricos (Pérez-Montañó et al., 2014; Lukowiak et al., 2016). Os fosfatos naturais (FN) despontam como alternativa ao uso desses insumos, sendo fontes mais econômicas de P. Esses fosfatos podem ter origem ígnea, metamórfica ou sedimentar, sendo, em geral, pouco reativos (Novais e Smyth, 1999; Corrêa et al., 2005). Além disso, podem conter elementos tóxicos que são liberados durante a solubilização, podendo afetar micro-organismos do solo (Mendes et al., 2013 b).

Visando aumentar a disponibilidade de P para as plantas, muitos estudos têm usado micro-organismos solubilizadores de fosfato (MSF), via aplicação direta ao solo ou juntamente com FN, como forma alternativa de produção mais sustentável e econômica (Vessey, 2003; Mendes et al., 2013 a; Lukowiak et al., 2016). Esses micro-organismos são eficazes em liberar P a partir de fontes orgânicas ou inorgânicas por meio de processos de solubilização e mineralização. Entre os fungos solubilizadores relatados na literatura destacam-se *Penicillium* e *Aspergillus* como os mais eficientes em disponibilizar P (Behera et al., 2014). A produção de ácidos orgânicos e a extrusão de prótons ( $H^+$ ) são estratégias comumente utilizadas por diversos micro-organismos, incluindo *Penicillium* e *Aspergillus*, para promover a solubilização de FN (Raij, 1991; Mendes et al., 2014). Entretanto, os mecanismos responsáveis ainda não são plenamente conhecidos.

Ácidos orgânicos, incluindo acetato, lactato, malato, oxalato, succinato, citrato, gluconato, podem formar complexos com o ferro, alumínio ou com outros cátions estáveis, como o cálcio, liberando o P disponível para as plantas no solo (Gyaneshwar et al., 2002). A solubilização de fosfato correlaciona-se com a capacidade de produção de ácidos orgânicos e, ou polissacarídeos extracelulares pelo

micro-organismo (Omar, 1997). A correlação positiva entre a solubilização de fosfato por *Penicillium rugulosum* e a produção de ácido glucônico ou cítrico já foi relatada na literatura (Reyes et al., 1999).

A capacidade de complexação dos ácidos orgânicos está relacionada com a posição dos grupos OH/COOH da cadeia carbônica da molécula, sendo os ácidos mais eficientes o cítrico, o tartárico, o oxálico e o málico (Kpombrekou-A e Tabatabai, 1994). Os de eficiência moderada são o salicílico e o malônico; e dentre os de baixa eficiência, citam-se o succínico, o láctico e o fórmico (Menosso et al., 2001).

Em princípio, ácidos orgânicos alifáticos, com maior número de grupos carboxil, com grupos  $\beta$ -hidroxil, ou com grupos carboxil próximos, são mais efetivos na quelação de cátions como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Al}^{3+}$ , presentes na estrutura dos FN, sendo os ácidos tricarbônicos mais eficientes do que os dicarbônicos e monocarbônicos (Kpombrekou-A e Tabatabai, 1994).

De modo geral, os FN influenciam distintamente o crescimento e produção de ácidos orgânicos pelos MSF, interferindo na solubilização microbiana (Chuang et al., 2007; Mendes et al., 2014). Mendes et al. (2014) estudaram os mecanismos de solubilização de fosfato por isolados fúngicos expostos a diferentes fontes de fósforo e, dentre os isolados testados, *Aspergillus niger* FSI foi o isolado com maior capacidade de solubilização para todos os tipos de fosfatos insolúveis testados ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ;  $\text{AlPO}_4$ ;  $\text{FePO}_4$  e FN). Esse estudo demonstrou que as fontes de fósforo influenciam fortemente o metabolismo e crescimento fúngico, bem como a produção de ácidos orgânicos (Mendes et al., 2014).

O P presente na fase sólida do solo pode ser dividido em duas frações: a fração lábil e a não lábil. A fração lábil é representada pelo conjunto de compostos fosfatados capazes de repor rapidamente o P à solução do solo, quando o nutriente é absorvido pelas plantas ou por micro-organismos. A fração não lábil corresponde ao P presente na estrutura dos minerais, bem como ao P fixado às partículas do solo, portanto pouco disponível às plantas (Marschner, 1995; Mendes e Reis Junior, 2003).

Com a dissolução lenta dos minerais primários durante o intemperismo, o P inorgânico ( $\text{P}_i$ ) é liberado para a solução do solo, mantendo-se em equilíbrio com a fase sólida (Marschner, 1995). Parte de  $\text{P}_i$  na solução é precipitado na forma de minerais secundários, podendo ser convertido em formas oclusas e a outra parte é absorvido pelas plantas. A liberação de P após a lise celular, fornece P orgânico ( $\text{P}_o$ )

ao solo, e este, ao sofrer a mineralização, fornece Pi novamente à solução (Guerra et al., 1996).

A fração Pi presente no solo consiste em fosfatos minerais insolúveis e ânions fosfatos adsorvidos a minerais de Fe e Al e carbonatos de Ca (Oehl et al., 2004). Em solos brasileiros, o P é encontrado em maior quantidade como fosfatos de alumínio e ferro (Oehl et al., 2004). A disponibilidade de Pi depende da solubilidade do mineral, sendo influenciada pela atividade das raízes das plantas e dos micro-organismos do solo (Mendes e Reis Junior, 2003). Pouco se conhece sobre a capacidade de micro-organismos do solo ou de seus metabólitos em disponibilizar o P fixado às partículas do solo ou precipitado com alumínio ou ferro nos solos tropicais . Assim, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar a solubilização de oito fosfatos naturais distintos (Araxá, Catalão, Bayovar, Argélia, Abaeté, Patos de Minas, crandalita e Gafsa) por *Aspergillus niger* FS1, *Penicillium islandicum* FS41 e alguns de seus metabólitos ácidos. Adicionalmente, avaliou-se a mobilização de P a partir de uma fração granulométrica de dois latossolos distintos pelos ácidos cítrico e oxálico.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Ecologia Microbiana, pertencente ao Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária — BIOAGRO, Campus UFV, Viçosa, MG. As culturas dos fungos rizosféricos *Aspergillus niger* FS1 e *Penicillium islandicum* foram obtidas a partir da Coleção de Fungos Solubilizadores de Fosfato do Laboratório de Ecologia Microbiana e mantidas em Batata-Dextrose-Ágar (BDA) a 30 °C. As culturas foram repicadas quinzenalmente para meio BDA e mantidas sob as mesmas condições de temperatura.

Em todos os experimentos, a inoculação dos isolados fúngicos nos meios líquidos foi realizada utilizando-se  $10^6$  conídios para cada 50 mL de meio. A suspensão de conídios foi preparada em Tween 80 a 0,1%.

### 5.1. Solubilização de P a partir de diferentes FN por *Aspergillus niger* FS1 e *Penicillium islandicum*

Os fungos foram cultivados em frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 50 ml de meio desenvolvido por Strasser (1994), contendo, em  $g L^{-1}$ : 100 de sacarose; 1,5 de  $NaNO_3$ ; 0,5 de  $KH_2PO_4$ ; 0,025 de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,025 de KCl e 1,6 de extrato de levedura. O meio foi suplementado com  $3 g L^{-1}$  de diferentes FN (Tabela 1). O pH foi ajustado para 6 antes da aplicação das fontes de P. A incubação dos frascos Erlenmeyer foi conduzida por 5 dias a 30 °C e 160 rpm. Frascos controle, sem a inoculação fúngica, foram incubados nas mesmas condições a fim de se estimar a solubilização de P não microbiana.

Após a incubação, o micélio foi coletado em filtro de poros de 8  $\mu m$  e seco a 70 °C até peso constante, seguido da incineração a 500 °C durante 8 horas. A massa fúngica seca foi determinada subtraindo-se o peso do resíduo após incineração do peso seco obtido a 70 °C. Esse método evita a superestimação da massa fúngica seca devido à aderência de partículas de fosfato no micélio. Após a coleta do micélio, determinou-se o pH, a acidez titulável e o P solúvel pelo método do ácido ascórbico (Braga e Defelipo, 1974). A acidez titulável foi aferida

**Tabela 1.** Composição química dos fosfatos de rocha e dos solos

<b>Fosfato/Solo</b>	<b>P</b>	<b>Granulometria</b>
	<b>-- %--</b>	<b>---- μm----</b>
Araxá	13,9	< 75
Catalão	16,2	< 75
Bayovar	11,8	< 75
Argélia	13,5	< 75
Abaeté	13,9	< 75
Patos de Minas	14,4	< 75
Crandalita	3,9	< 75
Gafsa	13,5	< 75
Solo Patos HA	0,50	< 75
Solo Patos HB	0,66	< 75
Solo TG HA	0,20	< 75
Solo TG GB	0,20	< 75

(Patos HA) horizonte A e (Patos HB) horizonte B de solos coletados em Patos de Minas, MG. (TG HA) horizonte A e (TG HB) horizonte B de solos coletados em Viçosa, MG.

pela titulação de 5 ml do filtrado até pH 7 com 0,1 M de NaOH, utilizando azul de bromotimol como indicador de pH.

Para as análises de ácido oxálico, para garantir a solubilização dos precipitados de oxalato de cálcio formados durante o processo de solubilização, os sobrenadantes da cultura foram acidificados com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 95% para um valor de pH de aproximadamente 1 antes da filtração.

Os ácidos cítrico, oxálico e sacarose residual foram determinados usando aparelho de HPLC Shimadzu 20-AT equipado com detector de índice de refração (RI). A separação cromatográfica foi realizada em coluna Rezex ROA-Organic acid H<sup>+</sup>(8%) (8 µm, 300 mm x 67,8 mm) com volume de injeção de amostra de 20 µL e o tempo de análise de 15 minutos. A fase móvel para os ácidos correspondeu a ácido sulfúrico (5 mmol L<sup>-1</sup>) com taxa de fluxo de 0.7 mL min<sup>-1</sup>. Os ácidos foram quantificados pela referência para as áreas dos picos obtidos com os padrões apropriados (Merck, Alemanha). Para açúcares: detector RI. Para ácidos orgânicos: detector com comprimento de onda 210 nm).

A sacarose residual e o açúcar consumido foram calculados pela diferença entre o total de sacarose que continha no meio antes e após incubação.

A eficiência de solubilização (Y<sub>P/B</sub>) (Mendes et al., 2014) foi calculada dividindo-se o P solúvel (mg), obtido no sobrenadante, pela biomassa fúngica (g), em 50 mL de meio. A eficiência de produção de acidez (Y<sub>AT/B</sub>) foi calculada dividindo-se a acidez titulável, em mmol H<sup>+</sup>L<sup>-1</sup>, pela biomassa fúngica seca (g), em 50 ml de meio.

O experimento foi conduzido em esquema fatorial (8 X 3), com 8 tipos de FN, três tratamentos de inoculação (*A. niger* FS01; *P. islandicum*; sem inoculação fúngica) e três repetições, em delineamento inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA, seguido pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade e correlações simples de Pearson. Utilizou-se o software estatístico GENES (Cruz, 1998).

## **5.2. Solubilização de fosfato de rocha de Araxá e Catalão por meio da combinação de diferentes ácidos orgânicos**



Fosfato de rocha Araxá ou Catalão, na dose de 3 g L<sup>-1</sup>, foram adicionados a Tubos Falcon de 50 ml, contendo 30 ml de meio NBRIP (Nautiyal, 1999), com a seguinte composição, em g L<sup>-1</sup>: glicose, 10; MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 5; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,25; KCl, 0,2; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1; pH 6,0. O meio foi suplementado com diferentes combinações, dois a dois, dos ácidos cítrico, oxálico e málico em diferentes concentrações (0, 25, 50 e 100 mmol L<sup>-1</sup>) e incubados em shaker horizontal durante 7 dias a 30 °C e 120 rpm. Após incubação, os meios foram filtrados em papel filtro de poros de 8 µm para determinação do pH e P solúvel pelo método do ácido ascórbico (Braga e Defelipo, 1974).

O experimento foi montado em esquema fatorial (2 x 4), com dois ácidos orgânicos e 4 doses (0, 25, 50 e 100 mmol L<sup>-1</sup>), com 3 repetições, em esquema inteiramente casualizado. As combinações dos ácidos de cada experimento foram ácido cítrico X ácido málico, ácido cítrico X ácido oxálico e ácido málico X ácido oxálico. Os dados foram submetidos à ANOVA, análise de regressão e superfície de resposta (Sigmaplot, Systat Software, Inc.). Para as análises estatísticas utilizou-se o pacote estatístico ExpDes (Ferreira et al., 2013) e software RStudio (R Core Team, 2014).

### **5.3. Solubilização de P a partir de fração do solo < 75 µm por meio de ácidos orgânicos**

Amostras compostas superficiais (0-20 cm) e subsuperficiais (40-60 cm) de dois Latossolos localizados nos municípios de Patos de Minas (18°58' S 46°52' W) e Viçosa (20°45' S e 42°51' W), Estado de Minas Gerais, Brasil, foram coletadas, secas ao ar, peneiradas em peneira com malha de 2 mm e submetidas a análises químicas e físicas de rotina (Tabela 2). As amostras tamizadas foram passadas novamente em peneira com malha de 75 µm a fim de se obter fração granulométrica semelhante aos FN.

Frascos Erlenmeyer de 125 ml, contendo 50 ml de meio NBRIP (Nautiyal, 1999), pH 6,0, suplementado com 3 g L<sup>-1</sup> de solo, foram adicionados de ácido cítrico e ácido oxálico em diferentes concentrações (0, 50, 100, 250 e 500 mmol L<sup>-1</sup>) e incubados em shaker horizontal durante 7 dias a 30 °C e 160 rpm. Após incubação,

os meios foram filtrados em papel filtro de poros de 8  $\mu\text{m}$  para determinação do pH, P solúvel pelo método do ácido ascórbico (Braga e Defelipo, 1974).

O experimento foi montado em esquema fatorial (2 x 5), com dois ácidos orgânicos, 5 doses do ácido e 3 repetições, em delineamento inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA, seguido da análise de regressão e teste de identidade de modelos (teste F, segundo Regazzi e Silva, 2004). Para as análises estatísticas utilizou-se o pacote estatístico ExpDes (Ferreira et al., 2013) e software RStudio (R Core Team, 2014).

**Tabela 2.** Características físicas e químicas dos solos

Solo	pH	P	K	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H+ Al	SB	CTC (t)	CTC (T)	V	m	MO	P-rem	Areia	Silte	Argila
	H <sub>2</sub> O	-- mg/dm <sup>3</sup> --			----- cmol/dm <sup>3</sup> -----						---%---		dag/kg	mg/L	----- %- -----		
Patos HA	6,3	51,3	270	11,7	4,2	0	4,62	16,59	16,59	21,21	78	0	7,89	16,8	15	31	54
Patos HB	5,9	17,3	230	2,6	0,8	0	7,1	3,99	3,99	11,09	36	0	3,35	4,2	43	21	36
TG HA	5,2	1,1	115	0,6	0,2	0,7	7,59	1,09	1,79	8,68	13	39	3,22	10,7	44	10	46
TG HB	4,9	0,8	6	0,1	0	0,3	3,47	0,12	0,42	3,59	3	71	1,55	3,8	57	9	34

(Patos HA) horizonte A e (Patos HB) horizonte B de solos coletados em Patos de Minas, MG. (TG HA) horizonte A e (TG HB) horizonte B de solos coletados em Viçosa, MG. pH em água - Relação 1:2,5; P - K - Fe - Zn - Mn - Cu - Extrator Mehlich 1; Ca - Mg - Al - Extrator: KCl - 1 mol/L; H + Al - Extrator Acetato de Cálcio 0,5 mol/L - pH 7,0; SB = Soma de Bases Trocáveis; CTC (t) - Capacidade de Troca Catiônica Efetiva; CTC (T) - Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0; V = Índice de Saturação de Bases; m = Índice de Saturação de Alumínio; P-rem = Fósforo Remanescente; Mat. Org. (MO) - Oxidação: Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 4N + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mol L<sup>-1</sup>; Silte, areia e argila – Método da “Pipeta” segundo EMBRAPA.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Solubilização de P a partir de diferentes FN por *Aspergillus niger* FS1 e *Penicillium islandicum*

*A. niger* FS01 demonstrou maior capacidade de solubilização dos fosfatos de rocha testados em comparação ao *P. islandicum* FS41. (Tabela 3). A solubilização de crandalita foi semelhante para os dois isolados (Tabela 3). A porcentagem de solubilização variou de acordo com as fontes de P para ambos os fungos, destacando-se os fosfatos de rocha Araxá e Bayovar, para *A. niger* FS01, com porcentagens de 75% e 66%, respectivamente, enquanto *P. islandicum* FS41 mostrou, em média, porcentagens inferiores a 15% (Tabela 3). As fontes de P influenciaram o metabolismo de *A. niger* FS1, como evidenciado pelas análises de pH e acidez titulável (Tabela 3). O cultivo desse isolado resultou em menores valores de pH no meio e em maiores valores de acidez titulável quando comparado a *P. islandicum* FS41 (Tabela 3).

A produção de ácidos orgânicos variou com as espécies fúngicas testadas, bem como em função do tipo de FN (Tabela 4). Em geral, a produção de ácido cítrico para os dois isolados fúngicos foi maior do que a produção de ácido oxálico (Tabela 4). A maior produção de ácido oxálico foi obtida por *A. niger* FS1 na presença de crandalita (Tabela 4). Interessantemente, as concentrações de ácido oxálico e ácido cítrico foram semelhantes para os dois isolados fúngicos testados na presença dos FN de Catalão e Araxá (Tabela 4). No entanto, nas mesmas condições, o P solúvel foi maior para *A. niger* FS1 (Tabela 3).

Não foi detectada a produção de ácido oxálico na presença de Bayovar para *A. niger* FS1 e na presença de Bayovar e crandalita para *P. islandicum* FS41 (Tabela 4).

Nas análises de correlação de Pearson, os dados obtidos para crandalita não foram incluídos em função do comportamento discrepante dessa fonte de P em comparação às demais FN (Tabelas 3 e 4). Observou-se correlação negativa entre P solúvel e pH (-0,91;  $p < 0,01$ ) e entre pH e acidez titulável (-0,73;  $p < 0,01$ ).

**Tabela 3.** P solubilizado ( $\text{mg L}^{-1}$ ), pH e acidez titulável ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) em meio Strasser (1994) suplementado com diferentes fosfatos de rocha ( $3 \text{ g L}^{-1}$ ) após incubação com *Aspergillus niger* FS1 e *Penicillium islandicum* FS41 durante 5 dias a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e 160 rpm

Fosfatos	P				pH		Acidez titulável	
	FS1	FS41	FS1	FS41	FS1	FS41	FS 1	FS 41
	----- $\text{mg L}^{-1}$ -----		-----%----				----- $\text{H}^+ \text{ mmol L}^{-1}$ -----	
Catalão	287,55 A ab	41,57 B a	59,17	8,55	3,50 B a	5,30 A a	4,2733 A b	1,4892 B a
Araxá	314,56 A a	38,46 B a	75,43	9,22	3,52 C a	4,73 B a	4,2085 A b	1,1007 B a
Bayovar	233,65 A b	30,80 B a	66,00	8,70	3,49 B a	5,42 A a	5,633 A ab	1,0359 B a
Argélia	244,16 A b	11,03 B a	60,29	2,72	3,58 B a	4,59 B a	5,6977 A ab	2,0719 B a
Abaeté	266,82 A ab	38,85 B a	63,98	9,32	3,51 B a	5,15 A a	4,0143 A b	1,4244 B a
Patos de minas	221,65 A b	78,56 B a	51,31	18,19	3,39 B a	5,36 A a	5,8919 A ab	1,1007 B a
Crandalita	59,18 A c	49,45 A a	50,58	42,27	2,05 C b	4,38 B a	8,3523 A a	1,2302 B a
Gafsa	265,62 A ab	69,12 B a	65,58	17,07	3,59 B a	4,43 B a	6,2157 A ab	1,0359 B a

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5%

FS1= *Aspergillus niger*; FS41 = *Penicillium islandicum*

**Tabela 4.** Concentração de ácido cítrico e oxálico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) produzido por *Aspergillus niger* FS1 e *Penicillium islandicum* FS41 em meio Strasser (1994) suplementado com diferentes fosfatos de rocha ( $3 \text{ g L}^{-1}$ ), após incubação durante 5 dias a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $160 \text{ rpm}$ . <sup>1</sup> Para o mesmo tipo de ácido, letras minúsculas comparam fosfatos e maiúsculas comparam fungos pelo teste de Tukey a  $p < 0,05$ .

Fosfatos	Ácido oxálico		Ácido cítrico	
	FS 1	FS 41	FS 1	FS 41
	-- $\text{mg L}^{-1}$ --	-- $\text{mg L}^{-1}$ --	-- $\text{mg L}^{-1}$ --	-- $\text{mg L}^{-1}$ --
Catalão	178228 Ab	424493 Aa	908868 Aa	854554 Aab
Araxá	332675 Ab	413224 Aa	1310.29 Aa	1226.13 Aa
Bayovar	0 Ab	0 Aa	234059 Ab	300919 Abc
Argélia	27998 Ab	63006 Aa	641028 Aab	840572 Aab
Abaeté	643119 Ab	153574 Aa	1295.08 Aa	327757 Abc
Patos de minas	174071 Ab	498738 Aa	784287 Aa	1099.74 Aa
Crandalita	3965.2 Aa	0 Ba	697.3 Aa	818159 Aab
Gafsa	235421 Ab	0 Aa	1039.6 Aa	134843 Bc

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5%.

FS1= *Aspergillus niger*; FS41 = *Penicillium islandicum*

Não foram observadas correlações significativas entre P solúvel e as concentrações dos ácidos oxálico e cítrico no meio de cultura. No entanto, o P solúvel correlacionou-se positiva e significativamente com a acidez titulável (0,74;  $p < 0,01$ ). Da mesma forma, as concentrações de ácido cítrico e ácido oxálico correlacionaram-se positivamente (0,81;  $p < 0,01$ ).

Não foram observados efeitos significativos dos FN sobre a produção de biomassa fúngica (Tabela 5). *A. niger* FS1 consumiu menos sacarose do meio do que o isolado *P. islandicum* FS41 (Tabela 5). *A. niger* FS1 apresentou maiores valores de  $Y_{P/B}$  (Figura 1). Os valores de  $Y_{P/B}$  para esse fungo variaram de acordo os FN testados, sendo os menores obtidos quando o isolado fúngico foi crescido na presença de crandalita (Figura 1).

Os valores de  $Y_{AT/B}$  foram, também, maiores para *A. niger* FS1 do que para *P. islandicum* FS41 (Figura 1). Os maiores valores de  $Y_{AT/B}$  foram obtidos quando *A. niger* FS1 foi crescido na presença de crandalita (Figura 1). Ressalte-se, no entanto, que a presença dessa fonte de P não promoveu maiores valores de  $Y_{P/B}$ . Os FN não afetaram a  $Y_{AT/B}$  nos tratamentos com inoculação de *P. islandicum* FS41 (Figura 1).

## **6.2. Solubilização de fosfato de rocha de Araxá e Catalão por meio da combinação de diferentes ácidos orgânicos**

Não houve interação significativa entre o ácido oxálico e os ácidos cítrico e málico na solubilização dos FN de Araxá e Catalão (Figura 2). O ácido oxálico foi o agente solubilizador mais eficiente, levando à liberação máxima de P na menor concentração testada [25 mmol L<sup>-1</sup>] (Figura 2). Observou-se efeito positivo da interação entre os ácidos cítrico e málico na solubilização de P para os dois FN (Figura 2). Os três ácidos testados foram capazes de promover a solubilização dos fosfatos de Araxá e Catalão quando presentes sozinhos no meio (Figura 2).

Para o FN de Araxá, observaram-se interações significativas entre as concentrações dos ácidos orgânicos, em diferentes combinações, e o pH do meio (Figura 3). Em geral, o aumento das concentrações dos ácidos orgânicos resultou em diminuição do pH do meio de solubilização (Figura 3). No entanto, nas concentrações mais elevadas de ácido oxálico e ácido cítrico, observou-se tendência

de aumento do pH com as concentrações crescentes do outro ácido usado na formulação das combinações (Figura 3).

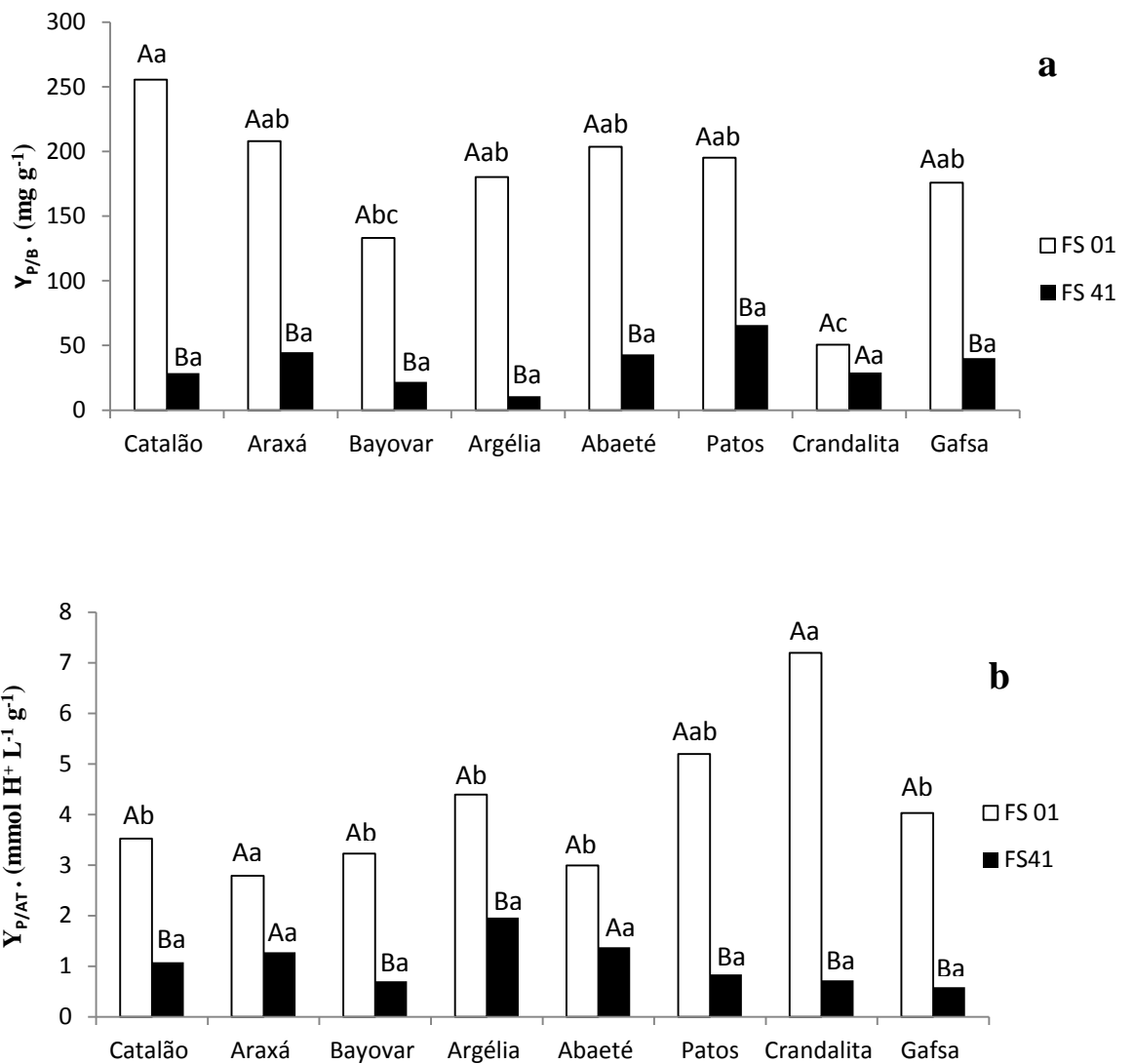
Para o FN de Catalão, não foram observadas interações significativas entre os ácidos oxálico e cítrico e entre os ácido cítrico e málico (Figura 3). Doses crescentes de ácido oxálico levaram à diminuição do pH do meio. Já na combinação dos ácidos cítrico e málico, o pH não variou significativamente, apresentando média de 2,8 (Figura 3). Na interação entres os ácidos oxálico e málico, o aumento das concentrações dos ácidos orgânicos resultou em diminuição do pH do meio de solubilização, com comportamento semelhante ao observado para as interações entre os ácidos orgânicos nos tratamentos com fosfato de Araxá (Figura 3).



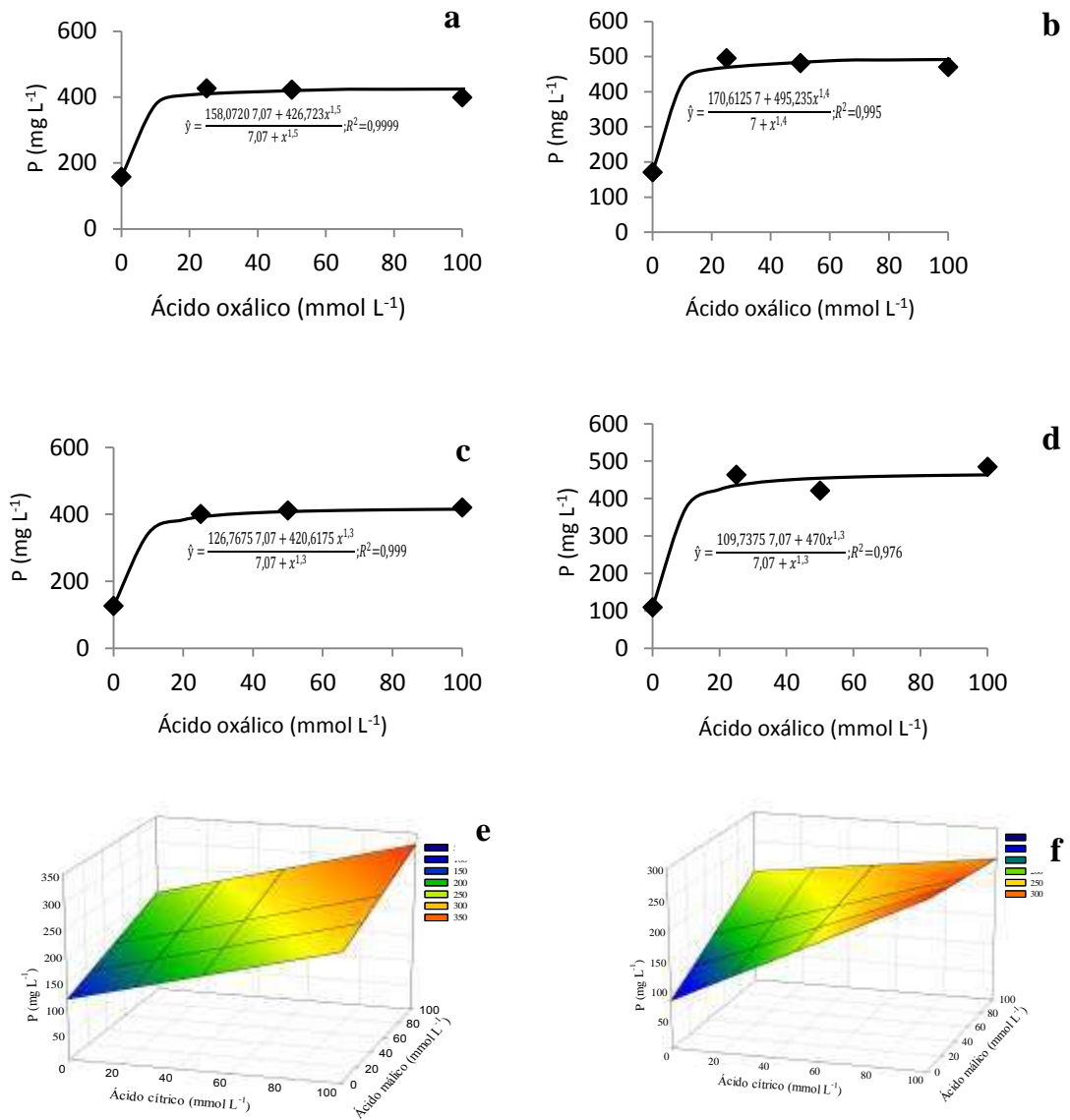
**Tabela 5.** Sacarose consumida e residual e biomassa fúngica, após incubação com *Aspergillus niger* FS1 e *Penicillium islandicum* FS41 durante 5 dias a 30 °C e 160 rpm em meio Strasser (1994) contendo 0,2921 mol L<sup>-1</sup> do açúcar

<b>Microrganismo</b>	<b>Sacarose consumida</b>	<b>Sacarose residual</b>	<b>Biomassa fúngica</b>
	----- mol L <sup>-1</sup> -----	-----	--- g ---
FS 1	0.10b	0.20a	1,41a
FS 41	0.18a	0.11b	1,36a

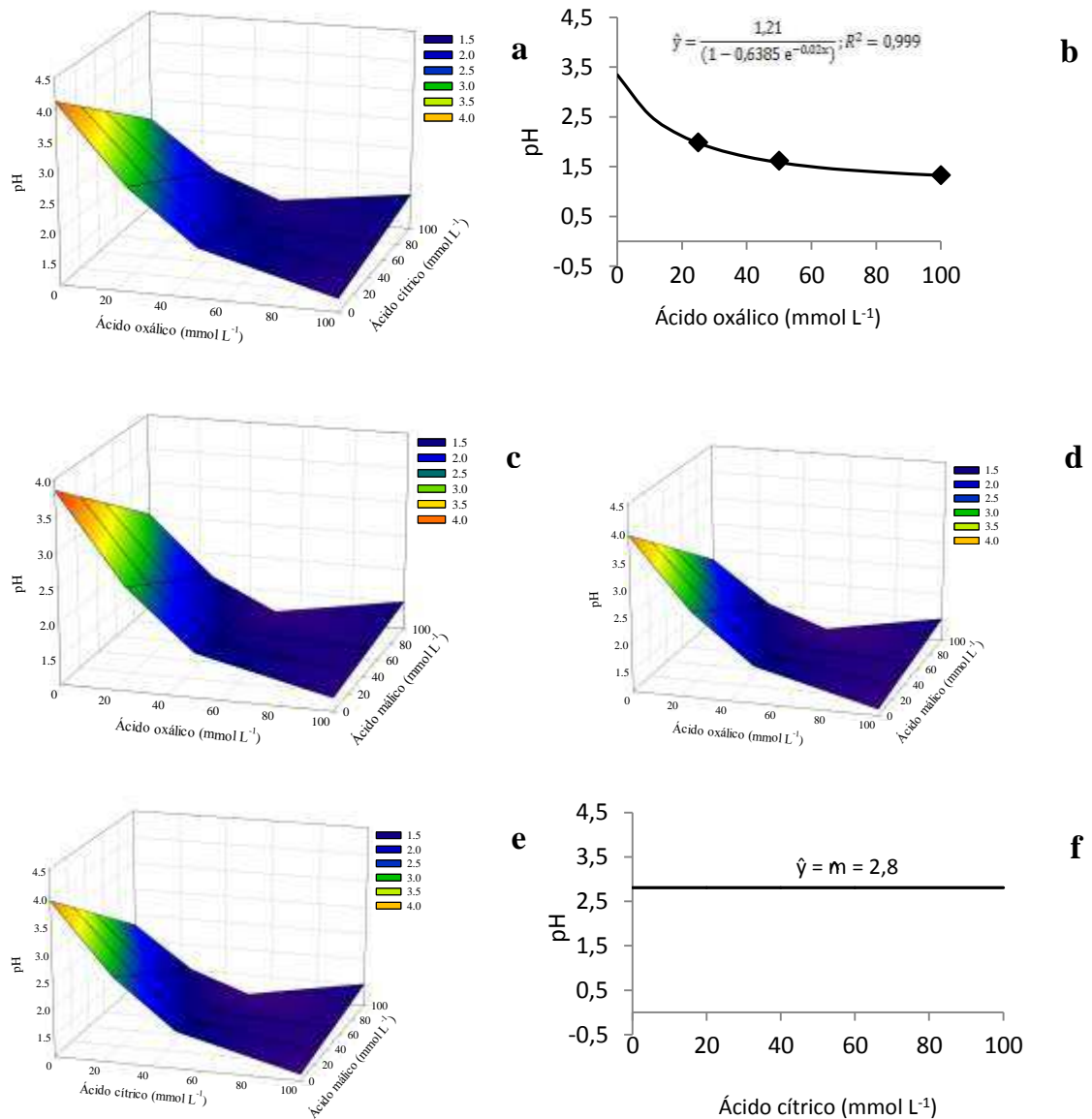
Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem pelo teste F a 5%; FS1= *Aspergillus niger*; FS41= *Penicillium islandicum*.



**Figura 1.** (a) Eficiência de solubilização por grama de biomassa ( $Y_{P/B}$ ,  $\text{mg g}^{-1}$ ) e (b) eficiência de produção de acidez por grama de biomassa ( $Y_{AT/B}$ ,  $\text{mmol H}^+ \text{L}^{-1} \text{g}^{-1}$ ), após incubação de *Aspergillus niger* FS1 e *Penicillium islandicum* FS41 em meio Strasser suplementado com diferentes fosfatos de rocha (3 g/L) durante 5 dias a 30 °C e 160 rpm. <sup>1</sup> Letras minúsculas comparam fosfatos e maiúsculas comparam fungos pelo teste de Tukey a  $p < 0,05$ .



**Figura 2.** P solubilizado a partir de fosfato de Araxá (**a, c, e**) e fosfato de Catalão (**b, d, f**) após incubação em meio NBRIP (Nautiyal, 1999) suplementado com diferentes combinações de ácido oxálico, cítrico e málico durante 7 dias a 30 °C e 120 rpm. (**a e b**) Ácido oxálico (AO) x ácido cítrico (AC). (**c e d**) Ácido oxálico (AO) x ácido málico (AM). (**e e f**) Ácido cítrico (AC) x ácido málico (AM).  $\hat{y}_{Araxá} = 117,4387 + 117,4387^{**}AC + 0,8133^{*}AM$ ;  $R^2 = 0,6472$ ;  $\hat{y}_{Catalão} = 82,514400 + 2,010459^{**}AC + 1,1408^{*}AM - 0,014914^{*}ACAM$ ;  $R^2 = 0,7053$ .



**Figura 3.** pH do sobrenadante do meio de solubilização de fosfato de Araxá (a, c, e) e fosfato de Catalão (b, d, f) após incubação em meio NBRIP (Nautiyal, 1999) suplementado com diferentes combinações de ácido oxálico, cítrico e málico durante 7 dias a 30 °C e 120 rpm. (a e b) Ácido oxálico (AO) x ácido cítrico (AC). (c e d) Ácido oxálico (AO) x ácido málico (AM). (e e f) Ácido cítrico (AC) x ácido málico (AM).

$$\hat{y}_{Araxá} = 4,112 - 0,05899**AO - 1,470 \cdot 10^{-2}**AC + 3,111 \cdot 10^{-4} * AO^2 + 1,845 \cdot 10^{-4} AC^2; R^2 = 0,784 \quad ;$$

$$\hat{y}_{Araxá} = 2,9140 - 0,0588**AO - 0,0133* AM + 0,0003**AO^2 + 0,0002 AM^2; R^2 = 0,8473 \quad ; \quad \hat{y}_{Catalão} =$$

$$3,9438455 - 0,0589849 ** AO - 0,0164640 * AM + 0,0003176 AO^2 + 0,0001948 AM^2; R^2 =$$

$$0,7587; \hat{y}_{Araxá} = 3,850 - 0,01496*AC - 0,01463*AM + 0,0002 AM^2; R^2 = 0,5125.$$

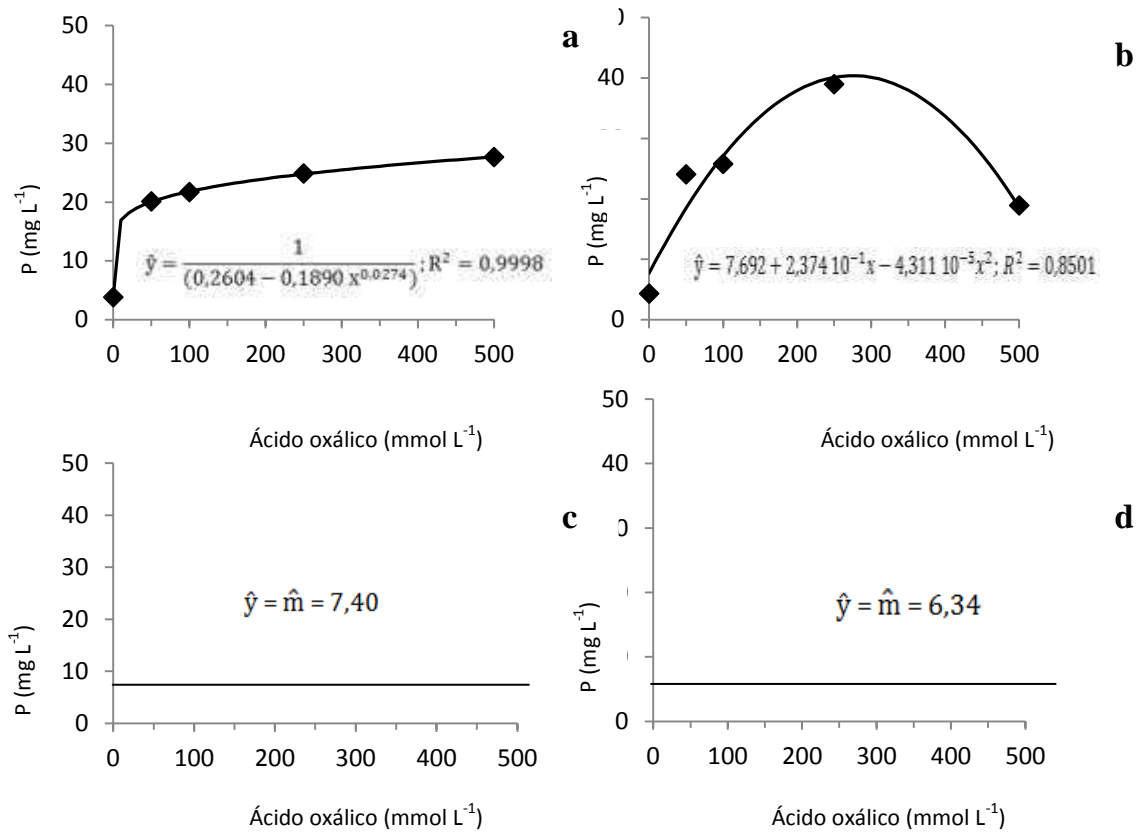
### **6.3. Solubilização de P a partir de fração do solo < 75 µm por meio de ácidos orgânicos**

O ácido oxálico promoveu a liberação de P para o meio a partir da fração < 75 µm do solo de Patos de Minas, tanto para o horizonte A quanto para o B (Figura 4). Para o horizonte A, notou-se tendência de estabilização do P solúvel a partir da concentração de 50 mmol L<sup>-1</sup> do ácido (Figura 4), atingindo valor máximo de 27,64 mg L<sup>-1</sup>, valor sete vezes maior do que no tratamento sem o ácido. Já para o horizonte B, verificou-se comportamento quadrático do P solúvel em função do aumento da concentração de ácido oxálico, com máximo de 38,96 mg L<sup>-1</sup>, quantidade nove vezes maior do que na ausência desse composto.

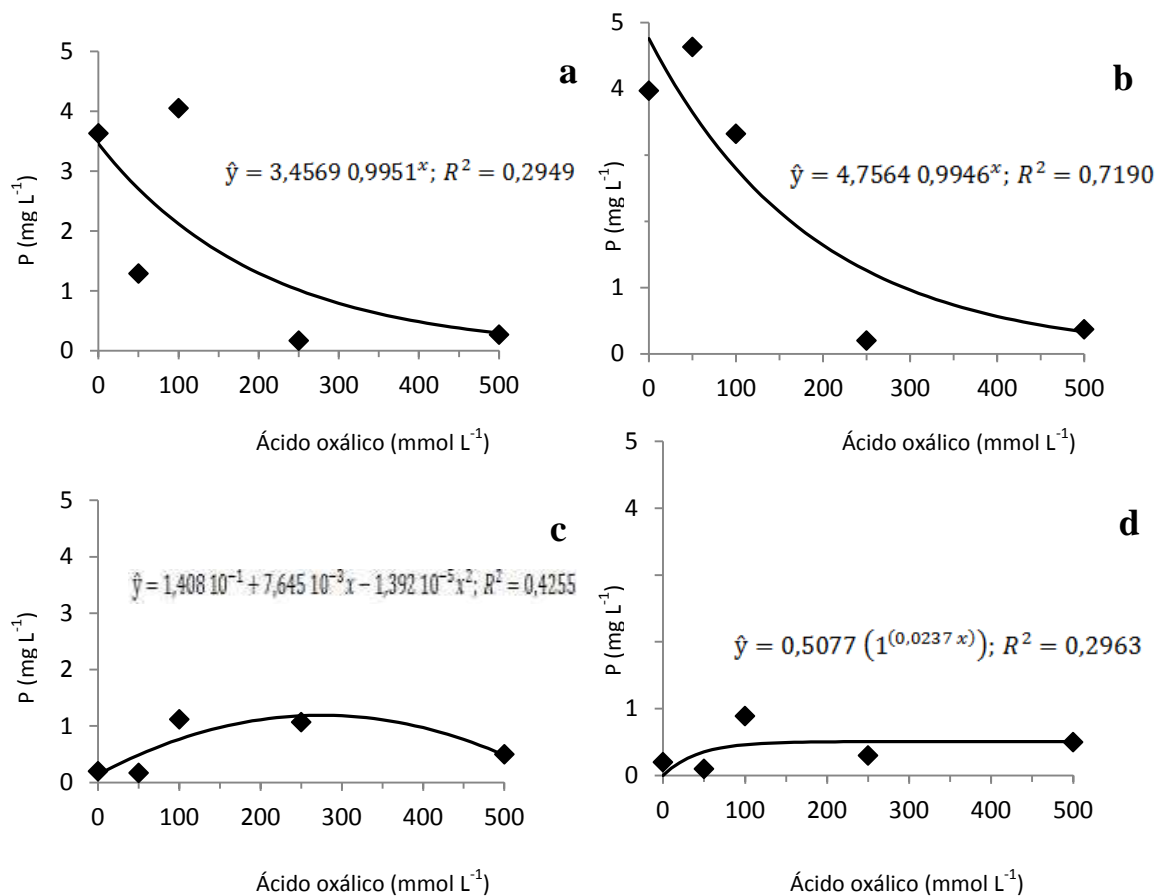
Para o solo TG, para ambos os horizontes, os aumentos na concentração de ácido oxálico no meio não levaram a aumentos na concentração de P solúvel (Figura 4). Para o horizonte A, a média de P solúvel obtida foi de 7,40 mg L<sup>-1</sup> e para o horizonte B, 6,34 mg L<sup>-1</sup>.

A incubação do solo de Patos de Minas na presença de concentrações crescentes de ácido cítrico levou à redução das concentrações de P solúvel no meio para ambos os horizontes (Figura 5). Para o solo TG, as quantidades de P solúvel no meio foram pequenas: para o horizonte A, 0,61 mg L<sup>-1</sup>; e para o horizonte B, 0,40 mg L<sup>-1</sup>.

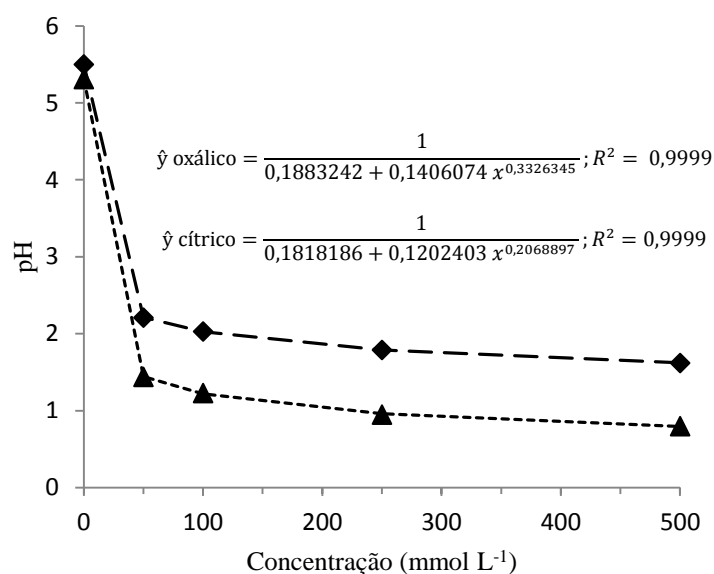
A incubação dos solos na presença dos ácidos oxálico e cítrico causaram a redução do pH do meio, não havendo interações significativas entre tipos de solo e horizontes (Figura 6). O ácido oxálico foi mais eficiente em reduzir o pH do meio, com valores finais inferiores a 1,0 (Figura 6). O abaixamento do pH do solo foi mais intenso até a concentração de 50 mmol L<sup>-1</sup> de ácido oxálico e ácido cítrico. A partir dessa concentração, a redução do pH foi menos abrupta, com tendência à estabilização dos valores de pH (Figura 6).



**Figura 4.** Concentração de P solúvel no meio NBRIP (Nautiyal, 1999) suplementado com ácido oxálico e com fração de granulometria <75 µm dos horizontes A (**a**) e B (**b**) do “Latossolo de Patos de Minas” e do horizonte A (**c**) e B (**d**) do “Latossolo TG”, após incubação por 7 dias a 30 °C e 160 rpm



**Figura 5.** Concentração de P solúvel no meio NBRIP (Nautiyal, 1999) suplementado com ácido cítrico e com fração de granulometria <75  $\mu\text{m}$  dos horizontes A (a) e B (b) do “Latossolo de Patos de Minas” e do horizonte A (c) e B (d) do “Latossolo TG”, após incubação por 7 dias a 30 °C e 160 rpm



**Figura 6.** Modelos gerais representando a variação do pH final do meio NBRIP após 7 dias de incubação a 30 °C e 160 rpm da fração <75 µm dos horizontes A e B do “Latossolo de Patos de Minas” do “Latossolo TG” na presença de ácido cítrico (◆) e ácido oxálico (▲).<sup>1</sup> O teste de identidade de modelos indicou efeito principal somente dos ácidos.

## 7. DISCUSSÃO

No presente trabalho, *A. niger* FS1 foi o isolado mais eficiente em solubilizar a maioria dos fosfatos de rocha testados. Esses resultados corroboram o potencial desse fungo de ser utilizado em sistemas microbianos de solubilização de fosfatos já relatado na literatura (Mendes et al., 2013 a e b). Embora, *P. islandicum* FS41 tenha elevada capacidade de produção de ácido oxálico no meio utilizado (dados não publicados), o desempenho desse isolado foi inferior quando na presença dos FN. A presença de elemento tóxicos, a exemplo do flúor (Mendes et al., 2014) pode ter contribuído para a menor produção de ácido cítrico e oxálico por esse isolado. Adicionalmente, variações no conteúdo de P, de outros elementos químicos e na mineralogia dos FN (Tabela 1) devem ter influenciado a produção de ácidos orgânicos por ambos os isolados, bem como a solubilização dessas fontes de P.

Apesar de serem materiais de origem ígnea, os fosfatos Araxá, Catalão e Abaeté, nos tratamentos com *A. niger* FS1, e o de Patos de Minas, para aqueles com



*P. islandicum* FS 41, destacaram-se em função da porcentagem de P solubilizado. Esses materiais são denominados fosfatos “duros” e possuem estrutura compacta, com pouca área superficial e baixa reatividade (Kaminski, 1997; Novais e Smith, 1999). No entanto, a eficiência dos FN não é medida somente pela sua reatividade, mas também pelo tamanho das partículas, pH e teor de Ca e P. Quanto menor o tamanho da partícula, maior será a superfície de contato e maior será a liberação de fósforo (Horowitz e Meurer, 2003). Dessa forma, a moagem prévia realizada nos fosfatos deve ter facilitado o processo de solubilização microbiana. Os fosfatos de origem sedimentar Gafsa, Argélia e Bayovar, denominados fosfatos “moles”, possuem alto grau de substituição isomórfica de fosfato por carbonato, resultando em cristais imperfeitos, com grande porosidade, grande área superficial e alta reatividade (Kaminski, 1997). Logo, era esperada a maior porcentagem de solubilização do P para esses materiais, o que se concretizou somente para o fosfato Bayovar. Já Gafsa e Argélia apresentaram solubilização intermediária. A presença de diferentes minerais na estrutura cristalina da rocha, podem explicar os resultados encontrados.

*A. niger* FS 1 produziu elevadas quantidades de ácido oxálico na presença de crandalita. Essa fonte de P foi a menos solubilizada. Essa recalcitrância à solubilização microbiana já foi relatada na literatura (Silva et al., 2014). Possivelmente, a menor solubilidade desse material, que resulta na menor liberação de elementos tóxicos, em especial o Al, presente na estrutura do mineral (Francisco, 2006), deve ter contribuído para a menor inibição da oxaloacetato hidrolase (OAH; EC 3.7.1.1) de *A.niger*, enzima responsável pela produção de ácido oxálico nessa espécie fúngica (Kobayashi et al., 2014). A aplicação de crandalita, que é um tipo de fosfato aluminado calcinado, não tem sido encorajada em função da baixa solubilidade desse material em água, sendo necessário tratamento que anteceda seu uso, tal como a calcinação (Francisco, 2006). Embora a crandalita tenha sido a fonte de P mais recalcitrante à solubilização microbiana no presente trabalho, as porcentagens de solubilização desse material variaram de 42 a 50%, a depender do isolado fúngico. Esses resultados sugerem grande potencial de utilização da solubilização microbiana como tratamento prévio ao uso da crandalita alternativamente à calcinação.

Foram observadas correlações negativas entre fósforo solúvel e o pH final do meio, e positiva, entre P solúvel e acidez titulável, indicando que a acidificação via extrusão de  $H^+$  e a complexação por ácidos orgânicos foram os principais

mecanismos de solubilização de P. Essas estratégias de solubilização microbiana já foram relatadas em outros trabalhos (Illmer e Schinner, 1995; Mendes et al., 2013a). No entanto, não foram observadas correlações positivas significativas entre P solúvel e as concentrações finais de ácido oxálico (0,11ns) e ácido cítrico (0,34 ns) no meio de cultura. Esses dados estão em desacordo com outros relatos da literatura nos quais o meio de cultivo utilizado foi o NBRIP (Nautiyal, 1999, Mendes et al, 2013a; Silva et al, 2014). No presente trabalho, utilizou-se o meio otimizado por Strasser (1994) para a produção de ácido oxálico. *A. niger* FS1 e *P. islandicum* FS41 não diferiram na produção de ácido oxálico e ácido cítrico, exceto na presença de crandalita e Gafsa. No entanto, os valores de P solúvel nos tratamentos com *A. niger* FS1 foram sempre superiores na presença de todos os FN, exceto crandalita. O pH médio final nos meios inoculados com *A. niger* FS1 foi de 3,3 e com *P. islandicum* FS41, 4,9. Esses dados indicam que a acidificação do meio via extrusão de H<sup>+</sup> foi fator importante para a solubilização dos FN. Adicionalmente, a correlação positiva entre P solúvel e acidez titulável, indicam que outros metabólitos ácidos diferentes dos ácidos oxálico e cítrico, podem ter contribuído para a solubilização dos FN no meio de Strasser (1994).

A eficiência de *A. niger* FS1 em solubilizar os FN testados foi corroborada pelo menor consumo de sacarose, com produção de biomassa semelhante à de *P. islandicum* FS 41, e pelos maiores valores de Y<sub>P/B</sub> e Y<sub>AT/B</sub>. De forma geral, *A. niger* FS1 foi capaz de direcionar mais carbono para a produção de ácidos por unidade de biomassa, uma característica importante para os sistemas de solubilização microbiana de fosfatos (Vassilev et al., 2013; Mendes et al. 2013a; Silva et al., 2014).

O ácido oxálico foi o composto mais eficiente na solubilização dos fosfatos de Araxá e Catalão. Já as combinações de ácidos que mostraram efeito sinérgico foram aquelas constituídas dos ácidos cítrico e málico. No entanto, os níveis de P solúvel foram significativamente inferiores àqueles obtidos com ácido oxálico.

A maior eficiência do ácido oxálico pode estar associada à proximidade dos grupos carboxil, responsável pelo aumento da habilidade de quelação, além desse composto possuir alta tendência de se precipitar com Ca<sup>2+</sup>, com a subsequente liberação do P associado a esse elemento na matriz mineral (Razzaghe-Karimi e Robert, 1975). A eficiência da interação entre ácidos está relacionada ao pH (Figuras 3 e 4). A maior eficiência de solubilização ocorre a valores de pH do meio próximos

ao pKa do composto (Jones et al., 2003). Os valores de pKa, a 25 °C, para cada grupo carboxílico do ácido cítrico são 3,14; 4,77 e 6,39; para os do ácido oxálico, 1,25 e 4,27; já para os do ácido málico, 3,46 e 5,09.

Nas combinações que continham concentrações crescentes de ácido oxálico, o pH atingiu valores abaixo do pKa dos ácidos cítrico e málico (Figura 4), reduzindo a dissociação desses ácidos. Possivelmente, esses compostos permaneceram em grande parte na forma não dissociada e, portanto, não atuaram efetivamente no processo de solubilização dos fosfatos de Araxá e Catalão. Em contrapartida, o pH permaneceu acima dos valores de pKa do ácido oxálico, favorecendo sua dissociação até alcançar o equilíbrio químico, que ocorre quando o pH se torna igual ao pKa. Ao realizar a combinação de ácidos com pKa próximos, cítrico e málico, observou-se que o pH permaneceu próximo ao pKa desses compostos, promovendo a dissociação de ambos os ácidos. Logo a utilização de ácidos de pKa equivalentes levou ao sinergismo entre os mesmos, com o consequente aumentando da concentração de P solúvel ao final da incubação. Conclui-se que as combinações de ácidos orgânicos no processo de solubilização de FN devem, portanto, ser realizadas levando-se em conta as características químicas desses compostos, em especial os valores de pKa dos grupos carboxílicos. No solo, a eficácia desses compostos irá depender dos valores de pH, bem como da capacidade tampicante do solo.

A incubação dos dois latossolos na presença de ácido oxálico ou cítrico resultaram na liberação de P de formas distintas. Em geral, o ácido oxálico foi mais eficiente em liberar P da fração < 75 µm do latossolo de Patos de Minas. Possivelmente, a eficiência de solubilização de P desse composto deve ter sido influenciada pelas características físico-químicas e mineralógicas do solo, não sendo possível, no presente trabalho, determinar se o P solubilizado tem origem de reservatórios orgânicos ou inorgânicos. No entanto, este é o primeiro relato da liberação de P a partir do solo pelo tratamento com ácido oxálico, indicando o potencial desse metabólito microbiano em melhorar a disponibilidade de P no solo. A mineralização microbiana de P a partir de reservatórios orgânicos pode ser descartada uma vez que as alíquotas de solo nos frascos Erlenmeyer foram autoclavadas juntamente com o meio de cultura.

O ácido cítrico levou à solubilização de P nos Latossolo TG, embora em níveis muito baixos. No Latossolo de Patos de Minas, o ácido cítrico diminuiu o P solúvel do meio. Os óxidos de ferro e alumínio são minerais anfóteros, gerando

cargas elétricas negativas quando os valores de pH superam o ponto de carga zero (PCZ) e cargas positivas quando os valores de pH são menores que o PCZ. O Latossolo de Patos de Minas apresenta elevados teores de gibbsita (Ferreira et al., 1999), uma das formas minerais do hidróxido de alumínio, e apresenta PCZ entre 7,5 e 9,5 (Parfitt, 1980). A diminuição de pH ocasionada pela incubação com ácido cítrico pode promover formação de cargas positivas nos minerais de argila e levar à adsorção do P. Esse efeito não foi observado no latossolo TG possivelmente pelo fato de ser mais rico em caulinita, um argilo mineral de alumínio hidratado que possui PCZ em torno de 4 (Sposito et al., 1989; Ferreira et al., 1999).

Este trabalho demonstrou que uma ampla diversidade de fosfatos naturais de origem ígnea e sedimentar são passíveis de sofrerem solubilização microbiana. Comparado ao ácido cítrico, o ácido oxálico foi o metabólito microbiano mais eficiente em solubilizar a maioria das fontes de P testadas, bem como aquelas nativas de um dos solos testados. Assim, o uso de micro-organismos e de seus metabólitos na disponibilização de P a partir de fontes pouco solúveis pode contribuir significativamente para a realização de práticas agrícolas menos custosas do ponto de vista econômico e ambiental.

## 8. CONCLUSÕES

*A. niger* FS1 é o isolado mais eficiente em solubilizar as diferentes fontes de P testadas.

Crandalita é a fonte de P menos susceptível à solubilização microbiana. Ainda assim, esse processo tem grande potencial de utilização no tratamento desse fosfato aluminado calcinado previamente à sua aplicação na agricultura.

O ácido oxálico é o metabólito fúngico mais eficiente em promover a solubilização dos fosfatos de Araxá e Catalão.

O ácido oxálico promove a solubilização de P a partir da fração granulométrica de < 75 µm do Latossolo de Patos de Minas. A eficácia do ácido oxálico em solubilizar P é dependente do tipo de solo.

Este é o primeiro relato da solubilização de P efetuada por ácido oxálico a partir de uma fração granulométrica do solo e evidencia o potencial de uso de fungos e de seus metabólitos nos processos de solubilização microbiana de variada gama de fosfatos naturais ou de reservatórios de P pouco solúveis do solo.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEHERA B.C.; SINGDEVSACHAN S.K.; MISHRA R.R.; DUTTA S.K.; THATOI H.N. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3(2): 97-110, 2014.
- BRAGA J.M.; DEFELIPO B.V. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solo e material vegetal. *Revista Ceres* 21: 73-85, 1974.
- CHUANG C.C.; KUO Y.L.; CHAO C C.; CHAO W.L. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biology and Fertility of Soils* 43(5): 575-584, 2007
- CORRÊA R.M.; NASCIMENTO C.W.A.D.; SOUZA S.K.D.S.; FREIRE F.J.; SILVA G.B.D. Gafsa rock phosphate and triple superphosphate for dry matter production and P uptake by corn. *Scientia Agricola* 62(2): 159-164, 2005.
- CRUZ C.D. Programa GENES: Aplicativo Computacional em Estatística Aplicada à Genética (GENES - Software for Experimental Statistics in Genetics). *Genet. Mol. Biol* 21(1), 1998.
- FERREIRA E.B.; CAVALCANTI P.P.; NOGUEIRA D.A. ExpDes: Experimental Designs pacakge. R package version 1.1.2., 2013.
- FERREIRA M.M.; FERNANDES B.; CURI, N. Influência da mineralogia da fração argila nas propriedades físicas de Latossolos da região sudeste do Brasil. *Bras. Ci. Solo* 23(3): 515-524, 1999.
- FRANCISCO E. A. B. 2006. 146f. Fosfatos aluminosos do grupo da crandallita como fonte alternativa de fósforo para a cultura do arroz (Doctoral dissertation, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"). 2006
- GUERRA J.G.M.; DE ALMEIDA D.L.; DE ARAÚJO SANTOS G.; FERNANDES M.S. Conteúdo de fósforo orgânico em amostras de solo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 31(4): 291-299, 1996.
- GYANESHWAR P.; KUMAR G.N.; PAREKH L.J.; POOLE P.S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Food Security in Nutrient-Stressed Environments: Exploiting Plants' Genetic Capabilities*. Springer Netherlands 133-143, 2002.
- HOROWITZ N.; MEURER E. J. Eficiência de dois fosfatos naturais farelados em função do tamanho da partícula. *Ciência rural. Santa Maria* 33(1): 41-47, 2003.
- ILLMER P; SCHINNER F. Solubilization of inorganic calcium phosphates—solubilization mechanisms. *Soil Biol Biochem* 27(3):257–263, 1995.

- JONES D.L.; DENNIS P.G.; OWEN A.G., & VAN HEES, P. A. W. Organic acid behavior in soils–misconceptions and knowledge gaps. *Plant and Soil* 248(1-2): 31-41, 2003.
- KAMINSKI, J. Eficácia de fosfatos naturais reativos em sistemas de cultivo. *Núcleo Regional Sul da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo*, 1997.
- KPOMBLEKOU-A K; TABATABAI M.A. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Science* 158(6):442–453, 1994.
- LUKOWIAK R.; GRZEBISZ W.; SASSENATH G.F. New insights into phosphorus management in agriculture-A crop rotation approach. *Science of The Total Environment* 542: 1062-1077, 2016.
- MARSCHNER H. Mineral nutrition of higher plants. *New York: Academic Press* 889, 1995.
- MENDES G.O.; DIAS C.S.; SILVA I.R.; JÚNIOR J.I.R.; PEREIRA O.L.; COSTA M.D. Fungal rock phosphate solubilization using sugarcane bagasse. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29(1): 43-50, 2013 a.
- MENDES G.O.; FREITAS A.L.M.; PEREIRA O.L.; DA SILVA I.R.; VASSILEV N.B.; COSTA M.D. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Annals of Microbiology* 64 (1): 239-249, 2014.
- MENDES G.O.; VASSILEV N.B.; BONDUKI V.H.A.; DA SILVA I.R.; RIBEIRO J.I.; COSTA M.D. Inhibition of *Aspergillus niger* phosphate solubilization by fluoride released from rock phosphate. *Applied and environmental microbiology* 79(16): 4906-4913, 2013 b.
- MENDES I.D.C.; REIS JUNIOR F.B. Microrganismos e disponibilidade de fósforo (P) nos solos: uma análise crítica. *Embrapa Cerrados. Documentos*, 2003.
- MENOSSE O.G.; COSTA J.A.; ANGHINONI I.; BOHNEN, H. Crescimento radicular e produção de ácidos orgânicos em cultivares de soja com diferentes tolerâncias ao alumínio. *Pesq. Agrop. Bras* 36: 1339-1345, 2001.
- NAUTIYAL C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170(1): 265-270, 1999.
- NOVAIS R.F; SMITH T.J. Fósforo em solo e planta em condições tropicais, 1st edn. Editora UFV, Viçosa, 1999.
- OMAR S.A. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular–arbusular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14(2): 211-218, 1997.

- PARFITT R.L. Chemical properties of variable charge soils. In: THENG, B.K.G. *Soils with variable charge*. Palmerston North : New Zealand Society of Soil Science 167-194, 1980.
- PÉREZ-MONTAÑO F.; ALÍAS-VILLEGAS C.; BELLOGÍN R.A.; DEL CERRO P.; ESPUNY M.R.; JIMÉNEZ-GUERRERO I.; LÓPEZ-BAENA F.J.; OLERO F.J.; CUBO T. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiological research* 169(5): 325-336, 2014.
- RAIJ, B.V. Fertilidade do solo e adubação. *Ceres*, 1991.
- RAZZAGHE-KARIMI M.; ROBERT M. Altération des micas et géochimie de l'aluminium: rôle de la configuration de la molécule organique sur l'aptitude á la complexation. *CR AcSc Paris* 280: 2.645-642.648, 1975.
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014. URL <http://www.R-project.org/>.
- REYES I.; BERNIER L.; SIMARD R.R.; ANTOUN H. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiology Ecology* 28(3): 281-290, 1999.
- REGAZZI A.J.; SILVA C.H.O. Teste para verificar a igualdade de parâmetros e a identidade de modelos de regressão não-linear. I. Dados no delineamento inteiramente casualizado. *Revista de Matemática e Estatística* 22(3): 33-45, 2004.
- SPOSITO, G. The chemistry of soils. New York, Oxford University Press, 277p, 1989.
- STRASSER H.; BURGSTALLER W.; SCHINNER F. High-yield production of oxalic acid for metal leaching processes by *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiology Letters* 119(3): 365-370, 1994.
- VASSILEV N.; MENDES G.; COSTA M.; VASSILEVA M. Biotechnological tools for enhancing microbial solubilization of insoluble inorganic phosphates. *Geomicrobiology Journal* 31(9): 751-763, 2014.
- VESSEY J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255(2): 571-586, 2003.
- WANG E.; BELL M.; LUO Z.; MOODY P.; PROBERT M.E. Modelling crop response to phosphorus inputs and phosphorus use efficiency in a crop rotation. *Field Crops Research* 155: 120-132, 2014.