

## Influência da Concentração de Rocha Fosfática e Inóculo na Biossolubilização de Fosfato

Bruna V. Cabral<sup>1</sup>, Taciana S. Carmo<sup>2</sup>, Larissa. N. S. S. Falleiros<sup>2</sup>, Larissa R. Anjos<sup>1</sup>, Vicelma.L. Cardoso<sup>2</sup> e Eloízio. J. Ribeiro<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Departamento de Engenharia Ambiental

<sup>2</sup> Universidade Federal de Uberlândia, Departamento de Engenharia Química

E-mail para contato: brucecabral@yahoo.com.br

**RESUMO** – O uso excessivo de fertilizantes químicos na agricultura ocasiona problemas ambientais, como o empobrecimento do solo devido à redução da microflora natural tornando efetiva a aplicação de biofertilizantes, os quais são micro-organismos benéficos que promovem a decomposição de matéria orgânica e secreção de substâncias promotoras do crescimento. O presente trabalho propôs uma possível alternativa ao processamento químico tradicional, pela utilização de micro-organismos fúngicos excretadores de ácidos orgânicos que aumentam a concentração de fósforo em solução. Utilizou-se o concentrado fosfático ultrafino (35,7% de  $P_2O_5$ ) e um total de 16 micro-organismos. Os isolados fúngicos foram submetidos à classificação quantitativa em meio sintético líquido, para identificação daqueles com maior capacidade de solubilização do fosfato de rocha. Através da cromatografia de íons obteve-se resultados significativos em fosfato para os isolados 8 (617,84 PPM), 5 (494,69 PPM), 1 (728,49 PPM) e 10 (481,86 PPM).

### 1. INTRODUÇÃO

Nas plantas, o fósforo desempenha papel importante na transferência de energia da célula, na respiração e na fotossíntese. As limitações na sua disponibilidade, no início do ciclo vegetativo, podem resultar em restrições ao desenvolvimento, das quais a planta não se recupera posteriormente, mesmo aumentando o suprimento de P a níveis adequados (Grant et al., 2001).

O baixo nível de fósforo, disponível no solo, para a planta é uma condição comum ao redor do mundo. Embora o fósforo total do solo possa ser alto, ele é ligado firmemente a componentes orgânicos e inorgânicos do solo e está indisponível para a absorção por meio das raízes. As plantas, porém, desenvolveram muitas estratégias para ganhar acesso ao fósforo fixado. Estas estratégias incluem associação com fungos micorrízicos, que colonizam as raízes das plantas e desenvolvem hifas que se difundem no solo, aumentando a absorção de fósforo pela raiz (Blevins, 1999).

Algumas plantas secretam ácidos orgânicos, como ácido cítrico e ácido málico, que formam complexos com alumínio e ferro, liberando o fósforo para absorção pelas raízes. As raízes também podem secretar enzimas especiais, como fosfatases, que quebram as formas orgânicas de fósforo no solo e o torna disponível para absorção por meio das raízes da planta.

Algumas plantas desenvolveram arquitetura de raiz diferenciada que as ajudam na interceptação do fósforo do solo pelas raízes. Estas estratégias são algumas das técnicas de

sobrevivência das plantas, que ocorrem sob condições de estresse (Blevins, 1999). Um crescente interesse tem surgido em relação à importância da diversidade microbiana edáfica, já que os microrganismos desempenham papel fundamental na manutenção da qualidade do solo (Garbeva et al., 2004).

Uma parcela importante da comunidade microbiana edáfica possui a habilidade de mineralizar fosfatos orgânicos e solubilizar fosfatos inorgânicos, permitindo a liberação de fósforo assimilável pelas plantas (Silva Filho, 1998). Tais micro-organismos apresentam potencial de utilização como inoculante, já que podem maximizar o desenvolvimento vegetal (Sahinet al., 2004, Souchiet al., 2006). Segundo Silva Filho (1998), a população de microrganismos solubilizadores de fosfatos existentes nos solos está entre  $10^4$  e  $10^7$  g<sup>-1</sup> de solo, variando conforme o local e o método de avaliação.

Dentre os microrganismos do solo, os solubilizadores de fosfatos inorgânicos desempenham importante papel no suprimento de fósforo para as plantas (Silva Filho; Vidor, 2001), apresentando potencial de uso na forma de inoculante (Silva Filho et al., 2002, Souchiet al., 2006). Diversos autores (Omar, 1998, Kim et al., 1997) relatam que a solubilização de fosfatos é correlacionada com a habilidade de produção de ácidos orgânicos e/ou polissacarídeos extracelulares pelos microrganismos. Por exemplo, Reyes et al. (1999) encontraram correlação positiva entre a solubilização mineral de fosfato por *Penicillium rugulosum* e a produção de ácido glucônico ou cítrico.

A presença destes microrganismos tem sido constatada na maioria dos solos (Jones et al., 1991, Nahaset al., 1994b), sendo uma parcela importante desta comunidade microbiana hábil em mineralizar fosfatos orgânicos e solubilizar fosfatos inorgânicos, liberando fósforo assimilável para as plantas (Silva Filho, 1998), maximizando o desenvolvimento vegetal (Sahinet al., 2004). Entre as populações fúngicas com potencial para solubilização destacam-se os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (Silva Filho et al., 2002). Investigando alternativas para a obtenção de fósforo solúvel, Nahas et al. (1982) demonstraram a possibilidade de produção de 1,2 g/L de fosfato solúvel pela ação de *Aspergillus niger* sobre fluorapatita em meio de vinhaça.

As populações de microrganismos solubilizadores e sua capacidade de solubilização de fosfato têm mostrado estar intimamente relacionadas ao tipo e ao manejo do solo (Nahaset al., 1994b), a espécie e a idade da planta (Odunfa; Oso, 1978), a espécie de micro-organismo, os tipos de fosfato e a fonte de carbono (Silva Filho; Vidor, 2001). O sinergismo entre fungos solubilizadores e micorrízicos na solubilização de fósforo foi relatado por Souchie et al. (2006), os quais concluíram que *Trifolium platense* foi favorecida pela inoculação de *Aspergillus sp.* (PSF7), *Glomus clarum* e *Glomus glosporum*, evidenciando a relação positiva entre esses microrganismos.

O uso desses microrganismos depende do conhecimento de suas características, entre as quais a capacidade de solubilização, é uma das mais importantes no processo de seleção. Ela varia com o microrganismo e as condições do ambiente. Entre os fatores ambientais, o tipo de fosfato e a fonte de carbono estão entre os mais estudados (Silva Filho; Vidor, 2001).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

## 2.1. Materiais

Rocha Fosfática: A rocha fosfática utilizada foi o concentrado fosfático ultrafino (fluorapatita), com teor de 35,7% de  $P_2O_5$ , fornecido pelo Complexo de Mineração de Tapira (Vale/Fosfertil), localizado na região do Alto Paranaíba, situado em Araxá, distante 340 km a oeste de Belo Horizonte, Minas Gerais.

Fungo de trabalho: Os micro-organismos empregados foram coletados em diferentes locais do Complexo de Mineração de Tapira (Vale/Fosfertil), localizado na região do Alto Paranaíba, Minas Gerais.

## 2.2. Métodos

Isolamento e Cultivo: O fungo, inicialmente, foi isolado das amostras coletadas para obtenção de culturas puras. Realizou-se o repique para a manutenção e manipulação dos isolados fúngicos. Para o isolamento e o cultivo os seguintes materiais foram necessários: microscópio estereoscópico (lupa), pinça, bico de bunsen, gás, alça de repicagem, câmara de fluxo laminar e álcool 70%, placas de Petri com meio sintético seletivo sólido, descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Meio sintético-seletivo sólido, (Pikovskaya, 1948)

Componente	Quantidade (g/L)
Dextrose (=D-glicose)	10
Ágar	15
Extrato de Levedura	0,5
Fosfato Tricálcico	5
Sulfato de Magnésio	0,1
Sulfato de Amônio	0,5
Sulfato Ferroso	0,0001
Sulfato de Manganês	0,001
Cloreto de Potássio	0,2

Armazenamento e preservação: As placas de Petri contendo os isolados foram armazenadas em refrigerador a  $\pm 4$  °C. Para garantir a viabilidade das culturas foram realizados cultivos periódicos por meio de repicagens de 3 a 3 meses. Utilizou-se também óleo mineral 40% (glicerol) previamente esterilizado para cobrir totalmente as colônias contidas em eppendorfs. Este procedimento tem como objetivo minimizar ou estagnar a multiplicação do fungo sob o óleo, por reduzir a disponibilidade de oxigênio. Esta técnica, segundo vários estudos, faz com que muitas espécies de fungos permaneçam viáveis por meses ou até mesmo anos de armazenamento. Para reativar o micro-organismo armazenado a 4°C sob óleo mineral, foi necessário repicar o mesmo para placas contendo meio sintético seletivo sólido e esperar a reativação de crescimento da cultura.

Classificação Quantitativa: Os isolados fúngicos foram submetidos à classificação quantitativa, com a finalidade de identificar entre os isolados aqueles com maior capacidade de solubilização do fosfato de rocha em meio líquido. Para realização deste ensaio preparou-se o meio seletivo modificado líquido descrito na Tabela 2. Porções de 100 mL do meio modificado foram distribuídas em erlenmeyers de 500 mL. Os recipientes tampados com rolhas de algodão foram esterilizados. Após esfriamento a temperatura ambiente, foram inoculadas em Erlenmeyers cerca de  $10^6$  esporos dos isolados fúngicos selecionados (Sampaio *et al.*, 2003) sob temperatura ambiente, agitação de 100 RPM e aeração constante durante 7 dias.

Tabela 2 - Meio seletivo modificado líquido (Sampaio *et al.*, 2003).

Componente	Quantidade (g/L)
Dextrose (= D-glicose)	10
Extrato de Levedura	0,5
Rocha fosfática	24
Sulfato de Magnésio	0,1
Sulfato de amônio	0,5
Sulfato ferroso	0,001
Sulfato de manganês	0,001
Cloreto de potássio	0,2

Determinação do fósforo solúvel: O fósforo solúvel foi quantificado nos extratos líquidos (meio líquido) após os ensaios. Neste caso não foi necessário à digestão da amostra, sendo o fósforo solúvel determinado diretamente após filtração da amostra com auxílio de papel de filtro para filtragem rápida, pelo método de cromatografia de íons.

Método Cromatografia de íons: A cromatografia de íons é um membro da grande família de métodos cromatográficos. Basicamente, ela pode ser usada para determinar qualquer íon que carregue uma ou mais cargas. É uma ferramenta analítica baseada em um método físico-químico para separar misturas de substâncias. O efeito de separação é baseado na distribuição entre duas fases: uma fase é estacionária e a segunda é uma fase móvel que flui em uma determinada direção. As técnicas cromatográficas são divididas de acordo com os estados físicos das duas fases mencionadas. Uma adicional diferenciação dos métodos cromatográficos pode ser feita de acordo com os processos básicos que ocorrem durante a separação, tais como adsorção ou distribuição; ou de acordo com o tipo de procedimento utilizado (cromatografia planar ou por coluna). O modelo empregado do cromatógrafo de íons foi o Coluna 6.1006.430 Metrosep A Supp 4. Eluente:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 1,8 mmol/L /  $\text{NaHCO}_3$  a 1,7 mmol/L / + 2% acetona Condutividade após supressão química aprox. 14  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Amostra: Padrão (fluoreto, cloreto, nitrito, brometo, nitrato, fosfato, sulfato) + NaCl (aprox. 5%; m:v) Método exp\_02\_s\_e2.mtw Sistema asupp.smt Fluxo 1,0 mL/min Pressão 5,5 MPa Tempo de análise 20 min Loop 20  $\mu\text{L}$ . Supressor: Agentes de regeneração  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 50 mmol/L e água ultrapura alimentados continuamente com mudança automática dos canais de supressão, regeneração e lavagem.

### 3. RESULTADOS

A partir de testes preliminares para a biossolubilização de fosfato proveniente de rocha com os 16 isolados fúngicos empregando o meio sintético seletivo líquido (Tabela 2), variando a concentração de Rocha Fosfática entre 10, 20 e 30 g/L, obteve-se valores significativos de fosfato solúvel com a utilização dos micro-organismos 8, 5, 1' e 10, através da Cromatografia de íons como apresentado na Tabela 3. Diante deste resultado os mesmos foram selecionados para os testes seguintes.

Tabela 3- Resultados da conversão de fosfato através de cromatografia de íons

Micro-organismo	Rocha Fosfática (g/L)	Fluorapatita (PPM)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (massa em mg em 100mL de meio líquido)	Conversão (%)
8	10	139,64	13,96	3,91
8	20	75,11	7,51	1,05
8	30	64,95	6,49	0,60
5	10	150,54	15,05	4,22
5	20	78,63	7,86	1,11
5	30	43,60	4,36	0,41
1'	10	35,30	3,53	0,99
1'	20	28,88	2,89	1,03
1'	30	163,63	16,36	1,52
10	10	134,84	13,48	3,77
10	20	72,98	7,29	1,02
10	30	37,14	3,71	0,35

Tabela 4 – Resultados de conversão de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> para os micro-organismos 5 e 8

Micro-organismo	Rocha Fosfática (g/L)	Quantidade de Esporos	pH	Fluorapatita (PPM)	Conversão (%)
5	10	2.10 <sup>6</sup>	5,82	65,36	18,56
5	10	3.10 <sup>6</sup>	5,92	84,96	24,13
5	5	2.10 <sup>6</sup>	5,51	90	51,13
5	5	3.10 <sup>6</sup>	5,52	98,72	56,09
8	10	2.10 <sup>6</sup>	6,62	83,04	23,59
8	10	3.10 <sup>6</sup>	6,33	217,28	61,72
8	5	2.10 <sup>6</sup>	5,91	287,68	163,45
8	5	3.10 <sup>6</sup>	5,35	144	81,81

Ao avaliar os valores apresentados de  $P_2O_5$  (PPM) Tabela 3 para os micro-organismos 8, 5, 1' e 10 diante de diferentes concentrações de rocha fosfática, pode-se calcular a redução de  $P_2O_5$  original em  $P_2O_5$  solúvel em meio sintético seletivo líquido. Nota-se que os micro-organismos apresentaram capacidade solubilizadora em meio líquido diante das condições iniciais do mesmo. Sendo que os isolados fúngicos, 1', 5 e 8 apresentaram maior capacidade em transformar o  $P_2O_5$  original presente no concentrado fosfático em  $P_2O_5$  solúvel diante de concentrações de rocha fosfática inferiores. Diante dos resultados obtidos empregando os micro-organismos 5 e 8, os mesmos foram utilizados nos testes subsequentes. Empregou-se o meio seletivo líquido (Tabela 2), em que variou-se a concentração de rocha fosfática no meio entre 5g/L (pH inicial igual a 7,18) e 10g/L (pH inicial igual a 7,27) e a quantidade de micro-organismos utilizada variou entre cerca de  $2.10^6$  e  $3.10^6$  esporos dos isolados fúngicos. A Tabela 4 apresentam os resultados de biossolubilização obtidos. Após 7 dias pode-se notar que o meio tornou-se mais ácido indicando a relação entre a acidez e solubilização de fosfato proveniente de rocha. Ao avaliar a Tabela 4, nota-se que para o micro-organismo 5 ao diminuir a concentração de rocha fosfática e aumentar a quantidade de esporos do micro-organismo observa-se um aumento de três vezes na solubilização de  $P_2O_5$ , acompanhada pelo aumento da acidez do meio líquido. O micro-organismo 8 ao ser empregado apresentou comportamento semelhante aumentando a solubilização de  $P_2O_5$  em meio líquido em aproximadamente 7 vezes em meio líquido para a quantidade de esporos constante e igual a  $2.10^6$  e concentração inferior de rocha fosfática para 5g/L. Ao aumentar a quantidade de esporos e diminuir a concentração de rocha fosfática observa-se que o micro-organismo 8 apresentou um aumento em sua capacidade solubilizadora. Em estudos com *A. niger* e rocha fosfática tem-se alcançado concentrações de P solúveis, que variaram 13-31 mg/L (Abd-Alla; Omar, 2001), 300-400 mg/L (Vassilevet al. 1995 e Vassilevaet al. 1998) e de 219-382 mg/L (Schneider et al., 2010). Sudhakara Reddy et al., (2002) testaram a solubilização de rocha fosfática pela utilização de isolados de *Aspergillustubingensis* e *Aspergillusniger* a partir da rizosfera do solo de plantações de eucalipto em Punjab - Índia. Os autores avaliaram a capacidade de solubilização em meio Pikovskaya (Pikovskaya, 1948) na presença de 2% de rocha fosfática. A redução do pH foi observada para todos os isolados, no entanto, nem uma relação significativa poderia ser estabelecida entre a quantidade de fosfato solubilizado e a queda do pH.

#### 4. CONCLUSÕES

Os micro-organismos coletados no Complexo de Mineração de Tapira apresentaram capacidade de solubilização do fosfato de rocha (apatita) demonstrando serem promissores agentes solubilizadores. Ao avaliar os resultados obtidos de biossolubilização de fosfato inorgânico com a consequente liberação de fósforo assimilável pelas plantas, pode-se concluir que a ação solubilizadora dos micro-organismos selecionados apresentou-se acentuada diante de concentrações de rochas inferiores (10 e 5 g/L) e concentração de micro-organismos em torno de  $3.10^6$  esporos.

#### 5. AGRADECIMENTOS

A Vale/Fosfértil, Complexo de Mineração de Tapira, pela doação do concentrado fosfático e pelo auxílio e permissão da coleta de micro-organismos em todo o complexo. Os autores agradecem à FAPEMIG (Processo PCE-00089-14) pelo apoio concedido.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABD-ALLA, M.H. Phosphate and the utilization of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarumbiovarviceae*. *Lett. Appl. Microbiol.* 18, 294–296, 1994.
- BLEVINS, D.G. Por que as plantas precisam de fósforo? *Informações agronômicas*, Piracicaba, n. 87, p. 4-5, 1999.
- GARBEVA, P.; VAN VEEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Microbial diversity in soil: selection microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 42, p. 243-270, 2004
- GRANT, C.A.; FLATEN, D.N.; TOMASIEWICZ, D.J.; SHEPPARD, S.C. A importância inicial do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. *Informações Agronômicas*, Piracicaba, n. 94, p. 1-5, 2001.
- JONES, D.; SMITH, B.F.L.; WILSON, M.J.; GOODMAN, B.A. Phosphate solubilizing fungi in a Scottish upland soil. *Mycological Research*, London, v. 95, n. 9, p. 1090-1093, 1991.
- KIM, K.Y.; JORDAN, D.; MCDONALD, G.A. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscularmycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biology and Fertility of Soils*. New York, v. 26, n. 2, p. 79-87, 1997.
- NAHAS, E.; FORNASIERI, D.J.; ASSIS, L.C. Resposta á inoculação de fungo solubilizador de fósforo em milho. *ScientiaAgrícola*, Piracicaba, v. 51, n. 3, p. 463-469, 1994b.
- NAHAS, E; TERENCEZI, H. F.; ROSSI, A. Effect of carbon source and pH on the production and secretion of acid phosphatase (EC 3.1.3.2.) and alkaline phosphatase (EC 3.13.1.) in *Neurospora crassa*. *Journal of General Microbiology*, London, v.128, p. 2017-2021, 1982.
- ODUNFA, V.S.A.; OSO, B.A. Bacterial population in the rhizosphere soils of cowpea and sorghum. *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol*, Paris, v. 15, n. 4, p. 413-420, 1978.
- OMAR, S.A. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular-arbuscular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Dordrecht, v. 14, n. 2, p. 211-218., 1998.
- PIKOVSKAYA, R.I. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Microbiologiya* 17, 362-370, 1948.
- 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*, Aberdeen, v. 28, p. 281- 290, 1999.

SAHIN, F.; ÇAKMAKÇI, R.; KANTAR, F. Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N 2-fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 265, n. 1-2, p. 123-129, 2004.

SAMPAIO, R.M.; ALEGRE, R.M.; MARCOS, S.K.; BARROTI, G.; UBEDA, B. T. Estudo da Solubilidade de Fosfato de Rocha Tipo Tapira por Fungos do Gênero *Aspergillus*. In: XIV Simpósio Brasileiro de Fermentações - SINAFERM, 2003, Florianópolis. Anais do. XIV Simpósio Brasileiro de Fermentações - SINAFERM, 2003

SCHNEIDER, K.D.; VAN STRAATEN, P.; DE ORDUÑA, R.M.; GLASAUER, S.; TREVORS, J.; FALLOW, D.; SMITH, P.S. Comparing phosphorus mobilization strategies using *Aspergillusniger* for the mineral dissolution of three phosphate rocks. *Journal of Applied Microbiology*, v.108(1), p. 366-374, 2010.

SILVA FILHO, G.N. Solubilização de fosfatos pela microbiota do solo . 1998. 140f. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 1998.

SILVA FILHO, G.N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de Pinus e Eucalyptus de Santa Catarina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* , Brasília, v. 37, n. 6, p. 847-854, 2002.

SILVA FILHO, G.N.; VIDOR, C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* , Brasília, v. 36, n. 12, p. 1495-1508, 2001.

SOUCHIE, E.L.; SAGGIN-JUNIOR, O.J.; SILVA, E.M.K.; CAMPELLO, E.F.C. AZCÓN, R.; BAREA, J.M. Communities of P-solubilizing bacteria, fungi and arbuscularmycorrhizal fungi in grass pasture and secondary forest of Paraty, RJ-Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. Rio de Janeiro, v. 78, p. 183-193, 2006.

SUDHAKARA REDDY, M.; KUMAR, S.; BABITA, K., REDDY, M.S. Biosolubilization of poorly soluble rock phosphates by *Aspergillustubingensis* and *Aspergillusniger*. *Bioresource Technology*. v. 84, p. 187-189, 2002.

VASSILEV, N.; BACA, M.T.; VASSILEVA, M.; FRANCO, I.; AZCON, R. Rock phosphate solubilization by *Aspergillusniger* grown on sugar-beet waste medium. *ApplMicrobiolBiotechnol* 44, 546–549. 1995.

VASSILEVA, M.; AZCON, R.; BAREA, J.M.; VASSILEV, N. Application of an encapsulated filamentous fungus in solubilization of inorganic phosphate. *J Biotechnol* 63, 67–72, 1998.