



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA**  
**QUÍMICA**



**BIOSSOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO PROVENIENTE DE ROCHA FOSFÁTICA  
UTILIZANDO FUNGOS E BACTÉRIAS**

**TACIANA SOARES DO CARMO**

**UBERLÂNDIA – MG**

**2017**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA



**BIOSSOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO PROVENIENTE DE ROCHA FOSFÁTICA  
UTILIZANDO FUNGOS E BACTÉRIAS**

Taciana Soares do Carmo

Orientadores: Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro (UFU)  
Prof<sup>a</sup> Dra Vicelma Luiz Cardoso (UFU)  
Prof<sup>a</sup>. Dra Miriam Maria de Resende (UFU)

Tese de doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Química da Universidade  
Federal de Uberlândia como parte dos  
requisitos necessários à obtenção do  
título de Doutor em Engenharia  
Química, área de concentração em  
Pesquisa e Desenvolvimento de  
Processos Químicos.

**UBERLÂNDIA – MG**

**2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

- C287b Carmo, Taciana Soares do, 1984-  
2017 Biossolubilização de fósforo proveniente de rocha fosfática  
utilizando fungos e bactérias / Taciana Soares do Carmo. - 2017.  
125 f. : il.
- Orientador: Eloizio Júlio Ribeiro.  
Coorientadora: Miriam Maria de Resende.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa  
de Pós-Graduação em Engenharia Química.  
Inclui bibliografia.
1. Engenharia química - Teses. 2. Fertilizantes fosfatados - Teses. 3.  
Adubos e fertilizantes - Teses. 4. Fósforo na nutrição de plantas - Teses.  
I. Ribeiro, Eloizio Júlio. II. Resende, Miriam Maria de. III. Universidade  
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia  
Química. IV. Título.

---

CDU: 66.0

TESE DE DOUTORADO DE TACIANA SOARES DO CARMO SUBMETIDA AO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS  
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 27  
DE JULHO DE 2017.

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro  
(Orientador – PPGEQ/UFU)

Profa Dra. Miriam Maria de Resende  
(Co-orientadora – PPGEQ/UFU)

Profa Dra. Vicelma Luiz Cardoso  
(Co- orientadora – PPGEQ/UFU)

Profa. Dra. Eliana Flávia Camporese Servulo  
(Escola de Química/ UFRJ)

Prof. Dr. Petrus Pires Marques  
(ICB/DMI/UNIFAL)

Dra. Raquel Cristina Cavalcanti Dantas  
(FEQ/UFU)

Profa. Dra. Patrícia Angélica Vieira  
(PPGEQ/UFU)

Dra. Verônica dos Santos Lopes  
(FECIV/UFU)

Dedico este trabalho a todos,  
que direta ou indiretamente me  
ajudaram a torná-lo possível.

## **AGRADECIMENTOS**

Como é possível imaginar, é muito difícil agradecer a todas as pessoas que cruzam nosso caminho e nos ajudam em grandes conquistas.

Agradeço aos meus pais José Vanderlei e Iara, pelos ensinamentos ao longo da vida, pelo incentivo e pelo amor incondicional. Aos meus irmãos Tatiane e Tarcísio, pelo companheirismo e amizade.

Agradeço também aos meus pais científicos, orientadores, Eloízio e Miriam, não tenho palavras para expressar o meu respeito, admiração e gratidão por tudo que fizeram por mim. Agradeço também a professora Vicelma, sempre presente neste trabalho, obrigada pelo empenho e dedicação.

Agradeço ao Geraldo, pelo amor, amizade, companheirismo e principalmente pela paciência dedicados a mim ao longo dessa jornada.

A todos os funcionários da FEQUI, professores, técnicos, auxiliares, que contribuíram direta ou indiretamente em minha formação, só tenho a agradecer, pois sempre fui recebida com respeito e carinho por todos.

Aos amigos e colegas, aos presentes pelos momentos compartilhados, aos distantes pela torcida, obrigada pela amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade concedida e a FAPEMIG pela confiança depositada e suporte financeiro.

Por último e não menos importante, agradeço acima de tudo, à bondade divina, que, além de nos oferecer a grandeza da vida, permite que possamos construir uma vida maravilhosa, apesar de todas as adversidades que enfrentamos.

Enfim, deixo registrada aqui minha eterna gratidão!

*“Muitas das falhas da vida ocorrem quando não percebemos o quão próximos estávamos do sucesso na hora em que desistimos.”*

Thomas Edison

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	vii
RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	ix
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1 – Fósforo.....	4
2.2 – Fertilizantes .....	5
2.3 – Produção de fertilizantes .....	7
2.4– Reservas de rochas fosfáticas .....	8
2.5 – Biofertilizantes .....	10
2.6 – Microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) .....	12
2.6.1 – Fungos.....	13
2.6.1.1 <i>Trichoderma asperellum</i> .....	15
2.6.1.2 <i>Trichoderma harzianum</i> .....	15
2.6.1.3 <i>Trichoderma ressei</i> .....	16
2.6.2 – Bactérias.....	17
2.7 – Mecanismos de solubilização .....	18
2.8 – Biorreatores .....	19
2.8.1 – Biorreatores do tipo <i>Air lift</i> .....	20
2.8.2 – Biorreatores do tipo Rotativo.....	21
CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 – Materiais .....	23
3.1.1 - Rocha fosfática .....	23
3.1.2 – Biomassa para fermentação em estado sólido .....	24
3.1.3 – Microrganismos .....	25
3.1.4 – Melaço de soja .....	25
3.2 - Metodologia dos experimentos .....	26
3.2.1 - Experimentos realizados com fungos .....	26
3.2.1.1 – Seleção e manutenção da cultura .....	26
3.2.1.2 – Testes em reatores cônicos de bancada com fermentação líquida.....	27
3.2.1.3 - Testes em reatores cônicos de bancada com fermentação em estado sólido (FES)28	28

3.2.1.4 – Testes em biorreatores do tipo tambor rotativo .....	29
3.3.2 – Experimentos realizados utilizando bactérias.....	30
3.3.2.1 – Seleção e manutenção das culturas (repique) .....	31
3.3.2.2 – Experimentos realizados em reatores cônicos de bancada .....	32
3.3.2.3 – Experimentos realizados em biorreatores do tipo <i>air lift</i> .....	33
3.3.3 – Metodologia analítica .....	34
3.3.3.1 – Determinação de fósforo total – Método colorimétrico.....	34
3.3.3.2 – Determinação de células .....	34
3.3.3.3 – Determinação do pH .....	34
3.3.3.4 – Determinação da umidade na fermentação sólida .....	34
3.3.3.5 – Determinação de ácidos orgânicos por HPLC .....	35
3.3.3.6 – Cálculo de concentração inicial de P .....	35
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	36
4.1 Fermentações líquidas preliminares .....	36
4.1.1 Avaliação da produção de ácidos orgânicos para as cepas dos microrganismos do gênero <i>Trichoderma</i> em fermentação líquida .....	45
4.2. Fermentação em estado sólido com fungos em reatores cônicos .....	52
4.3- Fermentação em estado sólido em biorreatores do tipo tambor rotativo .....	60
4.4- Fermentações preliminares com as bactérias <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Bacillus subtilis</i> e as bactérias acidófilas <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> e <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> em meio líquido.....	64
4.4.1- Fermentação com a associação das bactérias .....	72
4.4.2- Fermentação líquida com as bactérias acidófilas para avaliar a influência do pH inicial do meio .....	74
4.4.3- Fermentação líquida com as bactérias para avaliação da influência da concentração de rocha fosfática e composição do meio líquido sintético .....	77
4.4.4- Fermentação líquida com acréscimo de Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ao meio caldo nutritivo .....	92
4.4.5- Fermentação líquida com associação das bactérias .....	100
4.4.6- Fermentação líquida em reator do tipo <i>air lift</i> .....	106
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES.....	112
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	114
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	115
APÊNDICES .....	125

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Unidade experimental utilizando o reator do tipo <i>air lift</i> (A) e o reator isolado (B). .....	21
Figura 2 - Reator do tipo tambor rotativo.....	21
Figura 3 - Concentrado de rocha fosfática .....	24
Figura 4 - Bagaço de cana de açúcar pré tratado com explosão a vapor .....	24
Figura 5 - Fluxograma dos testes utilizando fungos em biorreatores cônicos de bancada e em biorreatores do tipo tambor rotativo. ....	26
Figura 7 - Crescimento do microrganismo <i>T. asperellum</i> no meio com 5 g/L de rocha e fósforo; (A) sem ajuste de pH e (B) com ajuste de pH.....	37
Figura 8 - Crescimento do microrganismo <i>T. harzianum</i> no meio com 5 g/L de rocha e fósforo; (A) sem ajuste de pH e (B) com ajuste de pH.....	39
Figura 9 - Crescimento do microrganismo <i>T. ressei</i> no meio com 5 g/L de rocha e quantidade de fósforo; (A) sem ajuste de pH e (B) com ajuste de pH.....	40
Figura 10 - Crescimento da associação dos três microrganismos no meio com 5 g/L de rocha, e fósforo solúvel, (A) sem ajuste de pH e (B) com ajuste de pH. ....	42
Figura 11 - Resultados para o crescimento de <i>Penicillium oxalicum</i> e fósforo solubilizado no meio com 5 g/L de rocha com controle de pH (A) e produção de ácidos ao longo do teste (B). .....	44
Figura 12 - Crescimento de <i>T. asperellum</i> no meio com 5 g/L de rocha e quantidade de fósforo solubilizado (A), produção de ácidos ao longo do teste (B). ....	46
Figura 13 - Crescimento de <i>T. ressei</i> no meio com 5 g/L de rocha e fósforo solubilizado para o microrganismo (A), produção de ácidos ao longo do teste (B). ....	48
Figura 14 - Crescimento do microrganismo <i>T. harzianum</i> no meio com 5 g/L de rocha e quantidade de fósforo solubilizado (A), produção de ácidos ao longo do teste (B). ....	49
Figura 15 - Crescimento da associação de <i>T. asperellum</i> , <i>T. ressei</i> e <i>T. harzianum</i> no meio com 5 g/L de rocha e fósforo (A), produção de ácidos ao longo do teste (B). ....	51
Figura 16 - Crescimento de <i>T. ressei</i> no meio com 5 g/L de rocha fósforo, para o microrganismo em FES com 85% de umidade inicial (A) e produção de ácidos ao longo do teste (B). ....	53
Figura 17 - Crescimento de <i>T. asperellum</i> no meio com 5 g/L de rocha e fósforo solubilizado (A), produção de ácidos ao longo do teste (B) em fermentação sólida com 85% de umidade inicial. ....	54
Figura 18 - Crescimento de <i>T. harzianum</i> no meio com 5 g/L de rocha e fósforo (A), produção de ácidos ao longo do teste (B) em fermentação sólida com 85% de umidade inicial.....	55

Figura 19 - Crescimento da associação de <i>T. harzianum</i> , <i>T. asperellum</i> e <i>T. ressei</i> no meio com 5 g/L de rocha e fósforo (A), produção de ácidos ao longo do teste (B) em fermentação sólida com 85% de umidade inicial .....	57
Figura 20 - Crescimento da associação de <i>T. harzianum</i> , <i>T. asperellum</i> e <i>T. ressei</i> no meio com 5 g/L de rocha e fósforo solubilizado (A), produção de ácidos ao longo do teste (B) em fermentação sólida com umidade de 50%.....	59
Figura 21 - Crescimento da associação de <i>T. harzianum</i> , <i>T. asperellum</i> e <i>T. ressei</i> no meio com 5 g/L de rocha e fósforo solubilizado (A), produção de ácidos ao longo do teste (B) em fermentação sólida com umidade inicial de 55% em reator do tipo tambor rotativo.....	61
Figura 22 - Crescimento da associação de <i>T. harzianum</i> , <i>T. asperellum</i> e <i>T. ressei</i> no meio com 5 g/L de rocha e fósforo (A), produção de ácidos ao longo do teste (B) em biorreatore do tipo tambor rotativo em fermentação sólida com umidade inicial de 40% .....	63
Figura 23 - Crescimento do microrganismo <i>B.megaterium</i> no meio com 5 g/L de rocha e produção de fósforo (A) produção de ácidos ao longo do teste (B).....	65
Figura 24 - Crescimento de <i>B.subtilis</i> no meio com 5 g/L de rocha e produção de fósforo (A), produção de ácidos ao longo do teste (B).....	67
Figura 25 - Quantidade de fósforo solubilizado e concentração celular de <i>B.licheniformis</i> no meio com 5g/L de rocha (A), produção de ácidos ao longo do teste (B).....	68
Figura 26 - Crescimento de <i>Pseudomonas fluorescens</i> no meio com 5 g/L de rocha e fósforo solubilizado (A), produção de ácidos ao longo do teste (B).....	69
Figura 27 - Crescimento da associação das bactérias no meio com 5 g/L de rocha e fósforo solubilizado (A), produção de ácidos ao longo do teste (B).....	71
Figura 28 - Crescimento da associação de <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> e <i>B. licheniformis</i> em meio com 10 g/L de rocha e fósforo (A), produção de ácidos ao longo do teste (B).....	73
Figura 29 - Concentração de fósforo e de biomassa para os <i>A.thiooxidans</i> , com ajuste inicial do meio para pH 2 (A) e sem ajuste inicial do pH (B) em meio contendo 5 g/L de rocha. ....	75
Figura 30 - Concentração de fósforo e concentração de biomassa para os testes utilizando <i>A.ferrooxidans</i> , com ajuste inicial do meio para pH 2 (A) e sem ajuste inicial do pH (B) em meio com 5 g/L de rocha. ....	76
Figura 31 - Crescimento de <i>B.megaterium</i> e quantidade de fósforo solubilizado em meio caldo nutritivo modificado contendo 5 g/L de rocha fosfática (A) produção de ácidos orgânicos ao longo do teste (B). .....	78
Figura 32 - Crescimento de <i>B.licheniformis</i> e quantidade de fósforo solúvel em meio caldo nutritivo modificado com 5 g/L de rocha fosfática (A) produção de ácidos orgânicos ao longo do teste (B). .....	79
Figura 33 - Crescimento de <i>P. fluorescens</i> e fósforo solúvel em meio caldo nutritivo modificado com 5 g/L de rocha fosfática (A) produção de ácidos orgânicos ao longo do teste (B).....	80

Figura 34 - Crescimento de <i>B.megaterium</i> e fósforo em meio caldo nutriente modificado com 10 g/L de rocha fosfática (A) produção de ácidos orgânicos ao longo do teste (B).....	82
Figura 35 - Crescimento de <i>B.licheniformis</i> e fósforo em meio caldo nutriente modificado com 10 g/L de rocha fosfática (A) produção de ácidos orgânicos ao longo do teste (B).....	83
Figura 36 - Crescimento de <i>P.fluorescens</i> e fósforo em meio caldo nutriente modificado com 10 g/L de rocha fosfática (A) produção de ácidos orgânicos ao longo do teste (B).....	84
Figura 37 - Crescimento de <i>B.megaterium</i> em meio simples fosfato contendo 5g/L e fósforo (A) produção de ácidos orgânicos ao longo do teste (B).....	86
Figura 38 - Crescimento de <i>A.ferrooxidans</i> e fósforo solúvel no meio de cultivo T&K, com 2 g/L de rocha e 120 mM de Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (A) e meio com 60 mM de Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (B). .....	88
Figura 39 - Crescimento de <i>A.ferrooxidans</i> e fósforo solúvel no meio de cultivo T&K, com 3,5 g/L de rocha com 120 mM de Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (A) e com 60 mM de Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (B). .....	89
Figura 40 - Crescimento de <i>A.ferrooxidans</i> e fósforo solúvel no meio de cultivo T&K, com 5 g/L de rocha e 120 mM de Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (A) meio com 60 mM de Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (B).....	90
Figura 41 - Concentração de fósforo e concentração de biomassa para os testes utilizando <i>A.thiooxidans</i> , pH inicial do meio não foi ajustado, concentração de rocha 10 g/L. ....	92
Figura 42 - Concentração de fósforo e concentração de biomassa (A) concentração de ácidos (B), para os testes utilizando <i>B.megaterium</i> crescendo em meio caldo nutriente com 5 g/L de rocha fosfática e 33,3 g/L de FeSO <sub>4</sub> .....	93
Figura 43 - Concentração de fósforo e concentração celular para os testes utilizando <i>P.fluorescens</i> (A) e concentração de ácidos (B) em meio caldo nutriente com 5 g/L de rocha fosfática e 33,3 g/L de FeSO <sub>4</sub> .....	94
Figura 44 - Concentração de fósforo e concentração de biomassa para os testes utilizando <i>A.ferrooxidans</i> , em meio caldo nutriente com 5 g/L de rocha fosfática e 33,3 g/L de FeSO <sub>4</sub> ....	95
Figura 45 - Concentração de fósforo e concentração de biomassa (A) concentração de ácidos orgânicos (B), para os testes utilizando <i>B.megaterium</i> , em meio caldo nutriente com 5 g/L de rocha fosfática e 10 g/L de S. ....	97
Figura 46 - Concentração de fósforo e concentração de biomassa (A) concentração de ácidos orgânicos (B), para os testes com <i>P.fluorescens</i> , crescendo em meio caldo nutriente com 10 g/L de S.....	98
Figura 47 - Concentração de fósforo e concentração de biomassa para os testes utilizando <i>A.thiooxidans</i> , crescendo em meio caldo nutriente com 10 g/L de S.....	99
Figura 48 - Concentração de fósforo e concentração de biomassa (A) concentração de ácidos orgânicos (B) para os testes utilizando <i>B.megaterium</i> + <i>A.ferrooxidans</i> em meio caldo nutriente com 5 g/L de rocha fosfática acrescido de 33,3 g/L de Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . ....	101
Figura 49 - Concentração de fósforo e concentração de biomassa (A) concentração de ácidos orgânicos (B) para os testes utilizando <i>P.fluorescens</i> + <i>A.ferrooxidans</i> em meio caldo nutriente com 5 g/L de rocha fosfática acrescido de 33,3 g/L de Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . ....	102

Figura 50 - Concentração de fósforo e concentração de biomassa (A) concentração de ácidos orgânicos (B) para os testes utilizando <i>B.megaterium</i> + <i>A.thiooxidans</i> em meio caldo nutritivo, acrescido de 10 g/L de S.....	104
Figura 51 - Concentração de fósforo e concentração de biomassa (A) concentração de ácidos (B) para os testes utilizando <i>P.fluorescens</i> + <i>A.thiooxidans</i> em meio caldo nutritivo com 5 g/L de rocha fosfática, acrescido de 10 g/L de S. ....	105
Figura 52 - Concentração de fósforo e concentração de biomassa (A) concentração de ácidos (B), para os testes em reator do tipo <i>air lift</i> utilizando <i>B.megaterium</i> em meio caldo nutritivo com 5 g/L de rocha fosfática, acrescido de 10 g/L de S, pH inicial do meio não foi ajustado. ....	107
Figura 53 - Concentração de fósforo e concentração de biomassa (A) concentração de ácidos (B), para os testes em reator do tipo <i>air lift</i> utilizando a associação <i>B.megaterium</i> + <i>A.thiooxidans</i> em meio caldo nutritivo com 5 g/L de rocha fosfática acrescido de 10 g/L de S, pH inicial do meio não foi ajustado.....	108
Figura 54 - Concentração de fósforo e concentração de biomassa (A) concentração de ácidos (B), para os testes em reator do tipo <i>air lift</i> utilizando <i>B.subtilis</i> em meio líquido, contendo rocha em concentração de 5 g/L, sem ajuste inicial do pH. ....	110
Figura 55 - Concentração de fósforo e concentração de biomassa para os testes em reator do tipo <i>air lift</i> utilizando <i>B.megaterium+B.subtilis+B/licheniformis</i> . ....	111

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição percentual do concentrado de rocha fosfática.....	23
Tabela 2 - Microrganismos utilizados .....	25
Tabela 3 - Meio sintético seletivo sólido (PIKOVSKAYA, 1948) .....	27
Tabela 4 - Meio sintético seletivo líquido modificado (SAMPAIO et al., 2003).....	28
Tabela 5 - Composição no meio caldo nutriente (SAM BROOK; RUSSELL, 2001) .....	31
Tabela 6- Composição do meio LB (SAM BROOK; RUSSELL, 2001) .....	32
Tabela 7 - Composição meio T&K (TUOVINEN; KELLY, 1973).....	32
Tabela 8 - Composição meio de cultura 9K (SILVERMAN; LUNDGREN, 1959). ....	32
Tabela 9 – Consolidação de resultados para os testes com fungos com e sem ajuste de pH ...	45
Tabela 10 – Quadro de resultados para os testes realizados com fungos .....	52
Tabela 11- Quadro comparativo dos resultados dos testes em fermentação em estado sólido	60
Tabela 12- Quadro comparativo dos testes em fermentação sólida realizada em reatores do tipo cônico e tambor rotativo.....	64
Tabela 13- Quadro comparativo dos testes em fermentação líquida utilizando bactérias.....	72
Tabela 14 – Resultados obtidos para os testes utilizando <i>B. megaterium</i> nos diferentes meios testados .....	87

## RESUMO

As plantas, como todo ser vivo, necessitam de nutrientes que são um dos fatores determinantes para o crescimento e desenvolvimento, e que por sua vez são retirados do solo. O fósforo é um elemento essencial para as plantas e está presente no solo em baixas concentrações. Para conseguir suprir tal necessidade, fertilizantes (adubos) químicos são adicionados, porém, um dos principais problemas relativos à absorção do fósforo pelas plantas se deve ao fato de uma grande parte ser do adubo químico e estar na forma imobilizado como fosfatos insolúveis. Mundialmente, mais de 99% dos fertilizantes fosfatados são produzidos a partir de reservas de rochas fosfáticas e utilização de ácidos inorgânicos fortes (ácido sulfúrico) para obtenção de formas mais solúveis de fosfato, gerando subprodutos impactantes ao meio ambiente. A utilização de microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) tem-se mostrado uma alternativa biotecnológica promissora para a produção de adubos com fósforos solúveis a partir de rocha fosfática (RF). Assim, este trabalho teve como objetivo selecionar fungos e bactérias com desempenho eficiente na biossolubilização de fósforo, assim como fazer uma avaliação da utilização de co-culturas no processo, e ainda estudar o processo de biossolubilização de fósforo em reatores cônicos de bancada, *air lift* e reator rotativo, analisando as condições operacionais e os ácidos orgânicos produzidos ao longo do processo. Para os testes realizados em fermentação submersa utilizando espécies de *Trichoderma* verificou-se que todas apresentaram comportamento semelhante em relação as variáveis analisadas (pH, produção de ácidos, fósforo solúvel e quantidade de biomassa), sendo que a associação (co-cultura) das culturas de *Trichoderma* mostrou-se mais eficiente, com máxima eficiência alcançada de 19,4%. Nos testes realizados em fermentação no estado sólido, em reator do tipo tambor rotativo com umidade inicial de 55%, a eficiência máxima foi de 49,6%. Constatou-se a importância da produção de ácidos orgânicos, o valor do pH do meio para o processo, bem como as composições e condições de crescimento do microrganismos, tanto para os processos utilizando fungos quanto para os que foram utilizadas bactérias. Nos testes nos quais as bactérias foram os MSF, as espécies do gênero *Bacillus* testadas apresentaram o mesmo potencial solubilizador para rocha fosfática, quando testadas isoladamente. No caso das bactérias acidófilas, a *Acidithiobacillus ferrooxidans* apresentou melhores resultados comparativamente a *Acidithiobacillus thiooxidans*.

Palavras chaves: biossolubilização, rocha fosfática, fungos, bactérias, co-culturas

## ABSTRACT

Plants, like every living thing, need nutrients that are one of the determining factors for growth and development, and which in turn are removed from the soil. Phosphorus is an essential element for plants and is present in the soil at low concentrations. In order to meet this need, chemical fertilizers are added, however, one of the main problems regarding the absorption of phosphorus by plants is due to the fact that a large part of the chemical fertilizer is in the immobilized form as insoluble phosphates. Worldwide, more than 99% of phosphate fertilizers are produced from phosphate rock reserves and use of strong inorganic acids (sulfuric acid) to obtain more soluble forms of phosphate, generating by-products that impact the environment. The use of phosphate solubilizing microorganisms (MSF) has been shown to be a promising biotechnological alternative for the production of fertilizers with soluble phosphates from phosphate rock (RF). The objective of this work was to select fungi and bacteria with efficient performance in phosphorus biosolubilization, as well as to evaluate the use of co-cultures in the process and to study the phosphorus biosolubilization process in conical, lift and rotary reactor, analyzing the operational conditions and the organic acids produced throughout the process. For the tests carried out in submerged fermentation using *Trichoderma* species, it was verified that all presented similar behavior in relation to the analyzed variables (pH, acid production, soluble phosphorus and amount of biomass), and the association (co-culture) of *Trichoderma* showed to be more efficient, with maximum efficiency achieved of 19.4%. In the tests carried out in solid state fermentation, in a rotary drum type reactor with initial moisture of 55%, the maximum efficiency was 49.6%. The importance of the production of organic acids, the pH value of the medium for the process, as well as the compositions and conditions of growth of the microorganisms were verified, both for the processes using fungi and for which the bacteria were used. In the tests in which the bacteria were the MSF, the species of the genus *Bacillus* tested had the same solubilizing potential for phosphate rock, when tested alone. In the case of acidophilic bacteria, *Acidithiobacillus ferrooxidans* presented better results compared to *Acidithiobacillus thiooxidans*.

Keywords: biosolubilization, phosphate rock, fungi, bacteria, co-cultures

---

## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO

---

O fósforo (P) é um macronutriente mineral essencial à manutenção do crescimento e desenvolvimento das plantas. As plantas obtêm o fósforo como fosfato inorgânico, porém este é um dos macronutrientes disponível em quantidades mínimas no solo, além de ser um elemento limitante em algumas circunstâncias específicas, devido à sua elevada reatividade com metais, em conjunto com fatores como o pH e composição do solo (KÖCK, 2016).

Localizado na faixa intertropical, o Brasil é um país de clima úmido com solos ácidos e mineralmente pobres em muitos nutrientes fundamentais para a agricultura. Tais características geológicas condicionam o país à necessidade do emprego de grande quantidade de todo o tipo de fertilizantes, para reposição das quantidades dos elementos vitais que foram retirados do solo pelos processos de intemperismo ocorridos durante bilhões de anos (SOUZA, 2001).

Fertilizantes, também referidos como adubos, por definição, são substâncias minerais ou orgânicas, naturais ou sintéticas, fornecedoras de um ou mais nutrientes para as plantas. (COELHO, 2007). No aspecto da produção de fertilizantes, as principais rotas dos fertilizantes fosfatados no Brasil são as de solubilização do fósforo via úmida e via térmica. Na produção de ácido fosfórico a partir de concentrados apatíticos, são seguidos dois caminhos: o hidrometalúrgico, utilizando-se predominantemente o ataque sulfúrico e o térmico, no qual o concentrado é reduzido a fósforo elementar e em seguida oxidado e hidratado para dar origem ao ácido fosfórico (LOUREIRO; MONTE; NASCIMENTO, 2008). A produção por via térmica é ínfima em relação à via úmida, a qual caracteriza-se pelo ataque do ácido sulfúrico ao concentrado fosfático, produzindo ácido fosfórico.

Na produção do ácido fosfórico pela via do ácido sulfúrico, são produzidas em média de 4 a 5 toneladas de fosfogesso para cada tonelada de ácido fosfórico, sendo assim, considerado o principal desafio ambiental do setor (DIAS; LAJOLO, 2010). Isso porque, embora a composição do fosfogesso seja basicamente de fosfato de cálcio dihidratado, o material pode conter níveis elevados de impurezas que provêm das rochas fosfáticas. Outro problema está relacionado à estocagem deste material a céu aberto, podendo provocar drenagem ácida e posterior contaminação de lençóis freáticos.

Espera-se que a demanda por fósforo aumente no futuro com o crescimento da população mundial. Mesmo que parte do fósforo necessário já venha de fontes de reciclagem como fertilizantes agrícolas e resíduos de fermentação, uma quantidade significativa deste elemento químico é aplicado como fertilizante mineral. Esses são produzidos a partir de rochas de fosfato, que é um recurso fóssil e limitado (KRÜGER; ADAM, 2017).

Um estudo sobre os cenários iminentes de depredação de rocha fosfática (RF), considerada a maior fonte de fósforo para fertilizantes químicos, mostrou que o "pico de fósforo" ocorreria em torno de 2035. Tal pico, semelhante ao "pico de petróleo", é geralmente entendido como o momento no qual a produção global máxima de RF será atingida e declina a partir daí, o que provavelmente causaria efeitos profundos para a segurança alimentar global (ULRICH; FROSSARD, 2014).

A quantidade insuficiente de fósforo na rizosfera é um desafio, especialmente quando se trata do cultivo das plantas. Para suprir esse déficit, a agricultura moderna utiliza fertilizantes minerais concentrado em fósforo, porém esta é uma ferramenta muito ineficiente para compensação (KÖCK, 2016).

O baixo nível de eficiência de utilização dos adubos fosfatados é sem dúvida um dos grandes obstáculos para o estabelecimento de sistemas agrícolas sustentáveis, baseados numa menor utilização de fontes naturais não renováveis. A imobilização de fósforo na biomassa microbiana constitui-se num reservatório lâbil desse nutriente. Os microrganismos do solo também desempenham papel fundamental nos processos de mineralização e solubilização desse elemento. Desde o início do século 20, e principalmente a partir da década de 1950, cientistas têm estudado formas de aumentar os níveis de fósforo para as plantas por meio de processos microbiológicos (MENDES; REIS JUNIOR, 2003).

Os biofertilizantes são atrativos por causa dos impactos positivos tanto no crescimento das plantas quanto no meio ambiente, isto ocorre pelo fato de serem uma boa fonte de estímulos que podem reduzir o estresse ambiental (KANTACHOTE et al., 2016). Além disso, ajudam na proteção da planta contra o ataque de doenças, por antibiose.

Os microrganismos, tanto as bactérias quanto os fungos, desempenham um papel central no ciclo natural do fósforo e convertem as formas insolúveis de fósforo em uma forma acessível, característica importante para o crescimento e a sobrevivência das plantas. Entre os microrganismos solubilizadores de fosfato, destacam-se os gêneros bacterianos *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium* e fungos como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Alternaria*, entre outros, são os solubilizadores de fosfato mais poderosos. A solubilização de

fósforo por microrganismos é um fenômeno complexo, que depende de muitos fatores, tais como fisiologia e condições de crescimento da cultura (BEHERA et al., 2014)

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo avaliar a bioassolubilização de fósforo proveniente do concentrado de rocha fosfática empregando-se fungos e bactérias.

Como objetivos específicos dessa tese podem ser citados:

- selecionar fungos e bactérias, com melhor desempenho na bioassolubilização de fósforo, assim como fazer uma avaliação da utilização de co-culturas no processo;
- avaliar a interferência das condições nutricionais, a partir da modificação da composição dos meios;
- estudar o processo de bioassolubilização de fósforo em reatores cônicos de bancada sendo utilizada fermentação submersa para bactérias e fermentação nos estados líquido (submersa) e sólido (FES) para fungos;
- estudar a bioassolubilização de fósforo utilizando reator do tipo tambor rotativo para fungos em FES, variando a umidade inicial do meio;
- estudar o desempenho para o processo de bioassolubilização de rocha fosfática utilizando bactérias em reator do tipo *air – lift*;
- avaliar as condições operacionais e a produção de ácidos orgânicos ao longo do processo.

---

## CAPÍTULO 2

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

Neste capítulo é apresentada uma revisão da literatura sobre os temas pertinentes a este trabalho, ou seja, a produção de fertilizantes químicos fosfatados no Brasil e no mundo, a importância do fósforo para a cadeia produtiva de alimentos, assim como as dificuldades geradas pelas quantidades insuficientes desse elemento. Posteriormente contextualiza a utilização de biofertilizante, como rota alternativa que utiliza os microrganismos com seus mecanismos de solubilização de fosfato. Por fim, apresenta-se uma revisão dos trabalhos que avaliaram a biossolubilização utilizando microrganismos solubilizadores de fosfato a partir de diversas fontes de fósforo.

#### **2.1 – Fósforo**

O fósforo é um constituinte essencial de todos os organismos vivos, estando presente em ácidos nucleicos, fosfolipídeos, lipopolissacarídeos e vários solutos citoplasmáticos (HIROTA et al., 2010). É essencial para todos os seres animados, sendo crucial para o metabolismo energético (ciclo ATP-ADP), armazenamento, expressão de informação genética (DNA, RNA) e estrutura óssea, além de participar ativamente do processo de crescimento e sustentação corporal dos vegetais e animais. Em contraste com outros elementos químicos, o fósforo não pode ser substituído (KRÜGER; ADAM, 2017). Em termos mundiais, está contido nas rochas de depósitos de origens sedimentares, ígneos e biogênicos (SOUZA, 2001).

É considerado um macronutriente mineral essencial ao desenvolvimento e manutenção do crescimento de plantas. Geralmente na forma de  $P_2O_5$ , sendo o grande responsável pela geração de energia para a produção vegetal. É um dos recursos mais escassos do mundo, além de ser o fator limitante mais significativo para várias culturas em diferentes tipos de solos. Este mineral na forma solúvel possui uma alta reatividade com cálcio, ferro, alumínio, argilas, matéria orgânica e carbonatos, levando à formação de complexos de alta insolubilidade, ou seja, tornam-se indisponíveis para as plantas. Assim, uma cultura vegetal poucas vezes consegue aproveitar mais do que 15 a 20% do fósforo aplicado como fertilizante (Manual de Fertilizantes, 1980).

Em pesquisas sobre nutrição de plantas, o fósforo tem se destacado por ser um nutriente de grande importância nos solos tropicais, já que leva a grandes limitações nos rendimentos das culturas. A disponibilidade de fósforo para microrganismos e plantas se constitui, normalmente, como um fator limitante para as transformações de outros nutrientes no ecossistema terrestre, como o carbono (C) e o nitrogênio (N), que são dependentes de fósforo para serem fixados (GRANT; ROBERTSON, 1997). O fósforo ainda é apontado como o macronutriente mais limitante nos solos brasileiros (RAIJ, 1991). Um dos aspectos mais importantes do ciclo do fósforo é seu papel vital no controle da produtividade (FÖLLMI, 1996).

O fósforo elementar não ocorre na natureza. Ele combina espontaneamente e facilmente com o oxigênio, formando o pentóxido ( $P_2O_5$ ) e combina com a água para formar ácido fosfórico. Ocupa o décimo primeiro lugar na ordem de abundância de elementos nas rochas ígneas da crosta terrestre (CHANG; GOLDSBY, 2013).

A maioria dos solos do Brasil é classificada como latossolos, considerados muito profundos, bem drenados, altamente degradados e fortemente ácidos. Os óxidos, hidróxidos e oxi-hidróxidos de ferro (Fe) e alumínio (Al), dominam nesses solos e facilitam tanto a adsorção de fosfato como a formação de fosfatos de Fe e Al. A produção de vegetais nos trópicos é frequentemente limitada por baixos níveis de nutrientes disponíveis no solo (BARROSO; NAHAS, 2005).

Mesmo que um solo comum contenha aproximadamente 0,4-1,2 g de P por kg de solo, 95-98% deste fósforo está presente na forma de quelatos metálicos insolúveis que não podem ser utilizados pelas plantas (HAMDALI et al., 2010).

Deste modo, a partir do momento que há consciência da relação crítica entre o fósforo e a vida, torna-se óbvio que sem fósforo não há células, plantas, ou grãos e sem a quantidade adequada de fósforo haverá falta de alimento no mundo.

## **2.2 – Fertilizantes**

A utilização da fertilização se iniciou há tempos com o uso de esterco, restos de plantas e de animais, tortas de grãos (resíduos da extração de óleo), farinha de ossos e de conchas, cinzas, entre outros materiais. É importante ressaltar, entretanto, que a adubação tem duas funções diferentes: fornecer ao solo nutrientes de que ele é deficiente e adequar as condições físicas de aeração, drenagem e proliferação de microrganismos (CHAVES, 2010).

Fertilizantes são materiais que fornecem um ou mais elementos químicos necessários para o desenvolvimento adequado das plantas, podendo ser minerais ou orgânicos. São amplamente utilizados na agricultura para suprir a carência nutricional do solo. Os fertilizantes mais antigos, de uso milenar, são os chamados fertilizantes orgânicos ou adubos naturais de origem animal ou vegetal. Os fertilizantes denominados químicos ou minerais não originam-se de matéria animal ou vegetal, e sofrem processamento industrial (RAIJ, 2011). As principais matérias primas para a produção de fertilizantes inclui a amônia, para a produção de fertilizantes nitrogenados, o minério da apatita, para a produção de formulações fosfatadas, e minério de potássio, para produção de cloreto de potássio. Através do processamento mineral ou químico dessas matérias primas produzem-se os principais fertilizantes de origem sintética utilizados na agricultura. Este processamento visa a disponibilização de cada nutriente em uma forma absorvível pelas plantas. Para ser absorvível, o nutriente usualmente precisa ser solúvel em água ou em compostos gerados no solo por ação bacteriana ou outros mecanismos (HAGER, 2014).

Os elementos químicos presentes nos fertilizantes podem ser divididos em duas categorias: os macronutrientes (carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre) e os micronutrientes (boro, cloro, cobre, ferro, manganês, molibdênio, zinco, sódio, silício e cobalto) (MAPA, 2007). A fórmula básica dos fertilizantes normalmente é expressa em termos de composição N:P:K, que em geral são as deficiências comuns do solo. Esta relação indica o percentual de nitrogênio em sua forma elementar, o teor percentual de fósforo na forma de pentóxido de fósforo,  $P_2O_5$ , e o conteúdo percentual de potássio na forma de óxido de potássio,  $K_2O$  (DIAS, 2004; MALAVOLTA, 1994; MAPA, 2007)

Os macronutrientes fazem parte de moléculas essenciais, são necessários em grandes quantidades e tem função estrutural. Os micronutrientes têm variadas funções, dentre elas a constituição de enzimas que controlam diferentes processos de desenvolvimento das plantas. Entretanto, quando utilizados em grandes concentrações são motivo de preocupação devido ao seu potencial risco para o ambiente e à saúde humana (MALAVOLTA, 1994).

O uso de fertilizantes para corrigir as insuficiências nutricionais favorece o aumento da produção das culturas vegetais e ainda se faz necessário e indispensável diante da baixa fertilidade natural dos solos brasileiros. A agricultura brasileira tornou-se dependente dos fertilizantes, o que afeta diretamente a produção de alimentos e a economia do país (SILVA, 2013).

A aplicação de adubos químicos em larga escala, ao longo dos últimos 30 anos, desempenhou um papel importante no rápido crescimento da produção agrícola e o uso de fertilizantes deverá continuar a aumentar nas próximas décadas. Entretanto, a longo prazo, o intenso uso de fertilizantes resultará em esgotamento do carbono orgânico do solo, e outros efeitos como a sua acidificação, que por conseguinte resultará na degradação da estrutura e produtividade do solo (HE; ZHONG; YANG, 2017).

### **2.3 – Produção de fertilizantes**

A produção tradicional de fertilizantes fosfatados é baseada no processamento químico de minério de fosfato, um processo caro e que potencialmente pode levar a danos ambientais devido ao uso intensivo de energia e tratamento com ácido sulfúrico a alta temperatura (VASSILEV et al., 2006). Outro fator desfavorável está relacionado ao fato de que pouco do fósforo aplicado está disponível para plantas, tornando necessária a aplicação repetida e portanto poluente, acelerando a eutrofização de água doce e poluindo a água subterrânea (HAMDALI et al., 2010).

Atualmente, o Brasil é o quarto consumidor global de fertilizantes, representando 6% de todo o consumo mundial. A lista é encabeçada pela China (33% do consumo), Índia (17%) e Estados Unidos (12%), o que equivale a 62% de todo o consumo mundial de fertilizantes (REIS, 2013). O Brasil é o sexto maior consumidor de fertilizantes nitrogenados (equivale a 3% do consumo global), o quarto de fosfato (9% do consumo mundial) e o terceiro em fertilizantes a base de potássio (14%). A produção brasileira equivale a 2% da produção global de fertilizante NPK (REIS, 2013). O consumo de fertilizantes no Brasil tem crescido muito mais do que a produção agrícola nas últimas décadas como resultado tanto da intensificação do processo produtivo no campo, quanto, mais recentemente, do aumento da produção de biocombustíveis. Entre 1990 e 2007, o consumo per capita brasileiro passou de 21,5 para 42 kg/habitante/ano, quase três vezes menor em relação aos Estados Unidos, mas duas vezes maior do que o consumo médio mundial (KULAIF, 2009).

No processo industrial de concentração do fosfato da rocha fosfática ocorrem perdas consideráveis deste elemento por meio de rejeitos industriais ou por lixiviação pela chuva. No aspecto econômico, é necessária a recuperação deste mineral. No aspecto ambiental, o fósforo proveniente de rejeitos ou por lixiviação é arrastado até os corpos d'água acumulando-se nos leitos de rios e lagos. A quantidade excessiva deste mineral induz a multiplicação de

microrganismos (algas microscópicas) que habitam a superfície da água, formando uma camada densa, que impede a penetração da luminosidade, fenômeno denominado eutrofização. Esse fato implica na redução da taxa fotossintética nas camadas inferiores, ocasionando déficit de oxigênio necessário para atender a demanda respiratória dos organismos aeróbios, como os peixes e mamíferos aquáticos, que em virtude das condições de baixo suprimento, não conseguem sobreviver, aumentando ainda mais o teor de matéria orgânica no meio. Este fenômeno é conhecido como eutrofização e causa graves prejuízos ao meio ambiente (YAMADA, 2004).

Em complementação ao processamento químico tradicional, uma alternativa para recuperação de rejeitos e minimização de perdas, e uma provável forma de beneficiamento de reservas de baixo teor é o emprego de microrganismos como agentes solubilizadores de fosfato insolúvel. Diversos microrganismos são capazes de promover de forma eficiente a dissolução de fosfatos de rochas quando mantidos em culturas líquidas (IVANOVA; BOJINOVA; NEDIALKOVA, 2006). A ação de ácidos orgânicos (cítrico, lático, glucônico, oxálico, tartárico, acético, entre outros) sintetizados por estes microrganismos pode ser a principal responsável por tal habilidade. Segundo Gerke (1992), os ácidos orgânicos de baixa massa molar, por mecanismos de quebra e reações de troca iônica, podem aumentar a concentração de fósforo em solução.

Para tornar a agricultura mais sustentável, sistemas alternativos para fertilizantes que não sejam adubos químicos vem sendo buscados, tais como fertilizantes orgânicos, compostagem e biofertilizantes, sendo estes últimos considerados os mais atrativos (KANTACHOTE et al., 2016). Assim, rotas e metodologias alternativas vêm sendo estudadas visando melhor aproveitamento destes minérios, dos rejeitos e recuperação de subprodutos a fim de promover vantagens técnicas, econômicas e ambientais no contexto brasileiro, vislumbrando a criação de novos polos industriais de fertilizantes fosfatados.

## 2.4– Reservas de rochas fosfáticas

Rocha fosfática é um termo genérico usado para descrever fosfatos minerais. Existem muitos tipos de fosfatos na natureza com diferenças consideráveis nas características químicas e físicas que influenciam na qualidade para aplicação agrícola (REINHOLD, 1965).

As rochas fosfatadas são a principal fonte natural de fósforo e são utilizadas como matéria-prima para a produção de adubos fosfatados comerciais e de fósforo elementar que é utilizado na indústria química e alimentar. As rochas consistem principalmente de fosfato de cálcio

insolúvel, conhecido como apatita, de fórmula geral  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3$  ( $\text{OH}$ ,  $\text{F}$ ,  $\text{Cl}$ ) e dependendo do último grupo funcional, a apatita é referida como hidroxi, flúor ou cloro apatita (AVDALOVIĆ et al., 2015).

As reservas mundiais de rocha fosfática atingem a cifra de 47 bilhões de toneladas, correspondendo a 281 anos do consumo atual (KULAIF, 2009). Em estudo similar, segundo a United States Geological Survey (2009), a vida total das reservas no mundo está estimada em 90 anos e a vida das bases de reservas de 281 anos. Sendo a base das reservas a parte da reserva que pode ser economicamente extraída ou produzida no momento da avaliação, enquanto as bases de reservas são aqueles recursos que são atualmente econômicos (reservas), marginalmente econômicos e alguns dos quais são atualmente subeconômicos.

A principal utilização da rocha fosfática é como insumo na indústria de fertilizantes, sendo um recurso mineral pelo qual apenas três países são responsáveis por 73% da produção mundial: China, Estados Unidos e Marrocos, (incluindo Saara Ocidental) (LIMA; NEVES, 2016). Os depósitos sedimentares e os depósitos de origem ígnea são os mais importantes do ponto de vista econômico (SOUZA, 2001).

No Brasil, cerca de 80% das jazidas de fosfatos, são em geral de origem ígnea com baixo teor de  $\text{P}_2\text{O}_5$ , em termos mundiais esse percentual está em torno de 17%. As reservas totais chegam a casa dos quatro bilhões de toneladas e evoluíram numa taxa real de crescimento entre 1988-2000 (SOUZA, 2001). Segundo Uliana, Kahn e Braz (2009) o Complexo Alcalino-Carbonatítico de Salitre, localizado no município de Patrocínio, 70 km a norte de Araxá - MG, e distante 150 km de Uberlândia-MG é conhecido desde a década de 70 (BARBOSA et al., 1970). Este complexo além de apresentar baixo teor de fósforo, quando comparados aos depósitos de origem sedimentar (fosforitos marinhos), apresenta uma complexidade mineralógica acentuada (E.T.; COELHO, 1997; KAHN, 1999). Os grandes problemas ligados ao uso de rochas fosfatadas para a produção de fertilizantes são: esgotamento dos recursos, riscos de abastecimento e contaminação por metais pesados. A possível escassez de fósforo está sob vigorosa discussão há décadas (KRÜGER; ADAM, 2017).

A produção de rocha fosfática no país em 2014 foi menor que em 2013, devido principalmente à exaustão da mina do Barreiro, em Araxá (MG). Entretanto, o Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM) tem mantido o patamar de 270 Mt (lavráveis), já que diversas novas aprovações e reavaliações aconteceram nos últimos anos (LIMA; NEVES, 2016).

Esse patrimônio fosfático está distribuído nos Estados produtores de Minas Gerais com 73,8%, Goiás com 8,3% e São Paulo com 7,3%, que juntos participam com 89,4% das reservas totais do país, seguidos dos Estados de Santa Catarina, Ceará, Pernambuco, Bahia e Paraíba, com os 10,6% restantes (SOUZA, 2001).

O complexo de mineração de Tapira, Minas Gerais, da Vale/Fosfértil, é o maior produtor de rocha fosfática do Brasil, com linha de produção de concentrado fosfático, e capacidade anual de produção de 2.030.000 toneladas de concentrado fosfático (KULAIF, 2009). A usina que integra este complexo apresenta operações de moagem, deslamagem e flotação. Os produtos da usina se dividem entre o concentrado fosfático convencional, com teor de 35,8% de  $P_2O_5$ , constituindo 95% do total, e o concentrado ultrafino, com teor de 35,2% de  $P_2O_5$ . Estes produtos são enviados ao complexo industrial de Uberaba, a 120 km, o primeiro transportado por mineroduto e o segundo por rodovia, para serem utilizados na produção de ácido fosfórico e fertilizantes (KULAIF, 2009).

Os minerais que compõem as rochas fosfáticas são, basicamente, formados por dois grupos: as apatitas, que são fosfatos de cálcio contendo OH-, F- e Cl- e as fosforitas, que são uma variedade fibrosa da apatita, geralmente associada a carbonatos de cálcio e magnésio, óxidos de ferro e alumínio e traço de urânio (SOUZA, 2001).

É necessário aproveitar o fósforo sob a forma de pentóxido de fósforo ( $P_2O_5$ ), para que se possa através de processos mecânicos, utilizar esse produto. Proporções bem definidas do pentóxido com outros compostos, resultam numa mistura denominada de fertilizantes (adubos) minerais ou orgânicos, que levado ao solo, substitua as quantidades dos elementos vitais (SOUZA, 2001).

Apesar das incertezas das previsões sobre o esgotamento dessas reservas, que variam entre 30 e 300 anos, há um consenso de que a acessibilidade e a qualidade das rochas fosfáticas estão diminuindo e, consequentemente, os custos de produção dos fertilizantes de fósforo estão aumentando. Por conseguinte, devem ser desenvolvidos, num futuro próximo, processos eficientes, incluindo os microbianos, capazes de explorar rocha fosfática de menor qualidade e / ou fontes alternativas de fósforo a baixo custo (MENDES et al., 2013).

## 2.5 – Biofertilizantes

O uso dos biofertilizantes foi constatado no início da década de 80 por extensionistas da EMATER-RIO, em lavouras de café e cana-de-açúcar, regado nas covas para realizar a complementação nutricional e auxiliar na irrigação, já que era altamente diluído. No ano de

1985, foram iniciadas as unidades de observação em seringueira, café e maracujá. Os resultados alcançados com as pulverizações de biofertilizantes líquido a 20%, em diluição com água, mostraram a redução de ataques de fitopatógenos e de pragas, devido ao equilíbrio do ecossistema das lavouras pulverizadas, além do aumento da produção e da produtividade (SANTOS, 1992).

De acordo com o Decreto 4954/04, Art.2, inc. VI:

“biofertilizante: produto que contém princípio ativo ou agente orgânico, isento de substâncias agrotóxicas, capaz de atuar, direta ou indiretamente, sobre o todo ou parte das plantas cultivadas, elevando a sua produtividade, sem ter em conta o seu valor hormonal ou estimulante.”.

Em geral, tem-se que biofertilizante é o produto resultante da fermentação da matéria orgânica na ausência total de oxigênio, fermentação anaeróbia, porém essa definição pode ser ampliada envolvendo fermentação aeróbia (GUAZZELLI; RUPP; VENTURINI, 2012).

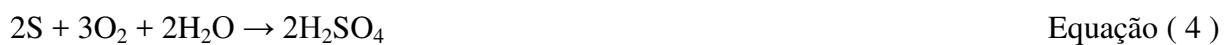
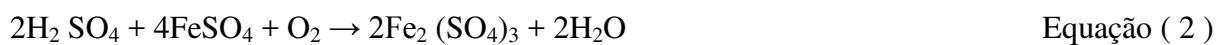
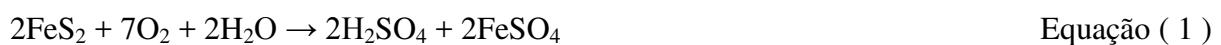
Uma adubação eficiente e econômica tem sido realizada a partir da produção de novos biofertilizantes utilizando rochas de fosfato e potássio inoculados com microrganismos (SILVA et al., 2016). O potencial biológico de um biofertilizante pode ser expresso pela variedade de microrganismos ali existentes, responsáveis pela liberação de metabólitos e antimetabólitos, entre eles vários antibióticos e hormônios vegetais (MEDEIROS; WANDERLEY; WANDERLEY, 2013).

O uso de biofertilizantes é ambientalmente e economicamente mais desejável do que os fertilizantes fosfatados produzidos comercialmente, pois demonstram melhor equilíbrio possível entre a aplicação de fósforo necessária para o rendimento máximo da safra, com relação ao ponto de vista econômico e a lixiviação de fósforo de terras agrícolas que contribuem para a eutrofização (AVDALOVIĆ et al., 2015).

Além da ação de ácidos, fatores como a temperatura, concentração de substrato, concentração de rocha fosfática, granulometria da rocha, ou mesmo a salinidade, representada pela presença de cloreto de sódio no meio, podem ter efeito a solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis pelos microorganismos (IVANOVA; BOJINOVA; NEDIALKOVA, 2006; KANG et al., 2002; SAMPAIO et al., 2003). Ainda segundo Ivanova, Bojinova e Nedialkova (2006), a solubilização eficiente de rochas fosfáticas depende da concentração de fosfato no meio de cultura dos microrganismos, do tamanho da partícula empregada e do pH, geralmente ácido. Materiais de tamanho reduzido se mostraram mais suscetíveis ao ataque microbiano. Conforme os autores, a redução do pH permitiu a produção dos ácidos orgânicos

pelos microrganismos e facilitou a solubilização do fosfato inorgânico. Por outro lado, Goldstein (2000) admitiu que as bactérias envolvidas no processo de biolixiviação formavam biofilmes na superfície das partículas produzindo condições físico-químicas únicas que viabilizavam a solubilização dos compostos fosfáticos. Tais condições relacionam-se com a ocorrência de diversos eventos catalíticos que aumentavam fortemente a eficiência do processo de biossolubilização.

A biofertilização ocorre de acordo com as seguintes reações químicas gerais (CORBRIDGE, 2013):



A dissolução de fosfato em ácido sulfúrico gerado por bactérias é um processo de equilíbrio complexo, que pode ser mostrado com as seguintes equações:



## 2.6 – Microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF)

A exploração microbiana é uma das estratégias promissoras e favoráveis ao meio ambiente que podem melhorar a nutrição de fósforo ao solo de forma sustentável. Assim, a utilização de microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) é uma alternativa biotecnológica para a produção de adubos com fósforo solúveis a partir de rocha fosfática (RF). A capacidade do

MSF de mobilizar fósforo a partir de fontes moderadamente solúveis pode ser uma ferramenta útil na gestão da fertilização com fósforo. Alguns estudos mostraram que o produto obtido a partir do tratamento de RF com MSF, ou mesmo a aplicação direta de MSF no solo pode melhorar o crescimento da planta e a absorção de fósforo (MENDES et al., 2013).

A sobrevivência de todo organismo na Terra depende de suas interações com outros organismos (simbiose). A maioria das associações entre plantas e microrganismos são mediadas por compostos orgânicos liberados pelas plantas, enquanto as bactérias melhoram o crescimento e o desenvolvimento das plantas por diferentes mecanismos, incluindo a fixação de nitrogênio e a provisão de nutrientes (MITTER et al., 2013).

Os microrganismos solubilizadores de fosfatos desempenham um papel importante no fornecimento de fósforo às plantas, devido à sua capacidade de solubilizar fosfatos insolúveis, adicionados ou existentes no solo, pelos processos de acidificação, quelação e reações de permuta iônica (COUTINHO; FELIX; YANO-MELO, 2012). Além de promover o crescimento do vegetal por meio dos mecanismos envolvidos na solubilização de fosfato, MSF aumentam a eficiência da fixação biológica de nitrogênio.

Muitos microrganismos do solo produzem ácidos láctico, glicólico, cítrico, fórmico e acético os quais podem solubilizar algumas das formas de fosfatos insolúveis; vários ácidos orgânicos e ácidos como o 2-cetoglicônico são eficientes como quelantes, sendo capazes de complexar com Ca, Cu, Ni, Mn, Fe e Al dos fosfatos, resultando na solubilização do P (BEAR, 1964).

Esta solubilização ocorre na natureza na presença de um grande número de autotróficos acidogênicos e heterotróficos (bactérias, fungos filamentosos e leveduras) do solo que têm a capacidade de solubilizar os minerais fosfatados e torná-los disponíveis para as plantas através da acidificação, quelação e reação de troca iônica (JAIN, SAXENA, & SHARMA, 2010, AVDALOVIĆ et al., 2015).

### **2.6.1 – Fungos**

A comunidade microbiana autóctone do solo desempenha papel fundamental na manutenção da qualidade do solo e tem se tornado alvo crescente de estudos relacionado à biossolubilização de fósforo (GARBEVA; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004). Grande parte desta comunidade possui a habilidade de mineralizar fosfatos orgânicos e solubilizar fosfatos inorgânicos, permitindo a liberação de fósforo assimilável pelas plantas (SILVA FILHO, 1998).

Os fungos filamentosos são microrganismos eucariontes, quimio-heterotróficos, necessitando de componentes orgânicos como fontes de energia e carbono, são aeróbicos ou anaeróbicos facultativos. Milhares de doenças causadas por fungos afetam plantas economicamente importantes e são responsáveis por infecções hospitalares. Por outro lado, os fungos são benéficos, sendo importantes na cadeia alimentar por decompor matéria vegetal morta e reciclando elementos vitais (FUNKE; CASE; TORTORA, 2012).

Os fungos foram relatados como sendo mais eficientes na libertação de fósforo do que as bactérias, em processos a partir de compostos inorgânicos insolúveis. Embora a secreção de ácido orgânico seja considerada como o principal mecanismo de solubilização inorgânica de fosfato, isso pode não se aplicar a todos os fungos solubilizantes de fosfato. Os fungos mostram seletividade na transformação de diferentes formas de fósforo e os ácidos orgânicos podem ou não ser segregados sob diferentes condições. A natureza do ácido orgânico produzido é uma característica específica de cada isolado fúngico e pode variar dependendo das condições de cultivo (GAIND, 2016).

A inoculação de fungos no solo em conjunto com fertilizantes contendo fósforo de alta ou baixa solubilidade melhora o crescimento da planta e pode aumentar o nível de fósforo disponível no solo através da mobilização de partículas de fósforo fixado no solo (MENDES et al., 2014).

Alguns fungos aumentam o crescimento das plantas através de vários mecanismos, incluindo a solubilização de nutrientes ligados ao solo e a produção de fitohormônios. Os metabólitos produzidos por fungos endofíticos também possuem propriedades antimicrobianas e inseticidas (PRIYADHARSINI; MUTHUKUMAR, 2017).

Geralmente, os fungos solubilizadores de fósforo produzem mais ácidos do que as bactérias e, consequentemente, apresentam maior atividade de solubilização de fósforo. Entre os fungos filamentosos que solubilizam rocha fosfática, os gêneros *Aspergillus*, *Mucor* e *Penicillium* são os mais representativos, embora cepas de *Trichoderma* e *Rhizoctonia solani* também tenham sido relatadas como solubilizadoras de fósforo. *Arthrobotrys oligospora* também tem a capacidade de solubilizar fosfato “in vivo”, bem como “in vitro” (ABHILASH, 2013; OLIVEIRA et al., 2009; XIAO et al., 2011a).

Os fungos do gênero *Trichoderma* são de vida livre altamente interativos e comuns nos ecossistemas do solo e raiz. São simbiontes de plantas oportunistas, avirulentos, além de serem parasitas de outros fungos. Produzem e excretam uma variedade de compostos que induzem respostas de resistência localizadas ou sistêmicas, e isso explica sua falta de patogenicidade para as plantas. As associações de microrganismos com raízes de plantas

causam mudanças substanciais tanto no proteoma (conjunto de proteínas e variantes de proteínas que podem ser encontrados numa célula específica quando sujeita a um certo estímulo) quanto no metabolismo da planta. A colonização da raiz por *Trichoderma* sp. aumenta frequentemente o crescimento e o desenvolvimento das raízes, a produtividade das culturas, a resistência ao estresse abiótico e a absorção e uso de nutrientes (HARMAN et al., 2004).

Os fungos do gênero *Trichoderma* encontrados no solo são agentes de controle biológico eficientes e amplamente utilizados, pois aumentam a absorção de nutrientes pelas plantas.

#### **2.6.1.1 *Trichoderma asperellum***

*Trichoderma asperellum* é um fungo filamentoso, frequentemente isolado de solo livre de raízes, lixo de solo, rizosfera de várias plantas, tecidos vegetais saudáveis, biomassa fúngica e madeira morta. Seu amplo espectro de substratos sugere um excelente oportunismo ambiental, além de ser um poderoso antagonista de outros fungos, pois é capaz de parasitar sobre eles ou inibir seu crescimento e desenvolvimento (JAKLITSCH, 2009).

García-López; Avilés e Delgado (2015) estudaram a contribuição de *T. asperellum* para adsorção de fósforo pela planta a partir de formas moderadamente fito-disponíveis, tais como fosfatos e fitatos de cálcio insolúveis. Os microrganismos aumentaram o teor total em fósforo de raízes de pepino independentemente da forma, além de melhorar a absorção total de fósforo por plantas. Concluiu-se que a solubilização de fosfatos de Ca de RF foi favorecida pelo efeito ligeiramente acidificante e pelo aumento da concentração de ânions orgânicos promovida pelo fungo nos meios de crescimento das plantas.

Doni e colaboradores (2017) desenvolveram um sistema de intensificação do arroz, demonstrando os vários efeitos positivos que foram atribuídos em parte às interações simbióticas entre as plantas de arroz e os microrganismos na rizosfera. No estudo avaliaram as relações simbióticas do fungo *T. asperellum* e os efeitos sobre a germinação, crescimento de mudas jovens e o desempenho das plantas de arroz durante o ciclo de cultivo.

#### **2.6.1.2 *Trichoderma harzianum***

*Trichoderma harzianum* é uma espécie encontrada em diferentes tipos de solos, adubo e vegetais em decomposição. Sua dominância no solo é devida à alta capacidade metabólica e

sua interrelação agressiva na competição por fontes de energia, sendo a espécie mais abundante desse gênero (RAHMAN et al., 2011).

Melo e Costa (2005) estudaram a formulação adequada de fungos para controle de fitopatógenos. Para realização do trabalho utilizaram uma formulação granulada a base de *T. harzianum* que mantivesse a estabilidade e viabilidade, avaliando vários polímeros e fontes nutricionais.

Estudos utilizando *T. harzianum* tem sido desenvolvidos, Gaind em 2016 realizou testes para verificar os mecanismos para dissolução de fosfato aplicados a culturas de trigo e verificou que o fungo empregava diferentes mecanismos para reduzir o pH e que a rocha fosfática era solubilizada pela produção de ácido cítrico, succínico, propiônico, málico e acético, produzidos pelo fungo. O trabalho de Gaind (2016) tinha como objetivos (i) avaliação de duas estirpes fúngicas (*Aspergillus niger* e *Trichoderma harzianum*) quanto ao seu potencial para solubilizar fosfatos inorgânicos insolúveis, como fosfato de cálcio triplo, fosfato de rocha Udaipur, fosfato férrico e fosfato de alumínio e mineralizar fósforo orgânico. (ii) Estudar o efeito da concentração de carbono na libertação fúngica de fósforo a partir de diferentes fontes de fósforo inorgânicas. (iii) Determinar os mecanismos envolvidos na solubilização de sais de fósforo orgânicos e inorgânicos. (iv) Avaliar as estirpes fúngicas para o ensaio de solubilização de sais de fósforo orgânicos e inorgânicos. E (iv) avaliar as estirpes fúngicas para o ensaio, concluindo que tanto o *Aspergillus niger* quanto o *Trichoderma harzianum* tem potencial como inoculantes para facilitar a alimentação de fósforo para diferentes culturas em solos alcalinos e ácidos com teor de fósforo orgânico e inorgânico.

### **2.6.1.3 *Trichoderma ressei***

Segundo Martinez e colaboradores (2008) *Trichoderma ressei* é a principal fonte industrial de celulases e hemicelulases usadas industrialmente para despolimerizar biomassas vegetais para obtenção de açúcares simples que são convertidos em intermediários químicos e biocombustíveis, como o etanol, realizando estudos com ênfase nas potenciais contribuições para a biotecnologia de combustíveis e outras aplicações industriais foram analisadas.

Dhillon e colaboradores (2011) avaliaram o potencial de resíduos agrícolas para a produção de celulase e hemicelulase utilizando culturas isoladas e associadas de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reseei*, e conseguiram atingir o objetivo da produção de enzimas hidrolíticas a baixa custo, além de gerir os resíduos que causariam problemas de poluição ambiental.

Trabalhos utilizando *Trichoderma reseei* para solubilização de RF, não foram encontrados na literatura.

### 2.6.2 – Bactérias

As bactérias são organismos unicelulares, procariotos e que podem ser autotróficas, aquelas que produzem sua própria energia a partir da fotossíntese ou quimiossíntese, ou heterotróficas, aquelas que necessitam da matéria orgânica e realizam fermentação ou respiração celular (aeróbia ou anaeróbia) (FUNKE; CASE; TORTORA, 2012).

Bactérias tem sido utilizadas como solubilizantes de fosfato, aumentando simultaneamente a produção de plantas e culturas. As espécies dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium*, estão entre os mais eficientes solubilizadores de fosfato (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999).

Yu e colaboradores (2017) obtiveram resultados experimentais que afirmam que as bactérias atuam principalmente através da secreção de mais de um polissacarídeo extracelular para agir contra o ambiente desvantajoso e a proteína extracelular talvez desempenhe um papel importante nas reações de oxidação-redução no sistema de biolixiviação.

A investigação de procedimentos utilizando autotróficos/heterotróficos para a solubilização do fósforo a partir de fosfatos insolúveis são considerados de grande importância na gestão sustentável do solo, podendo vir a ser, no futuro, uma alternativa aos atuais métodos de produção de fertilizantes industriais. Além disso, esta produção biológica de fertilizantes pode ser considerada mais ambientalmente correta do que os métodos de produção atuais (AVDALOVIC et al, 2015).

No presente trabalho foram testadas bactérias acidófilas (*Acidithiobacillus*), que são gram-negativas, não formam esporos, crescem sob condições aeróbias, são quimioautotróficos. As espécies de *Acidithiobacillus* oxidam o enxofre, ou seja, são capazes de obter energia pela oxidação de formas reduzidas de enxofre como o sulfeto de hidrogênio ou o enxofre elementar em sulfatos. Utilizam o dióxido de carbono da atmosfera como fonte de carbono para a síntese de novo material celular e produzem ácido sulfúrico (BOSECKER, 1997).

*Acidithiobacillus thiooxidans* e *Acidithiobacillus ferrooxidans* são conhecidas pela sua capacidade de oxidar o enxofre e sulfetos do solo e influenciar a solubilização de fosfatos inorgânicos. Estas bactérias têm também um bom potencial para melhorar o crescimento das plantas. Embora RF possa ser solubilizada com sucesso por estas bactérias, a baixa liberação de fosfato solúvel é um grande desafio. Assim, o aumento da liberação de fosfato solúvel a

partir da RF faria com que a utilização desta na agricultura fosse mais eficiente e econômica (BABANA et al., 2016).

*Bacillus* sp. são esporulados, Gram-positivos ou Gram variáveis, podem ser aeróbios ou aneróbios, as espécies *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. megaterium* são capsuladas. *Bacillus megaterium* é uma das bactérias solubilizantes de fosfato (PSB), tem uma elevada capacidade de secreção de ácidos orgânicos diretamente no meio circundante, uma vez que está faltando uma membrana celular externa (WYCISZKIEWICZ et al., 2016).

Wyciszkiewicz e colaboradores (2016) estudaram a possibilidade de produzir fertilizantes de fósforo a partir dos ossos de aves e de peixe, bem como a partir do fosforito de Marrocos, utilizando *Bacillus megaterium*. Os autores obtiveram resultados que confirmam a bioassolubilização de fósforo a partir de matérias-primas renováveis utilizando *Bacillus megaterium*.

Os membros do gênero *Pseudomonas* possuem grande diversidade metabólica, necessidades nutricionais mínimas e consequentemente encontram-se amplamente distribuídos no ambiente, solo e água. Embora as espécies do gênero sejam classificadas como aeróbicas, algumas são capazes de substituir o oxigênio pelo nitrato como acceptor final de elétrons (FUNKE; CASE; TORTORA, 2012). Vários estudos tem demonstrado que *Pseudomonas fluorescens* tem sido utilizado como um bioinoculante do solo, melhorando o crescimento de plantas por vários mecanismos como a produção de compostos antifúngicos, produção de hormônios e solubilização de fosfato (KATIYAR; GOEL, 2003).

Muitas espécies de bactérias, incluindo *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azorhizobium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, são utilizadas na agricultura para diferentes fins quer sob a forma de tratamento de sementes ou aplicação de solo (RATHI et al., 2015).

## 2.7 – Mecanismos de solubilização

A solubilização de fósforo por microrganismos pode ocorrer principalmente por dois mecanismos de ação sobre o meio. O primeiro é conhecido como mineralização, a qual é o processo de transformação do fósforo orgânico em fósforo inorgânico, que é a forma imediatamente assimilável e pela atividade enzimática específica das enzimas fosfatas que hidrolisam o fósforo orgânico presente em fitatos, fosfolipídios e ácidos nucléicos (NAHAS; TERENZI; ROSSI, 1982).

Estudos mostram que a solubilização dos fosfatos presentes no solo, em muitos casos ocorre devido à excreção de ácidos orgânicos sintetizados por microrganismos do solo, sendo

este o principal mecanismo de solubilização de fosfato mineral aceito, embora a base bioquímica exata destas transformações não seja completamente compreendida, carecendo de ser explorada (CHAUHAN et al., 2017).

A eficiência do processo de solubilização de rocha fosfática baseia-se em condições nutricionais e fisiológicas complexas e específicas dos microrganismos solubilizadores de fósforo (HAMDALI et al., 2010).

Os ácidos orgânicos podem contribuir para a solubilização de fosfato devido a diminuição do pH ou pela complexação dos cátions que estão ligados ao fósforo. O mecanismo de complexação de cátions pode ser importante na solubilização de fósforo, nos casos em que a estrutura do ácido orgânico é complexa (WHITELAW; HARDEN; HELYAR, 1999). Os ácidos orgânicos podem agir como acidificantes do meio ou como agentes quelantes ou complexantes, formando compostos com cálcio, ferro e alumínio (WHITELAW, 2000).

A eficiência de um determinado ácido orgânico depende das características químicas do ácido produzido, tais como a quantidade e a posição dos grupos carboxílico e hidroxila, a constante de estabilidade do complexo ácido metal-orgânico, a concentração de ácido, a concentração e o tipo de metais em solução e o pH da solução (MENDES et al., 2014).

Segundo Illmer e Schinner (1992), a produção de ácidos orgânicos não é o principal mecanismo envolvido na solubilização de fosfatos. Esses autores consideram a possibilidade de acidificação do meio pela liberação de prótons  $H^+$  a partir do processo de troca catiônica ou da cadeia respiratória.

Branco, Murgel e Cavinatto (2001) citam um mecanismo inespecífico, que causa a acidificação do meio pela formação de  $H_2CO_3$ , a partir da presença de gás carbônico resultante da atividade respiratória e da decomposição da matéria orgânica. A solubilização depende de fatores como o tipo de fosfato, a natureza da fonte de nitrogênio e a fonte de carbono presente (SILVA FILHO; VIDOR, 2001).

## 2.8 – Biorreatores

Biorreatores são reatores químicos nos quais ocorrem uma variedade de reações químicas catalisadas por “biocatalisadores”, que podem ser enzimas ou células vivas. Em reatores utilizando microrganismos é importante destacar que, do ponto de vista da engenharia, os reatores podem ter características bastante distintas dependendo do tipo de microrganismo utilizado. Em geral reatores onde o processo é desenvolvido com bactérias ou leveduras

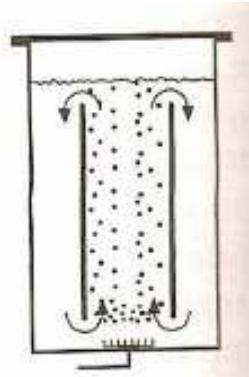
apresentam comportamento reológico distinto daqueles que empregam fungos filamentosos (SCHMIDELL et al., 2001).

Diante dos diversos modelos existentes de biorreatores, os mais comumente empregados em cultivos de microrganismos e células, são os biorreatores convencionais tipo tanque agitado e aerado e os biorreatores não-convencionais pneumáticos, tipo “coluna de bolhas” e tipo “*air lift*” (CERRI, 2005).

### **2.8.1 – Biorreatores do tipo *Air lift***

O *air lift*, Figura 1, é um biorreator utilizado na fermentação industrial em batelada que promove ligação entre o líquido do topo e da base, com direcionamento do gás de modo a obter turbulência e autocirculação, permitindo a transferência de oxigênio. Este tipo de reator pode proporcionar processos de produção de microrganismos em grande escala, sem limitação de oxigênio local, além de apresentar forças de cisalhamento muito baixas, preservando os tecidos, principalmente os micelianos que se apresentam mais frágeis. A aeração é fator importante para que se obtenha uma maior formação de massa celular viável durante o processo fermentativo. A injeção do gás serve para agitar e aerar, eliminando o gasto de energia para agitação, e promovendo um aumento na capacidade de transferência de massa e calor. Este equipamento é de construção simples e econômica, possibilitando uma manutenção fácil e barata, podendo representar uma alternativa ao processo industrialmente mais utilizado, o sistema em batelada contínua, tendo em vista, especialmente, a economia de energia, um dos principais custos do processo industrial (MULLER et al., 2007).

O termo *air lift* abrange um amplo conjunto de dispositivos que são caracterizados pela circulação de fluidos em um padrão cíclico, onde o conteúdo é pneumaticamente agitado por uma corrente de ar ou outros gases, ou seja, o meio de cultura é deslocado no sentido ascendente impulsionado pelo deslocamento de bolhas de ar que são alimentadas pelo aspersor localizado ao fundo do vaso, retornando no sentido descendente por uma região distinta da região de subida. Além da agitação, o fluxo de gás tem a importante função de facilitar o intercâmbio de material entre a fase gás/ meio (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2011).



Fonte: (SCHMIDELL et al., 2001)

Figura 1 – Exemplo de reator do tipo *air-lift*

### 2.8.2 – Biorreatores do tipo Rotativo

O reator do tipo rotativo, Figura 2, é constituído basicamente por um cilindro horizontal cujo interior é preenchido parcialmente com substrato sólido e a aeração realizada na parte superior. A agitação é controlada e favorece a transferência de massa e calor dentro do cilindro permitindo a distribuição uniforme dos nutrientes adicionados durante o processo. A agitação não deve ser excessiva, levando em conta o tipo de organismo e substrato que será utilizado. O uso de microrganismos neste tipo de reator se restringe aos que toleram agitação contínua (SALLES, 2013).

Este tipo de reator destaca-se como biorreator por apresentar razoável transferência de calor, além de ser empregado para a fermentação em estado sólido que proporciona a difusão de oxigênio no interior do meio reacional e dissipação de gases oriundos do metabolismo microbiológico, favorecendo assim o crescimento celular (MITCHELL et al., 2006).



Fonte: [www.innovabr.com/tecnologia](http://www.innovabr.com/tecnologia)

Figura 2 – Reator do tipo tambor rotativo

Ao estudar bioprocessos com fungos filamentosos, os reatores do tipo tambor rotativo podem não ser indicados, devido ao rompimento do micélio, interferindo negativamente na atividade microbiana e comprometendo a produtividade (RODRÍGUEZ COUTO; SANROMÁN, 2005). Assim o emprego do biorreator do tipo rotativo é indicado somente em condições restritas, além do uso ser restrito a microrganismos que tolerem agitação contínua.

---

## CAPÍTULO 3

### MATERIAL E MÉTODOS

---

Neste capítulo será apresentado o material utilizado no desenvolvimento experimental deste trabalho, bem como a metodologia empregada para tal.

#### **3.1 – Materiais**

##### **3.1.1 - Rocha fosfática**

A rocha fosfática utilizada neste trabalho foi o Concentrado de Rocha Fosfática ultrafino (fluorapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ ), doado pela Vale Fertilizantes Complexo Industrial de Uberaba, localizada na região do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais. O Concentrado de Rocha Fosfática apresentava composição conforme mostrado na Tabela 1, de acordo com dados fornecidos pela empresa e checados no laboratório da Faculdade de Engenharia Química-UFU. A porcentagem de  $\text{P}_2\text{O}_5$  representa 155,86 mg de P/g de concentrado fosfático. As partículas, previamente caracterizadas, apresentaram as seguintes porcentagens de massa retida acumulada em Malhas Tyler: #100 (0%), #200 (2%), #325(12%) e #400 (100%). O armazenamento da rocha foi em recipientes de polipropileno devidamente vedados sob refrigeração a temperatura de  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ , segundo recomendação do fornecedor.

Tabela 1 – Composição percentual do concentrado de rocha fosfática

<b>Componente</b>	<b>%</b>
$\text{P}_2\text{O}_5$	35,7
$\text{Fe}_2\text{O}_3$	<6,5
$\text{Al}_2\text{O}_3$	<0,5
$\text{MgO}$	<0,5
$\text{TiO}$	0,5
$\text{SiO}_2$	1 a 2,5
Fe	<2,5
CaO	42 a 45

A Figura 3 apresenta uma amostra do concentrado de rocha fosfática empregado neste estudo.



Figura 3 – Concentrado de rocha fosfática – Fonte: Autor

### **3.1.2 – Biomassa para fermentação em estado sólido**

Bagaço de cana-de-açúcar, pré-tratado com explosão a vapor, na condição de baixa severidade ( $12 \text{ kgf/cm}^2$ , 8min), gentilmente fornecido pelo CTC (Centro de Tecnologia Canavieira) – Piracicaba/SP, foi empregado nas etapas de fermentação em estado sólido (Figura 4). A biomassa foi estocada sob refrigeração ( $5 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Previamente aos experimentos a biomassa foi lavada com água destilada e em seguida levada para a estufa a  $100 \pm 0,5^\circ\text{C}$  para secagem até peso constante. A quantidade de massa necessária em cada experimento foi pesada e esterilizada via vapor saturado em autoclave à pressão de  $1,0 \text{ kgf/cm}^2$ , a temperatura de  $120^\circ\text{C}$  durante 20 minutos, e posteriormente levada a estufa a  $90 \pm 1,0^\circ\text{C}$  por 24 horas.



Figura 4 - Bagaço de cana de açúcar pré tratado com explosão a vapor – Fonte: Autor

### 3.1.3 – Microrganismos

Três espécies de fungos do gênero *Trichoderma* e uma espécie do gênero *Penicillium* foram testadas. Os fungos do gênero *Trichoderma* foram coletados pelo grupo de pesquisa do Núcleo de Processos Bioquímicos (NUCBIO) da Faculdade de Engenharia Química (FEQ) - UFU, em regiões do cerrado e oriundos de região de rocha fosfática. O fungo do gênero *Penicillium*, assim como as bactérias do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas* foram doação da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. As bactérias estudadas foram três espécies de *Bacillus*, uma de *Pseudomonas* e duas acidófilas conforme listadas na Tabela 2. As bactérias acidófilas, do gênero *Acidithiobacillus*, foram gentilmente doadas pela Professora Doutora Denise Bevilaqua do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química (Laboratório de Biohidrometalurgia) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"- Campus Araraquara/SP.

Tabela 2 - Microrganismos utilizados

Microrganismo	Espécie	Origem
Fungos	<i>Trichoderma asperellum</i>	Região de rocha fosfática
	<i>Trichoderma harzianum</i>	Região de rocha fosfática
	<i>Trichoderma ressei</i>	Região do cerrado
	<i>Penicillium oxalicum</i>	Fundação Oswaldo Cruz
Bactérias	<i>Bacillus megaterium</i>	Fundação Oswaldo Cruz
	<i>Bacillus subtilis</i>	Fundação Oswaldo Cruz
	<i>Bacillus licheniformis</i>	Fundação Oswaldo Cruz
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Fundação Oswaldo Cruz
	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Laboratório de
	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	Biohidrometalurgia da
		Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

### 3.1.4 – Melaço de soja

Melaço de soja foi utilizado na preparação de soluções com concentração de 50 g/L para crescimento dos fungos nos testes iniciais.

### 3.2 - Metodologia dos experimentos

#### 3.2.1 - Experimentos realizados com fungos

Com o intuito de demonstrar o passo a passo dos testes realizados ao longo deste trabalho, fluxogramas foram elaborados com as etapas desenvolvidas, como mostrado nas Figuras 5 e 9. A Figura 5 mostra o fluxograma dos experimentos realizados com fungos em reatores cônicos de bancada e biorreatores do tipo tambor rotativo.

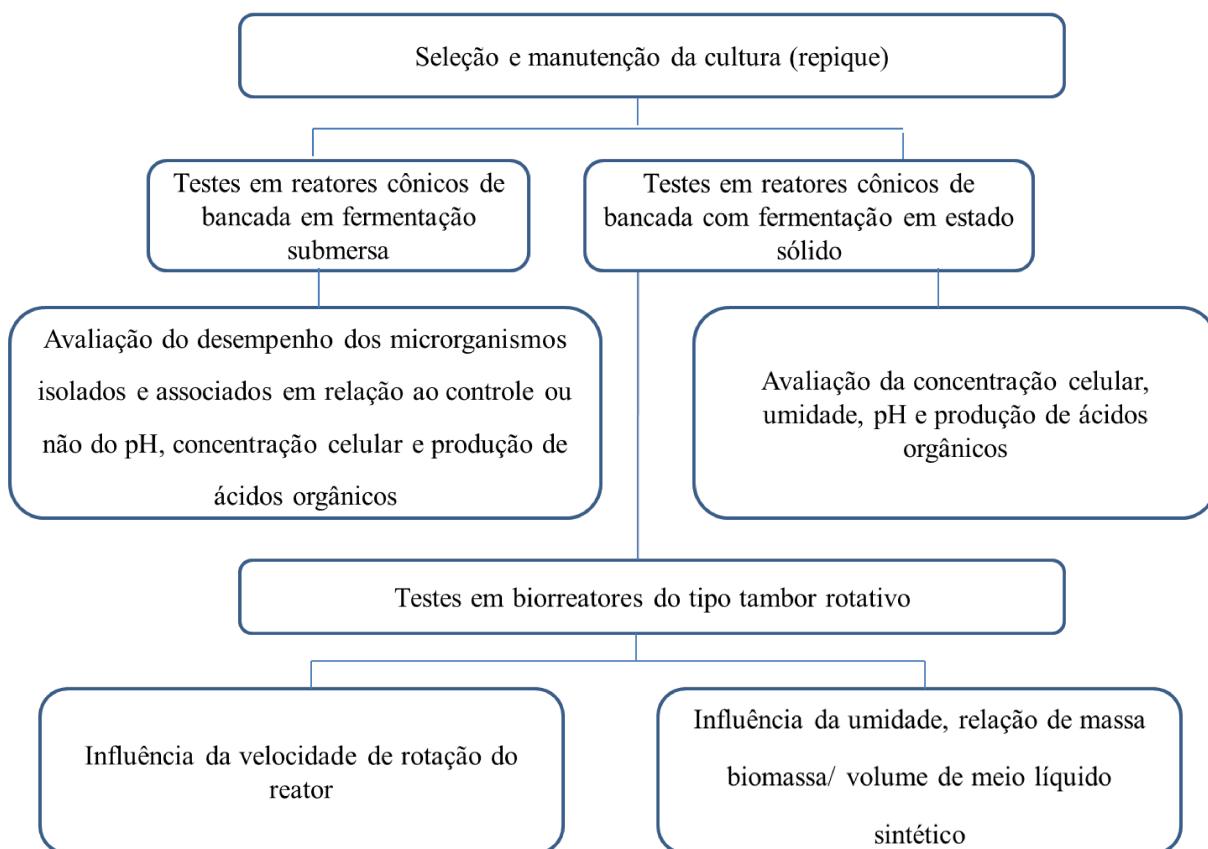


Figura 5 – Fluxograma dos testes utilizando fungos em biorreatores cônicos de bancada e em biorreatores do tipo tambor rotativo.

##### 3.2.1.1 – Seleção e manutenção da cultura

Microrganismos foram coletados e isolados de uma região fosfática e testes preliminares foram realizados por Cabral (2016). A partir dos resultados, os microrganismos foram enviados para a Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, Campinas – SP para identificação. foram identificados como *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma harzianum*. Como os microrganismos isolados da região fosfática foram identificados como sendo do gênero *Trichoderma*, uma outra espécie de mesmo gênero, o *Trichoderma ressei*, do

banco de microrganismos do NUCBIO - FEQ - UFU, foi escolhido para avaliação. Foi testado também o fungo *Penicillium oxalicum*. Vale salientar que, os microrganismos foram testados isoladamente e em associação, visando verificar a eficiência das culturas puras e em associação.

Para manutenção e crescimento, os fungos foram repicados em placas de Petri contendo meio sintético seletivo sólido para fungos (Tabela 3) e cultivados por um período de 4 a 7 dias a  $27 \pm 3^\circ\text{C}$ .

Tabela 3 - Meio sintético seletivo sólido (PIKOVSKAYA, 1948)

Reagente	Concentração (g/L)
Dextrose	10
Ágar	15
Extrato de Levedura	0,5
Fosfato Tricálcio	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

### 3.2.1.2 – Testes em reatores cônicos de bancada com fermentação líquida

Foram realizados testes em reatores cônicos de bancada com fermentação líquida, conforme Figura 6, para avaliação da eficiência do processo de biossolvabilização, concentração celular, pH e produção de ácidos orgânicos.



Figura 6 – Reator cônico de bancada com fermentação líquida

Os microrganismos foram inoculados em reatores cônicos de bancada com capacidade de 500 mL contendo 100 mL de meio sintético seletivo líquido (Tabela 4) e 5 g/L de rocha. Os reatores foram devidamente fechados com rolhas de algodão e gaze e esterilizados em autoclave por 20 minutos a 1 atm e 121°C. Nos testes realizados em fermentação líquida, foram realizados ensaios com controle do pH, nos quais foram acrescentados solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1N), também foram realizados testes em que o pH foi apenas monitorado. Para realização das análises, o meio foi centrifugado e feitas determinações de pH, fósforo solúvel e ácidos orgânicos no sobrenadante.

Tabela 4 - Meio sintético seletivo líquido modificado (SAMPAIO et al., 2003)

Reagente	Concentração (g/L)
Dextrose	10
Extrato de levedura	0,5
Concentrado de rocha fosfática	variável
Sulfato de Magnésio	0,1
Sulfato de Amônio	0,5
Sulfato ferroso	0,0001
Sulfato de Manganês	0,001

Para avaliação da eficiência do processo de biossobilização da rocha fosfática, foram utilizados os microrganismos de forma isolada e em associação. Parâmetros tais como concentração celular, pH e produção de ácidos foram analisados e acompanhados ao longo de todos os testes.

### 3.2.1.3 - Testes em reatores cônicos de bancada com fermentação em estado sólido (FES)

Foram realizados testes em reatores cônicos de bancada em FES, de acordo com a Figura 7 para avaliação da eficiência do processo de biossobilização, concentração celular, pH e produção de ácidos orgânicos.



Figura 7 – Reatores cônicos de bancada em FES

A fermentação em estado sólido foi realizada em reator cônico de bancada contendo 6g de bagaço de cana tratado, previamente lavado, seco e esterilizado. A injeção líquida do meio (Item 3.2.1.2) na fermentação em estado sólido, correspondeu a uma umidade inicial de 85 e 50%, nas quantidades de 50 e 10 mL contendo 5 g/L de rocha. Nesse meio os microrganismos foram inoculados de forma isolada e em associação. As análises relacionadas aos experimentos foram feitas do líquido extraído. O método de extração adotado consiste na adição de meio líquido (Item 3.2.1.2) ao bagaço, sendo extraído por pressionamento do bagaço. O volume do extraído foi quantificado e analisado. As análises de concentração de células, fósforo solúvel, pH e formação de ácidos orgânicos foram realizados ao longo dos experimentos, com duração de até 15 dias.

Após os testes em reatores cônicos de bancada, avaliou-se a fermentação sólida, utilizando a associação dos *T. asperellum*, *T. harzianum* e *T. ressei* em umidade inicial de 50% .

### **3.2.1.4 – Testes em biorreatores do tipo tambor rotativo**

Os testes em reator do tipo tambor rotativo foram realizados em unidade experimental mostrada na Figura 8, sendo as dimensões 6,5 cm de diâmetro interno e 16 cm de comprimento. Utilizou-se 40 gramas de bagaço de cana, previamente lavado, esterilizado e seco em estufa, conforme já mencionado. Foram inoculados com a associação dos três microrganismos do gênero *Trichoderma* para avaliar a influência da umidade inicial.



Figura 8 – Unidade experimental com tambor rotativo

Para avaliação da umidade inicial, as quantidades de meio líquido sintético contendo 5 g/L de rocha fosfática foram variadas, sendo testadas 45 e 50 mL o que representa 40 e 50% de umidade inicial. A linha de ar foi conectada a um kitassato contendo água, ocorrendo borbulhamento da água e arraste de ar úmido que foi passado na linha, com o intuito de manter a umidade dentro do reator. A aeração foi constante, porém foram intercalados períodos de ar seco e períodos de ar úmido com a velocidade do ar de 1,90 m/s.

As mesmas condições operacionais foram aplicadas, utilizando a condição de umidade de 40% para avaliar a influência da velocidade de rotação do reator.

### 3.3.2 – Experimentos realizados utilizando bactérias

A Figura 9 apresenta o fluxograma dos testes realizados utilizando bactérias em biorreator cônico de bancada e em biorreator do tipo *air lift*.

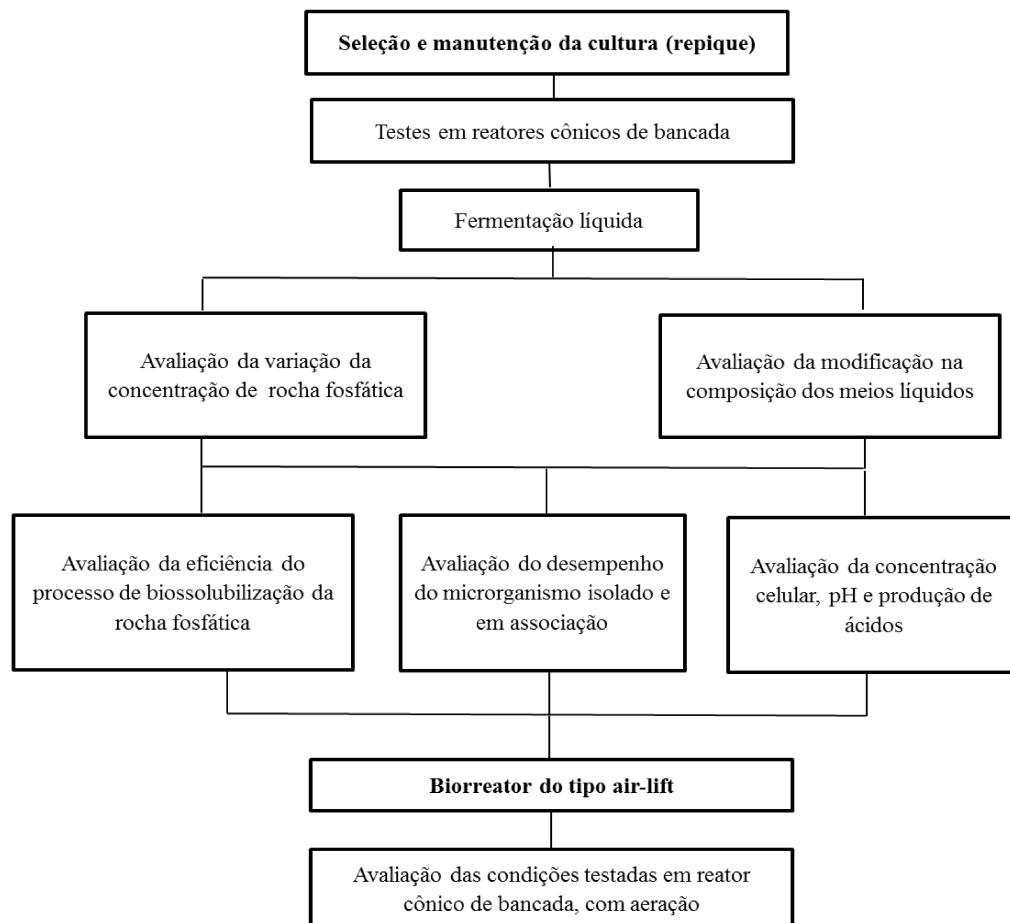


Figura 9 - Fluxograma dos testes com bactérias e realizados em biorreatores cônicos de bancada e do tipo *air lift*.

### 3.3.2.1 – Seleção e manutenção das culturas (repique)

A partir de estudo da literatura, foi verificado que entre as bactérias solubilizadoras de fosfato encontram-se as do gênero *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Acidithiobacillus*. As espécies *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis* e *Pseudomonas fluorescens* foram cultivadas em placa Petri contendo meio sólido caldo nutritivo (Tabela 5) e o *Bacillus subtilis* foi cultivado em meio Luria Bertani (LB) (Tabela 6), preparado conforme Sambrook e Russel (2001).

Tabela 5 - Composição no meio caldo nutritivo (SAMBROOK; RUSSELL, 2001)

Reagente	Concentração (g/L)
Extrato de carne	3
Peptona de carne	10
Fosfato de potássio dibásico	1
NaCl	5
Ágar	30

Tabela 6- Composição do meio LB (SAMBROOK; RUSSELL, 2001)

Reagente	Concentração (g/L)
Triptona	10
Extrato de levedura	5
NaCl	5
Ágar	20

As bactérias acidófilas *Acidithiobacillus ferrooxidans* e a *Acidithiobacillus thiooxidans* foram cultivadas em meio T&K e meio 9K, respectivamente (Tabela 7 e 8).

Tabela 7 - Composição meio T&amp;K (TUOVINEN; KELLY, 1973).

Solução	Reagente	Quantidade (g)
A (800 mL)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	0,5
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5
B (200 mL)	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	33,3

Observação: pH=1,8, ajustado com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1N.

Tabela 8 - Composição meio de cultura 9K (SILVERMAN; LUNDGREN, 1959).

Reagente	Concentração (g/L)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	0,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,0
KCl	0,1
S°	10

Observação: pH=2,8, ajustado com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1N.

### 3.3.2.2 – Experimentos realizados em reatores cônicos de bancada

Com objetivo de avaliar a concentração de rocha utilizando bactérias em fermentação líquida os testes foram realizados em reatores cônicos de bancada, com 20% do volume de meio líquido (Item 3.2.1.2), diferentes concentrações de rocha foram testadas (2; 3,5; 5 e 10 g/L) ao longo de todos os experimentos. Os reatores foram agitados em mesas agitadoras com rotação de 150 rpm. Amostras foram retiradas em intervalos de tempo pré-determinados por testes preliminares, nos quais foram verificados o equilíbrio para o sistema e as análises de massa seca, pH, fósforo solúvel e produção de ácidos orgânicos foram avaliados.

Para avaliação da influência da composição do meio líquido sintético, fermentações líquidas foram realizadas em reatores cônicos de bancada, com 20% do volume de meio

líquido. A eficiência do processo utilizando os meios líquidos (Item 3.2.1.2), meio caldo nutriente modificado (fosfato de potássio dibásico foi retirado e acrescentado 5 g/L de rocha fosfática, além de reduzir os sais pela metade) e meio fosfato simples foram avaliados. Os reatores foram agitados em mesas agitadoras com rotação de 150 rpm. Amostras foram retiradas periodicamente para determinação de pH, massa seca, fósforo solúvel e produção de ácidos orgânicos.

### 3.3.2.3 – Experimentos realizados em biorreatores do tipo *air lift*

Após os testes realizados em reatores cônicos utilizando bactérias em fermentação líquida, foram testados biorreatores do tipo *air lift* para avaliação do desempenho da eficiência para esta configuração de reator, Figura 10. O reator possui dimensões de 12 cm de diâmetro interno e 33,5 cm de comprimento, com capacidade total de 3,5 litros. Nos experimentos executados em reator do tipo *air lift*, foram testadas alguma das bactérias isoladamente e em associação em meio caldo nutriente modificado e meio sintético líquido seletivo, semelhante aos testes realizados em reatores cônicos de bancada porém, com aeração de 350cm<sup>3</sup>/min, para comparação da eficiência atingida e análise da variação do tipo do reator no processo.

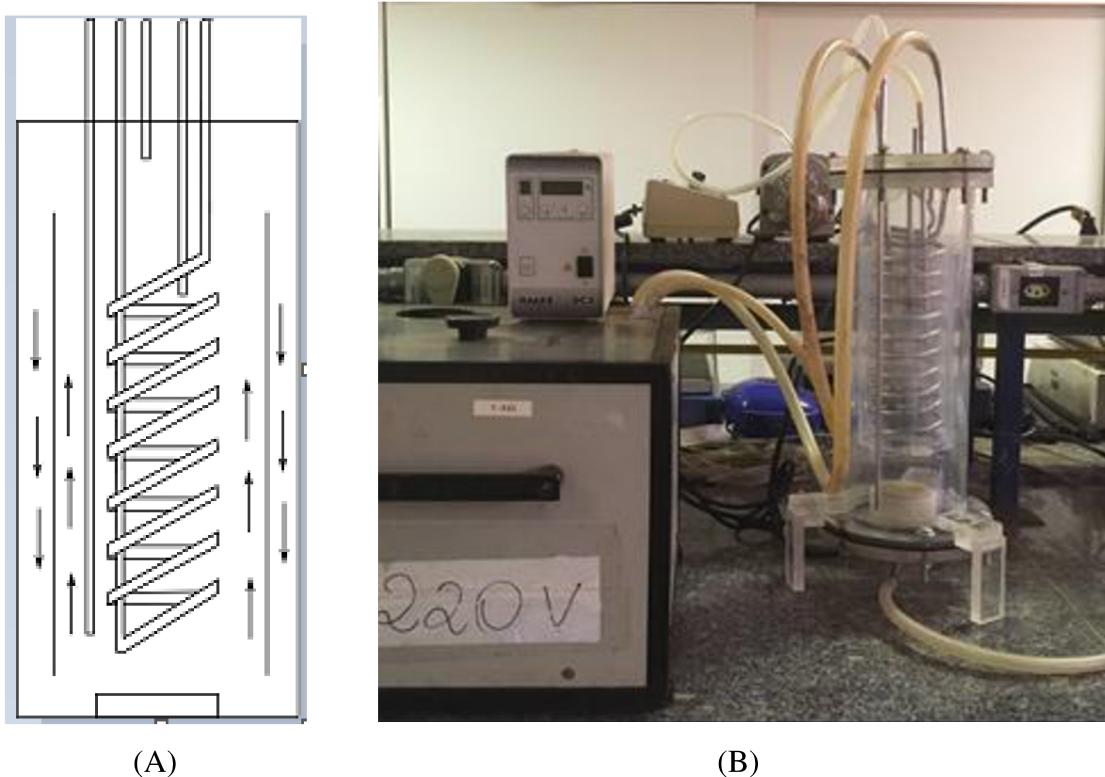


Figura 10 – Esquema do reator *air lift* (A) e foto da unidade experimental (B).

### **3.3.3 – Metodologia analítica**

#### **3.3.3.1 – Determinação de fósforo total – Método colorimétrico**

A determinação do fósforo total foi realizada de acordo com os procedimentos descritos em APHA - AWA - WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. Washington, D.C.: American Public Health Association, 1998, - part 4000 Inorganic nonmetallic constituents, 4500 – Phosphorus.

A metodologia utilizada tem como base o seguinte conceito: uma solução de ortofosfato reage com o molibdato de amônio e com vanádio para formação do ácido vanadomolibdatofosfórico, de coloração amarela. A intensidade da cor amarela é proporcional à concentração do fósforo. A faixa de trabalho do método é de 1 a 10 mg/L de fósforo em comprimento de onda de 420 nm.

#### **3.3.3.2 – Determinação de células**

A concentração celular (densidade microbiológica) para fungos e bactérias foi determinada pelo cálculo de massa seca, obtida pela centrifugação (centrífuga da marca Beckman J-25 com rotação igual a 8000 rpm – 12.096 g) de um volume conhecido da amostra (2, 5 ou 10 mL). O sobrenadante foi reservado para análises posteriores e o corpo de fundo ressuspendido com água destilada e colocado em recipiente previamente tarado, seguida da introdução do sistema (recipiente + células) em estufa a  $90 \pm 1,0$  °C. Após 24 horas, o recipiente foi acondicionado em dessecador com sílica gel até resfriamento e, posteriormente, foi pesado. Este procedimento foi repetido até a verificação de peso constante para a medida da massa celular seca. A diferença de massa correspondeu à massa de células presente no volume de suspensão celular.

#### **3.3.3.3 – Determinação do pH**

O pH foi medido através do pHmetro Gehaka de bancada, previamente calibrado.

#### **3.3.3.4 – Determinação da umidade na fermentação sólida**

Uma porção do bagaço, depois de adicionado o meio líquido, foi colocado em recipiente previamente tarado e levado para estufa a  $90 \pm 1,0$  °C. Após 24 horas, o recipiente foi acondicionado em dessecador com sílica gel até resfriamento e, posteriormente, foi pesado. Este procedimento foi repetido até a verificação de peso constante para a medida da massa da

porção de bagaço seco. A partir da diferença de massa foi calculado o percentual de umidade no processo.

### **3.3.3.5 – Determinação de ácidos orgânicos por HPLC**

As análises das concentrações dos ácidos produzidos pelos microrganismos ao longo dos testes foram realizadas por HPLC (High Performance Liquid Chromatography), marca Shimadzu modelo LC-20A Prominence, coluna SUPELCOGEL C-610H, no qual os componentes foram separados e detectados por análise em detector ultravioleta(UV) a 210 nm. Empregou-se como fase móvel ácido fosfórico (0,1%), com fluxo de 0,5 mL/min, temperatura do forno a 32°C e volume de injeção de 20 µL. As concentrações de ácidos foram calculados com auxílio de curvas padrão realizadas previamente.

### **3.3.3.6 – Cálculo de concentração inicial de P**

Tem-se pela composição da rocha que o teor de  $P_2O_5$  é de 35,7%. Assim para a concentração de 1 g/L de rocha no meio líquido, levando em consideração que o volume de meio utilizado nos reatores cônicos de bancada foi de 100mL deste meio, tinha-se que 0,1 g de rocha estava presente em cada reator.

Se 35,7% da rocha é composta por  $P_2O_5$ , tem-se:

$$0,1g \text{ de rocha} \times \frac{35,7}{100} = 0,0357g \text{ de } P_2O_5$$

Fosfato de potássio reage com a água segundo a equação,  $P_2O_5 + 3H_2O \rightarrow 2H_3PO_4$ , fazendo o balanço estequiométrico tem-se que 142 g de  $P_2O_5$  formam 196 g de  $H_3PO_4$ , logo para 0,357 g de  $P_2O_5$  haverá a formação de 0,0493 g de  $H_3PO_4$ .

A massa molar do  $H_3PO_4$  é igual a 98 g, sendo 95 g de  $P_2O_4^{-3}$ , tem-se 0,0493 g de  $H_3PO_4$  no sistema, logo a massa de  $P_2O_4$  é igual a 0,0478 g/100 mL de meio sintético seletivo líquido, o que significa uma concentração de 0,478 g/L de  $P_2O_4^{-3}$ . Se em 95 g de  $P_2O_4^{-3}$  há 31 g de P, em 0,478 g/L de  $P_2O_4^{-3}$  tem 155,8 mg de P/L de solução de meio sintético líquido contendo 1g de rocha.

---

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os principais resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho. Inicialmente, apresentam-se os resultados e discussão dos testes utilizando fungos isoladamente e em associação, a variação na composição do meio, as condições experimentais para fermentação submersa e em estado sólido. Para a FES foi avaliada a porcentagem de umidade inicial do meio e na sequência tais condições foram testadas no reator do tipo tambor rotativo. Em seguida, os resultados e discussão da biossolvilização utilizando bactérias isoladas e co-culturas, empregando reator cônico e reator do tipo *air lift* foram apresentados. Os resultados obtidos para os parâmetros avaliados tais como pH, quantidade de biomassa, concentração de fósforo solúvel e quantidade de ácidos orgânicos produzidos serão apresentados.

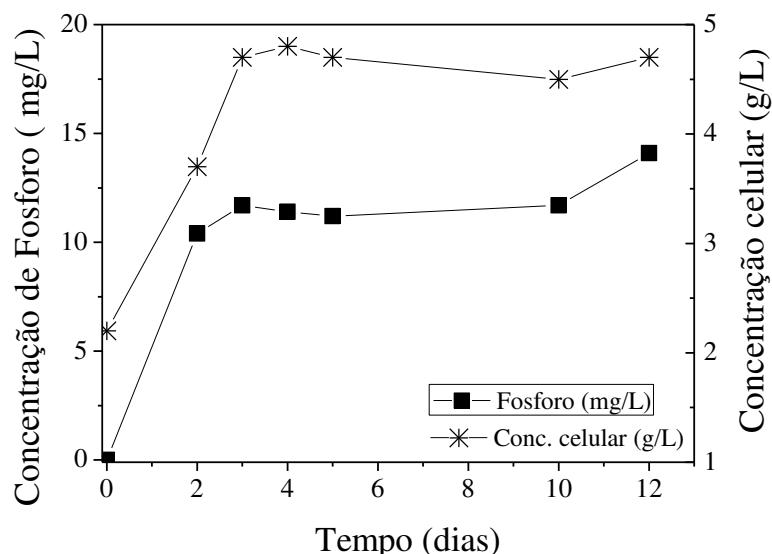
#### **4.1 - Fermentações líquidas preliminares**

Foram realizados testes utilizando os microrganismos isolados, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma ressei*, *Trichoderma harzianum*, *Penicillium oxalicum* e com a associação das três cepas do gênero *Trichoderma*. Vale salientar que, para os experimentos em que o pH do meio não foi ajustado, apenas monitorado, o crescimento em meio líquido foi realizado com concentração de melaço de soja de 50 g/L. Após o crescimento, o meio foi centrifugado e o microrganismo foi inoculado no meio líquido ( Item 3.2.1.2) contendo 5 g/L de rocha fosfática. Nos experimentos com correção de pH foi acrescentado solução de ácido sulfúrico 1 N.

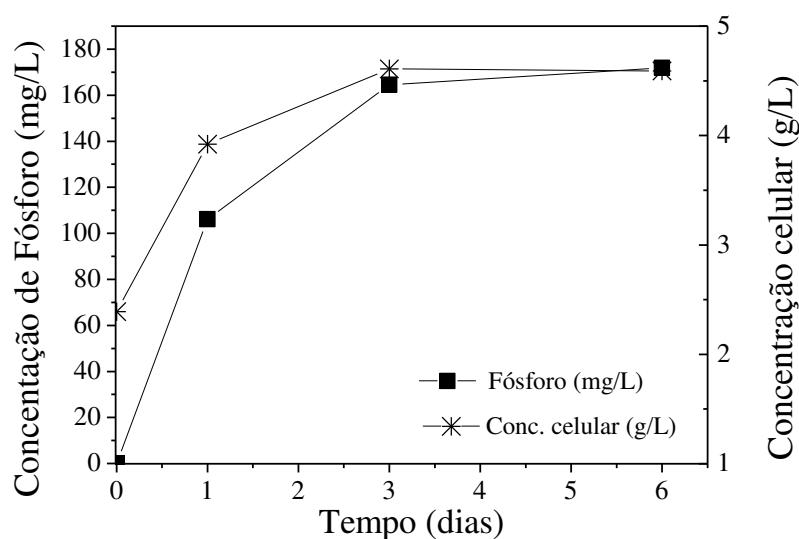
Nos experimentos sem correção de pH empregando as culturas de *T. asperellum* e *T. harzianum*, inicialmente foi verificado o pH de 4,2 e verificado um aumento gradativo durante o processo chegando a 7,5 no décimo segundo dia. Nos experimentos com correção de pH para a cultura de *T. asperellum* o valor permaneceu em  $3,6 \pm 0,2$  durante todo o processo.

As Figuras de 11 a 14 mostram os resultados de crescimentos celular e concentração de fósforo obtida pelo processo de biolixiviação de rocha fosfática empregando os microrganismos *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. ressei* e a associação dos três respectivamente sem e com correção de pH. Nesta ordem são representados pelo comportamento dos gráficos A e B.

Ao analisar a Figura 11, verifica-se que o ensaio com controle de pH apresentou um crescimento celular semelhante ao sem controle de pH no terceiro dia. Além disso, verifica-se que no ensaio sem controle de pH no décimo dia os valores de crescimento de células apresentou uma queda.



(A)



(B)

Figura 11 - Crescimento do microrganismo *T. asperellum* no meio com 5 g/L de rocha e fósforo; (A) sem ajuste de pH e (B) com ajuste de pH.

Estes resultados indicam que o controle do pH pouco afetou o crescimento celular e verifica-se que as curvas para concentração celular e fósforo solúvel apresentam mesmo comportamento. A máxima obtenção de fósforo no experimento com controle de pH foi de

171,9 mg/L, 22,1% de eficiência e ocorreu no terceiro dia. Para o teste sem ajuste do pH a solubilização foi de 13,2 mg/L, eficiência de 1,7%, ocorrido no terceiro dia. Ao comparar os dois testes observa-se um aumento de 1202,3% do teste com ajuste de pH para o teste sem ajuste do pH . Estes resultados indicam a importância de meios ácidos no processo de biolixiviação do fósforo. O tempo para atingir a máxima solubilização foi de três dias, com pouca variação ao longo dos dias subsequentes.

No experimento utilizando *T. harzianum* com controle do pH, este permaneceu em 3,8 ± 0,2 e para o teste sem controle do pH a variação foi igual a observada pra o teste utilizando *T. asperellum*, 4,2 aumentado gradativamente a 7,5. Na Figura 12 observa-se que o ensaio com controle de pH apresentou um crescimento celular semelhante ao sem controle de pH no sexto dia, como observado no ensaio para *T. asperellum*. Comportamento semelhante de queda do crescimento celular verificado para *T. asperellum* também foi verificado para *T. harzianum* com queda de crescimento observada no décimo dia de processo.

Estes resultados indicam que o controle do pH também pouco afetou o crescimento celular do *T. harzianum*, sendo possível também a verificação do mesmo comportamento para as curvas de quantidade de biomassa e quantidade de fósforo solúvel. A obtenção de fósforo para o *T. harzianum* no experimento com controle de pH foi igual a 207,2 mg/L, enquanto que nos testes sem ajuste do pH a solubilização foi de 44 mg/L. Analisando os dois experimentos realizados tem-se um aumento de 370,9% do teste com controle do pH em relação ao sem controle. O mesmo comportamento que foi verificado para o *T. asperellum* ocorreu para o *T. harzianum* confirmado assim a importância de meios ácidos no processo de biolixiviação do fósforo. Além disso observa-se aumento de eficiência máxima no quarto dia e posterior estabilização no decorrer do processo.

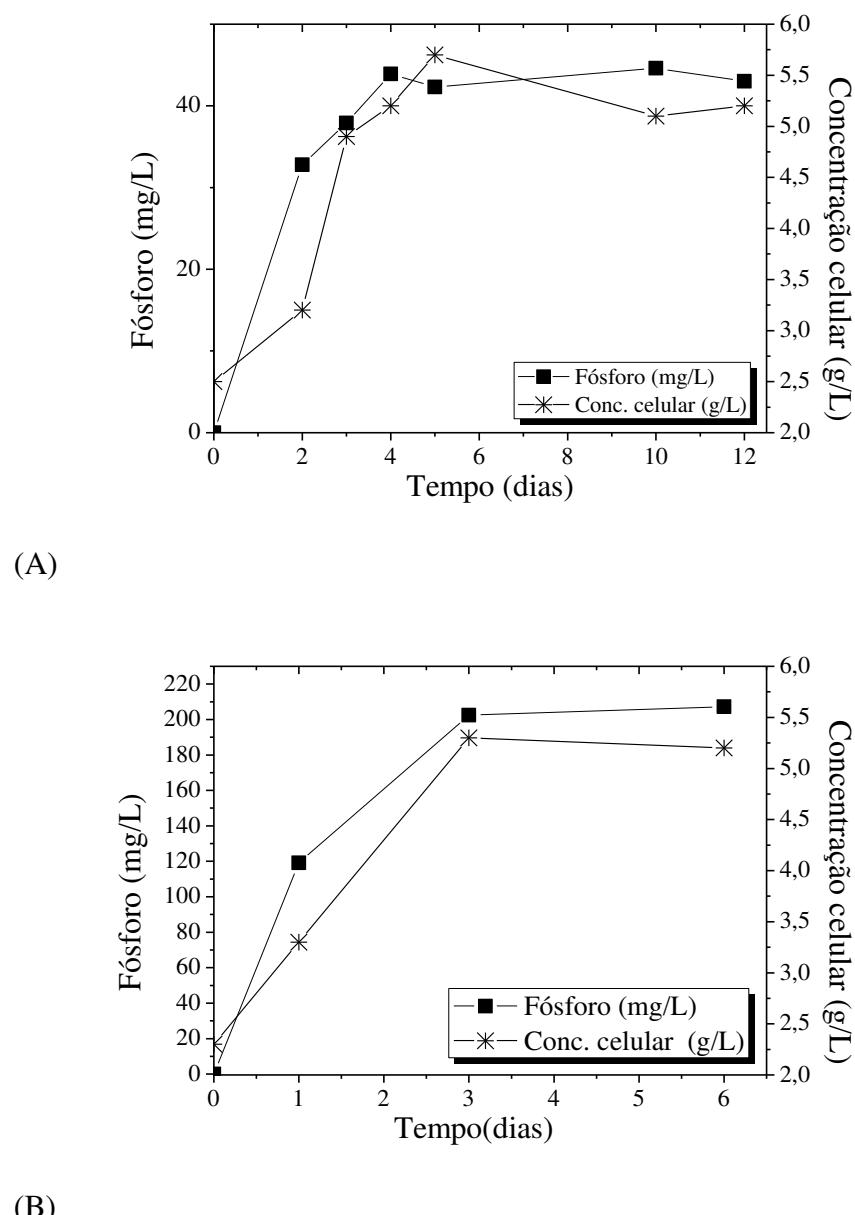
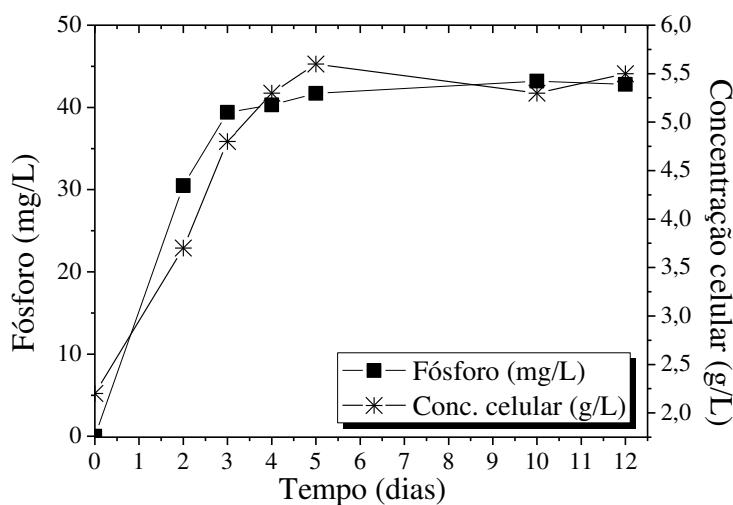


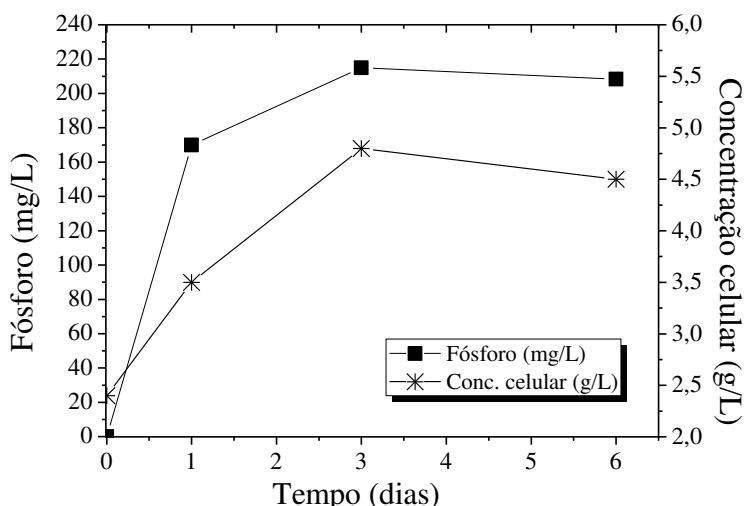
Figura 12 - Crescimento do microrganismo *T. harzianum* no meio com 5 g/L de rocha e fósforo; (A) sem ajuste de pH e (B) com ajuste de pH.

No ensaio com *T. ressei*, o pH inicial foi de 4,5 e aumentou gradativamente chegando a 7,7 no décimo segundo dia para os experimentos em que não houve correção do pH. O pH permaneceu em  $3,7 \pm 0,2$  no experimento com controle do pH. Na Figura 13, verifica-se que o ensaio sem controle de pH apresentou um crescimento celular semelhante em relação ao com controle de pH no sexto dia. Porém, da mesma forma que *T. asperellum* e *T. harzianum*, no décimo dia os valores de crescimento celular apresentaram uma pequena queda no experimento sem controle de pH. Estes resultados indicam mais uma vez, que o controle do

pH pouco afetou também o crescimento celular do *T. ressei* e mais uma vez a curva para quantidade de biomassa e quantidade de fósforo solúvel apresentam mesmo comportamento.



(A)



(B)

Figura 13 - Crescimento do microrganismo *T. ressei* no meio com 5 g/L de rocha e quantidade de fósforo; (A) sem ajuste de pH e (B) com ajuste de pH.

A produção de fósforo para *T. ressei* no experimento com controle de pH foi máxima e igual a 215 mg/L no terceiro dia enquanto no teste sem controle do pH a solubilização foi igual a 42 mg/L no mesmo intervalo de tempo. Verifica-se portanto, um aumento de 411,9% na solubilização nos testes com ajuste de pH comparativamente aos testes sem controle do pH. O mesmo comportamento que foi verificado para os outros microrganismos do gênero *Trichoderma* (*T. asperellum* e *T. harzianum*) foi observado ressaltando-se, portanto, a

importância de meios ácidos no processo de biolixiviação do fósforo. No terceiro dia a solubilização de fósforo teve um pico maior na eficiência, sofrendo pouca variação até o fim do processo.

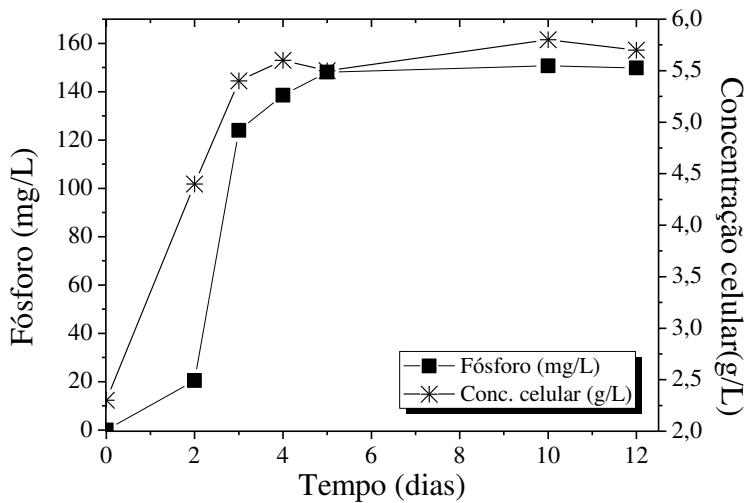
No teste utilizando a associação de *T. asperellum*, *T. harzianum* e *T. reseei*, Figura 14, o pH inicial foi de 4,5 e também aumentou gradativamente chegando a 7,7 no décimo segundo dia para os experimentos em que não houve correção do pH. O pH manteve-se em  $3,7 \pm 0,2$  no experimento com controle do pH.

A obtenção de fósforo por associação com e sem controle de pH foi de 406,3 e 150,7 mg/L respectivamente. Observa-se portanto um aumento de 169,6% na solubilização nos testes com ajuste de pH comparativamente aos testes sem controle do pH. O mesmo comportamento foi verificado para os microrganismos do gênero *Trichoderma* testados isoladamente também foi verificado para a associação dos mesmos, salientando mais uma vez a importância de meios ácidos no processo de biolixiviação do fósforo. A máxima solubilização foi alcançada no sexto dia do teste.

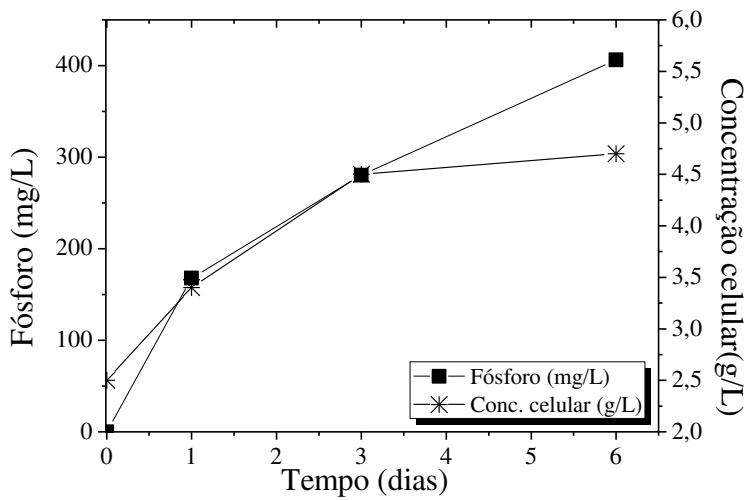
Os resultados de solubilização da rocha fosfática para os ensaios sem controle de pH, nos quais o pH alcançou valor médio de 7,5, foram obtidos os valores de: 14,1; 43,01; 43,02; 150,7 mg/L de fósforo, para *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. reseei* e a associação dos 3 respectivamente. Isto representa 1,7; 5,7; 5,4; 19,3% de solubilização para tais testes. Para o teste em que o pH foi controlado, os valores ficaram em torno de 3,8 e a solubilização foi de 171,9; 207,2; 215,0 e 406,3 mg/L de fósforo, ou 20,5; 26,6; 27,6 e 52,1% de solubilização. Estes resultados corroboram com a conclusão obtida por Whitelaw, Harden e Helyar (1999), no qual é ressaltado que os ácidos orgânicos podem contribuir para a solubilização de fosfato devido a diminuição do pH ou pela complexação dos cátions que estão ligados ao fósforo.

No presente estudo, os ácidos não foram medidos e pelo aumento do pH, a produção de ácidos não fica evidente, assim pode-se concluir que ocorreu uma complexação dos cátions que estão ligados ao fósforo. Nos testes isolados *T. harzianum* e *T. reseei* apresentaram valores bem próximos e superiores aos alcançados por *T. asperellum* e a associação utilizando os três microrganismos mostrou-se mais promissora, pois a solubilização mais que dobrou neste caso. A solubilização máxima foi alcançada num período de no máximo 5 dias para os testes realizados com fungos isolados e em associação. Nos estudos realizados por Acevedo e colaboradores (2014), observou-se um tempo reduzido para a concentração de fosfato solúvel ao empregar o fungo PSF-25, no qual promoveu-se um aumento rapidamente entre 24 e 48 horas de crescimento, permanecendo constante após 72 horas. Lapeyrie; Ranger; Vairelles (1991) sugeriram que a capacidade de solubilização de fósforo pode ser variável mesmo

dentro da mesma espécie fúngica. Cabral e colaboradores (2017), utilizando *T. harzianum* obtiveram 216,10 mg/L de fósforo, 27,7% de solubilização em reator com reciclo do meio, valores semelhantes aos encontrados neste trabalho.



(A)



(B)

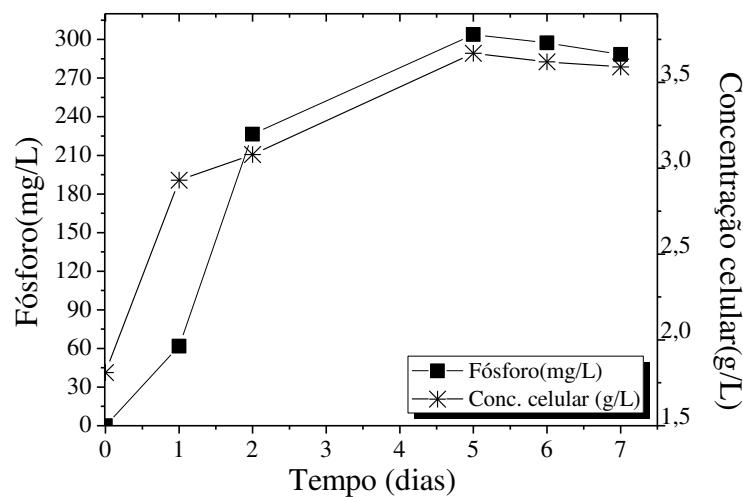
Figura 14 - Crescimento da associação dos três microrganismos no meio com 5 g/L de rocha, e fósforo solúvel, (A) sem ajuste de pH e (B) com ajuste de pH.

Os resultados obtidos para crescimento celular e concentração de fósforo produzido pelo processo de biolixiviação de rocha fosfática para *Penicillium oxalicum* são avaliados na Figura 15 (A). O pH manteve-se em  $2,25 \pm 0,12$  sem ajuste ao longo do teste. A Figura 15 (B) apresenta a concentração de ácidos produzidos durante o teste. Verifica-se a produção dos

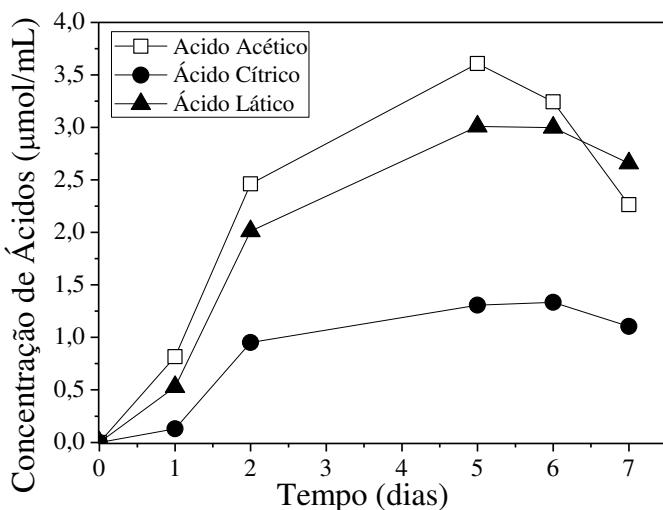
ácidos acético, cítrico e lático num total de 7,9 µmol/mL (3,6 µmol/mL de ácido acético, 1,3 µmol/mL de ácido cítrico e 3,0 µmol/mL de ácido lático) justificando o pH ter permanecido na faixa ácida e confirmando a importância de meios ácidos no processo de biolixiviação do fósforo. A máxima solubilização do fósforo foi atingida no quinto dia e igual a 303,8 mg/L, eficiência de 39,0%. O período em que a solubilização foi máxima foi também o período de maior concentração de biomassa e maior concentração total de ácidos.

De acordo com Gadagi e Sa (2002), a solubilização de fosfatos depende do efeito combinado de pH e ácidos orgânicos. Os ácidos orgânicos permitem, através dos seus grupos carboxílico e hidroxílico, a quelação de cátions de cálcio, alumínio ou ferro que fixam fosfatos inorgânicos, deixando disponíveis íons solúveis. No presente estudo, o pH manteve-se constante embora a concentração total de ácidos tenha aumentado gradativamente até o quinto dia e posterior queda. A solubilização de fósforo foi crescente até o quinto dia e permanecendo-se praticamente constante, mesmo com as variações sofridas pelos ácidos.

Shrivastava; Kale; D’Souza (2011), trabalhando com *Aspergillus niger* e *Penicillium oxalicum* (isolados da rizosfera de manguezais e plantas de arroz), avaliaram a produção das culturas ao se utilizar estrume enriquecido com fosfato de rocha. O estudo de laboratório revelou que um mês de incubação foi o tempo suficiente para a produção de fertilizantes fosfatados de boa qualidade. Também verificaram que quanto maior a população de microrganismos solubilizadores de fosfato maior foi à atividade da fosfatase. Observaram a redução do pH do meio devido à produção de ácidos orgânicos no processo de biossolubilização. Conclui-se que o fósforo enriquecido melhorou as propriedades biológicas do solo em termos de atividade da fosfatase e, consequentemente, maior absorção pelas plantas de fósforo do solo.



(A)



(B)

Figura 15 – Resultados para o crescimento de *Penicillium oxalicum* e fósforo solubilizado no meio com 5 g/L de rocha com controle de pH (A) e produção de ácidos ao longo do teste (B).

A Tabela 9 apresenta um quadro resumo com os resultados obtidos para os testes realizados utilizando os fungos na forma isolada e em associação para os testes com e sem ajuste do pH. Ao avaliar os resultados comparativamente, verifica-se que a associação apresentou maior eficiência, porém o processo foi mais lento e a maior solubilização ocorreu no sexto dia, enquanto nas outras condições o tempo médio para máxima solubilização foi de 3 dias.

Tabela 9 – Consolidação de resultados para os testes com fungos com e sem ajuste de pH

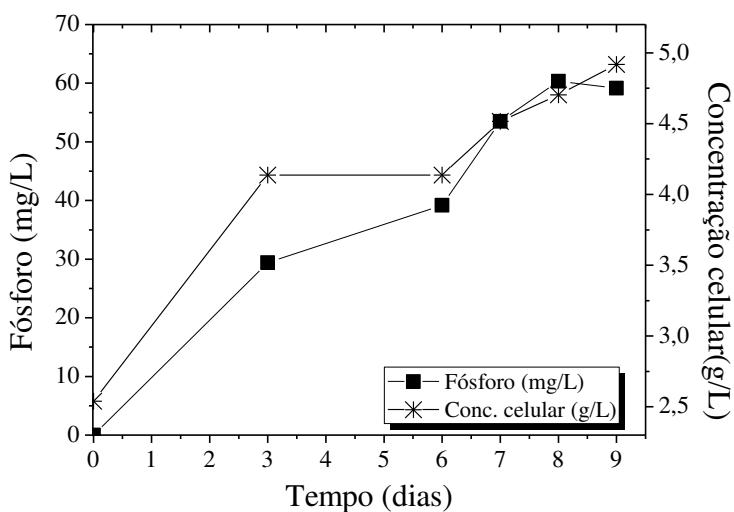
	<i>T.asperellum</i>	<i>T.harzianum</i>	<i>T.ressei</i>		Associação	
	s/ ajuste	c/ajuste	s/ ajuste	c/ajuste	s/ ajuste	c/ajuste
pH	4,2-7,5	3,6	4,2-7,5	3,8	4,5-7,5	3,7
Células (g/L)	4,6	4,3	5,7	5,2	5,6	4,8
P (mg/L)	13	160	44	207,2	42	215
Eficiência (%)	1,7	20,5	5,7	26,6	5,4	27,6
Tempo (dias)	3	3	4	3	3	5
						6

Após os testes preliminares iniciais, onde foi constatada a importância de meios ácidos no processo de biolixiviação, foram realizados testes para avaliar e quantificar a produção de ácidos ao longo do processo. Apesar do *Penicillium oxalicum* ter se mostrado promissor, não foram feitos mais testes utilizando o mesmo, por escolher trabalhar com o mesmo gênero a fim de simplificar o processo em associação, uma vez que as condições fisiológicas e nutricionais do meio influenciam no desempenho do processo.

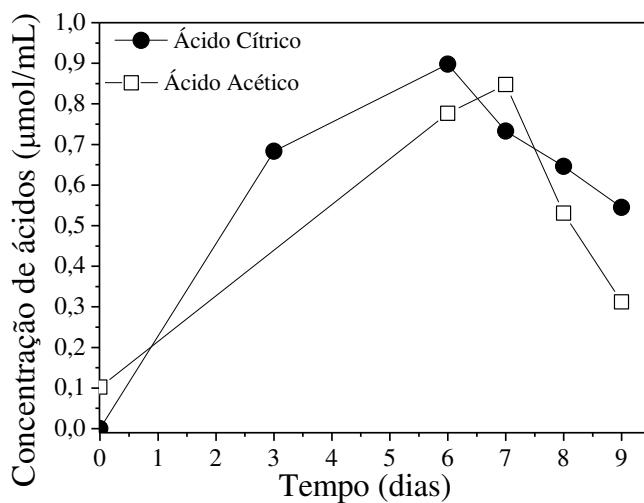
#### **4.1.1 - Avaliação da produção de ácidos orgânicos para as cepas dos microrganismos do gênero *Trichoderma* em fermentação líquida**

Os testes a seguir foram feitos utilizando os microrganismos isolados, (*T. asperellum*, *T. ressei*, *T. harzianum*), e a associação dos três microrganismos. Tais testes foram feitos retirando os microrganismos diretamente das placas e inoculando-os em meio líquido (Item 3.2.1.2) contendo 5 g/L de rocha e sem ajuste do pH, diferentemente dos testes feitos anteriormente, nos quais os microrganismos cresceram em meio contendo 50 g/L de melaço de soja e só então inoculados no meio para biossolubilização. O pH não foi ajustado pelo fato do ajuste ser feito com adição de solução de ácido sulfúrico, mesmo ácido utilizado na produção industrial. Os ácidos orgânicos foram quantificados nestes experimentos.

O comportamento do crescimento celular e da concentração de fósforo solúvel ao longo do processo de biolixiviação de rocha fosfática por *T. asperellum* pode ser avaliado na Figura 16 (A), no qual é possível identificar uma relação proporcional entre ambos. O pH foi monitorado e manteve-se em  $4,39 \pm 0,17$ . Na Figura 16 (B) verifica-se a quantidade de ácidos orgânicos produzidos durante o processo. A máxima solubilização ocorreu no oitavo dia com 7,44% de eficiência, o equivalente a 58 mg/L de fósforo solúvel. A quantidade de biomassa também foi máxima no período de oito dias.



(A)



(B)

Figura 16 - Crescimento de *T. asperellum* no meio com 5 g/L de rocha e quantidade de fósforo solubilizado (A), produção de ácidos ao longo do teste (B).

Comparando este teste, com o que foi feito sem ajuste de pH, empregando melaço de soja e *T. asperellum*, nota-se que neste obteve-se um aumento na eficiência de 339,39% na solubilização de rocha fosfática, fato que pode ser explicado pelos testes anteriores os fungos cresceram em meio contendo melaço o que pode ter gerado problemas de solubilização, ressaltando a importância das condições nutricionais do meio de crescimento e de solubilização é importante. A concentração de ácidos total formados ao longo deste estudo

variou entre 0,7 e 1,6  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ , sendo os valores máximos de 0,9  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  para o ácido cítrico e de 0,7  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  para o ácido acético, no sexto dia.

Na Figura 17 (A), observa-se o comportamento do crescimento celular e da concentração de fósforo obtido ao longo do processo de biolixiviação de rocha fosfática para *T. ressei*. Verifica-se também o mesmo comportamento para as curvas de quantidade de biomassa e quantidade de fósforo solubilizado. O processo de biossolubilização estabilizou-se num período de oito dias. Na Figura 17 (B) verifica-se a concentração de ácidos, observando-se uma variação de ácidos total foi de 0,6 a 1,4  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ . O ponto de máximo ocorreu no sexto dia, com obtenção de 0,8  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  de ácido cítrico e 0,6  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  de ácido acético e o pH manteve-se em  $4,6 \pm 0,2$ . A solubilização foi máxima no oitavo dia, permanecendo constante a partir daí e igual a 52,93 mg/L de fósforo, o equivalente a 6,8% de eficiência. Observa-se que após verificar a máxima obtenção de ácidos, verificou-se uma maior solubilização do fósforo, sendo possível verificar a importância dos ácidos no processo.

Comparando estes resultados, com o que foi feito sem ajuste de pH empregando melaço de soja e utilizando *T. ressei*, observa-se o mesmo comportamento em relação ao crescimento, porém com eficiência maior em 16% na solubilização de rocha fosfática. O melaço de soja utilizado e posteriormente inoculado em meio líquido (Item 3.2.1.2) utilizado no experimento anterior pode ter gerado problemas na solubilização da rocha.

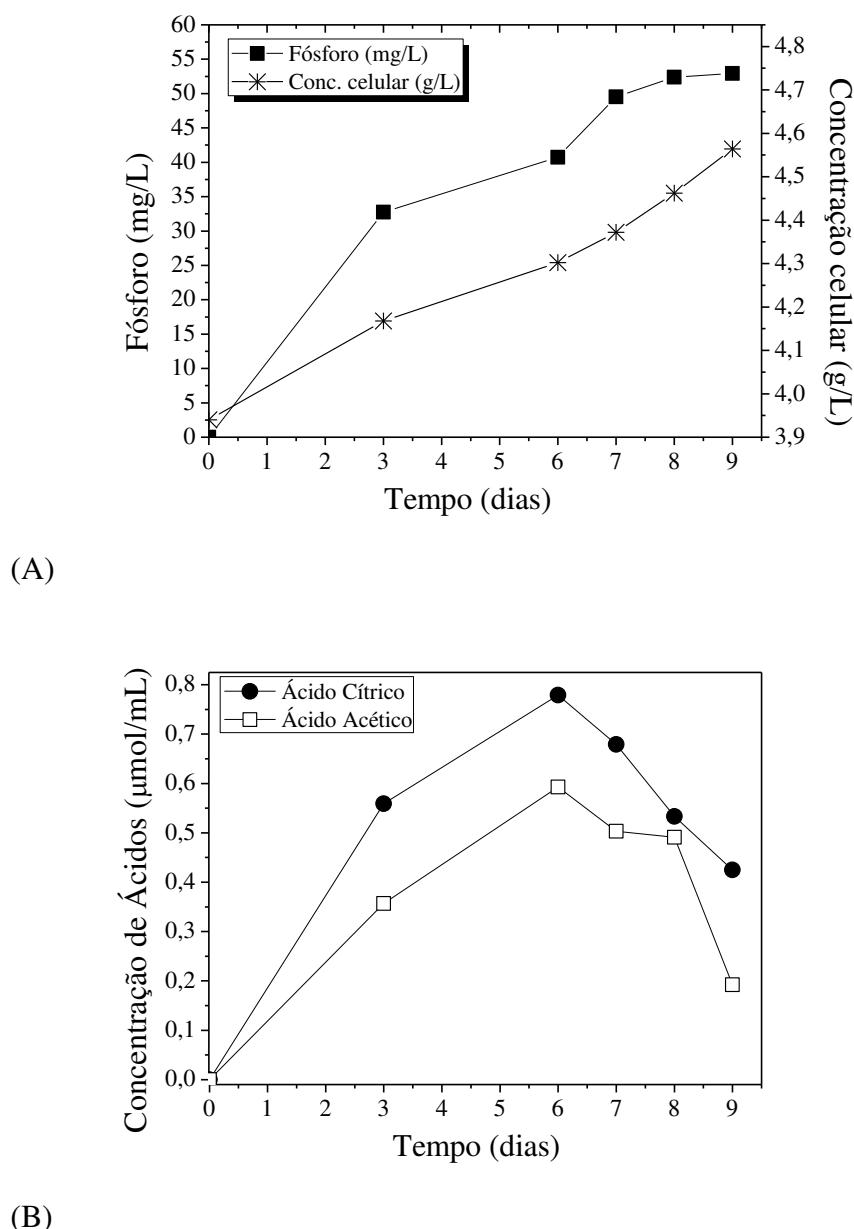


Figura 17 - Crescimento de *T. ressei* no meio com 5 g/L de rocha e fósforo solubilizado para o microrganismo (A), produção de ácidos ao longo do teste (B).

Acompanha-se o crescimento celular e a concentração de fósforo produzido ao longo do processo de biolixiviação de rocha fosfática para *T. harzianum*, na Figura 18 (A), no qual observa-se a proporcionalidade entre os dois parâmetros. O pH foi monitorado e manteve-se em  $4,6 \pm 0,2$ . Na Figura 18 (B) analisa-se a quantidade de ácidos orgânicos totais produzidos durante o processo que foi máxima no oitavo dia com variação entre 1,1 e 1,8  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ , sendo 0,7  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  de ácido lático e 1,0  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  de ácido acético no ponto de maior

produção. É possível verificar também que o ponto de maior solubilização de fósforo ocorreu no momento em que houve a maior formação de ácidos.

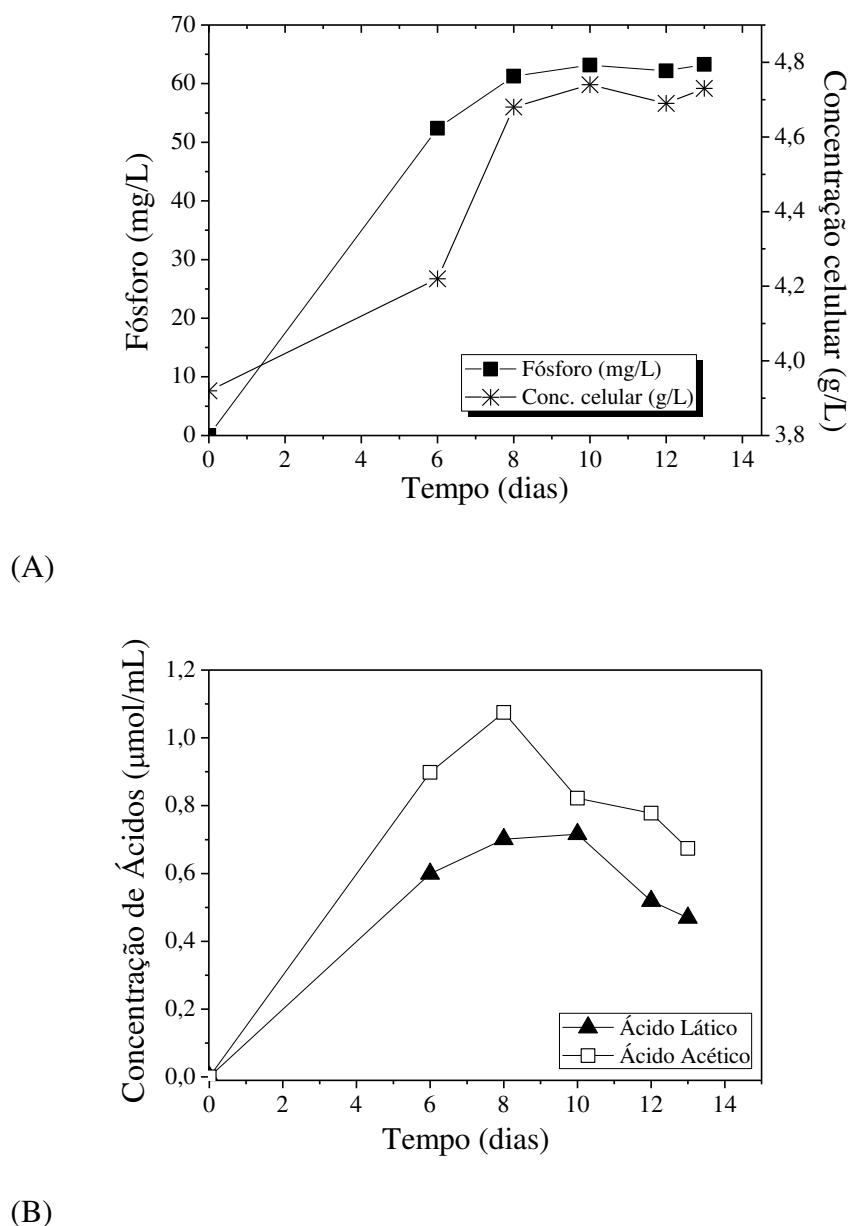


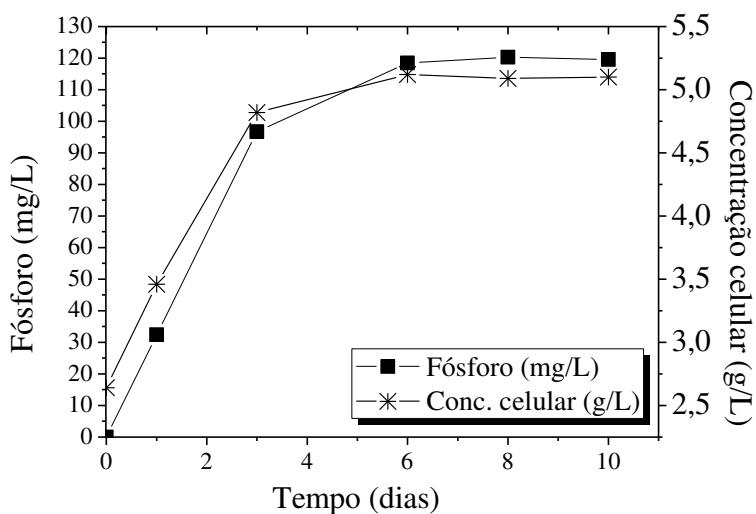
Figura 18 - Crescimento do microrganismo *T. harzianum* no meio com 5 g/L de rocha e quantidade de fósforo solubilizado (A), produção de ácidos ao longo do teste (B).

A concentração de fósforo solúvel manteve-se constante após a queda na concentração dos ácidos, uma vez que a diminuição na quantidade de ácidos foi insuficiente para continuar solubilizando a rocha. Comparando este teste com o realizado sem ajuste de pH e com o crescimento realizado empregando melado de soja e *T. harzianum*, observa-se que a solubilização de rocha fosfática no presente experimento foi de 63,28 mg/L, 8,1% de

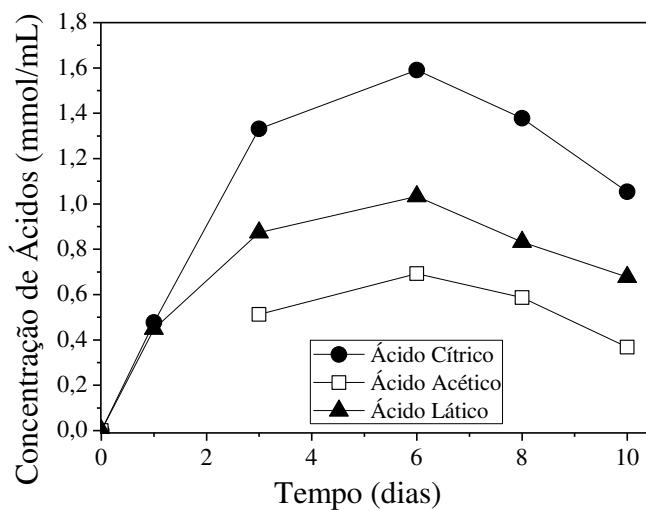
eficiência o que representa um aumento na quantidade de fósforo solúvel de 43,8% em relação ao experimento com utilização de melaço de soja.

Os resultados para crescimento celular e concentração de fósforo produzida ao longo do processo de biolixiviação de rocha fosfática para associação dos três microrganismos podem ser verificados na Figura 19 (A). O pH foi monitorado ao longo do teste e manteve-se em  $4,3 \pm 0,3$ . Na Figura 19 (B), observa-se a quantidade de ácidos orgânicos produzidos durante o processo que foi máxima no sexto dia ( $1,6 \mu\text{mol/mL}$  de ácido cítrico,  $0,7 \mu\text{mol/mL}$  de ácido acético e  $1,0 \mu\text{mol/mL}$  de ácido lático), sendo a variação de ácidos total de 0,9 a 3,3  $\mu\text{mol/mL}$ . A maior solubilização foi de 120,32 mg/L, 15,4% de eficiência e ocorreu no período em que houve a maior concentração de ácidos total, sexto dia. Nos períodos subsequentes a solubilização manteve-se constante mesmo com a queda na concentração total dos ácidos. Comparando este teste, com o que foi feito sem ajuste de pH utilizando a mesma associação, observa-se uma eficiência 20,2% menor em relação a solubilização de rocha fosfática. Neste caso a diferença pode ter ocorrido devido a concentração celular máxima alcançada ter sido menor do que a do teste anterior, ressaltando e confirmando a relação entre os parâmetros quantidade de biomassa em função da quantidade de fósforo solúvel.

De acordo com Cunningham e Kuiack (1992), a produção de ácidos orgânicos tem sido considerada um dos principais mecanismos, contudo não somente a quantidade como a natureza do ácido produzido influencia a solubilização de fosfatos inorgânicos. Nos testes realizados foi possível verificar que a quantidade de ácidos produzidos, assim como sua natureza, desempenhou um papel importante no processo de solubilização, visto que, a concentração de fósforo variou de 58 a 120 mg/L nos testes utilizando os microrganismos do gênero *Trichoderma* isolados e em associação e a concentração de ácidos total teve variação de 1,372 a 3,317  $\mu\text{mol/mL}$ . Mendes e colaboradores (2014) estudaram os mecanismos de solubilização de fósforo por isolados fúngicos e concluíram que a concentração de ácidos orgânicos é a principal forma de liberação de fósforo por esses microrganismos a partir de compostos inorgânicos insolúveis e do solo. Os ácidos podem transportar uma carga negativa variável, permitindo a complexação de cátions metálicos em solução e o deslocamento de ânions da matriz do solo, por esta razão, eles foram aplicados em muitos processos do solo, incluindo a imobilização e a absorção de nutrientes por plantas e microrganismos (por exemplo, P e Fe) (JONES, 1998).



(A)



(B)

Figura 19 - Crescimento da associação de *T. asperellum*, *T. ressei* e *T. harzianum* no meio com 5 g/L de rocha e fósforo (A), produção de ácidos ao longo do teste (B).

Os resultados dos testes em fermentação líquida sem ajuste do pH podem ser visualizados na Tabela 10, na qual é possível verificar que o teste realizado em associação apresentou maior solubilização, que pode ser justificado pela maior formação de ácidos orgânicos, além de ter alcançado os valores máximos em menor tempo.

Tabela 10 – Quadro de resultados para os testes realizados com fungos

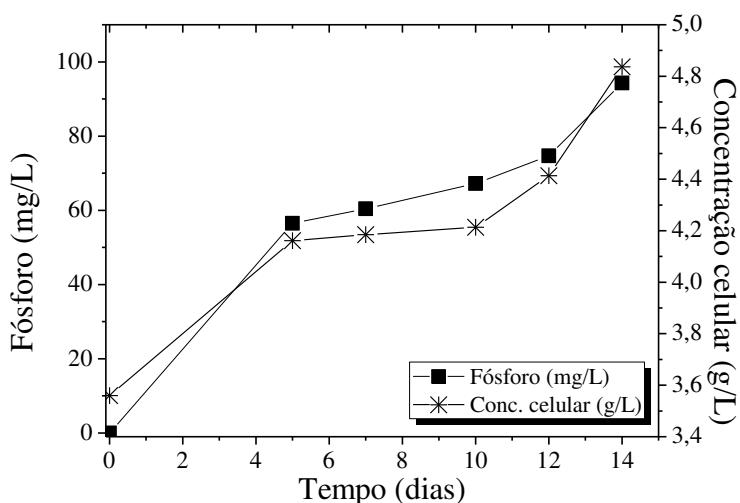
	<i>T.asperellum</i>	<i>T.harzianum</i>	<i>T.ressei</i>	Associação	<i>Penicillium</i>
pH	4,4 ± 0,2	4,6 ± 0,2	4,6 ± 0,2	4,3 ± 0,3	4,4 ± 0,2
Células (g/L)	4,8	4,7	4,6	5,1	3,6
P (mg/L)	58,0	63,3	52,9	120,3	303,8
Eficiência (%)	7,4	8,1	6,8	15,4	39,0
Ácidos(µmol/mL)	1,6	1,8	1,4	3,3	7,4
Tempo (dias)	12	8	14	6	5

Os fungos filamentosos são essencialmente aeróbios, isto é, concentrações baixas ou ausência de O<sub>2</sub> podem inibir o metabolismo, assim devido à baixa solubilidade do oxigênio em água, umidade acima de 60% também inibe o crescimento dos fungos pela ausência de O<sub>2</sub>. Em decorrência deste fato, testes em fermentação em estado sólido, com variações na umidade inicial foram feitos, para análise na influência da eficiência de solubilização da rocha fosfática.

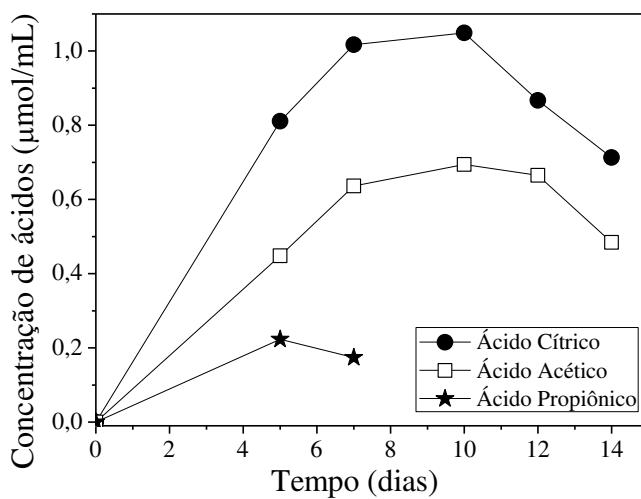
#### 4.2 - Fermentação em estado sólido (FES) com fungos em reatores cônicos

Vale salientar que nesta etapa do estudo os experimentos foram realizados por FES em reatores cônicos de bancada, utilizando bagaço de cana previamente lavado e esterilizado. Os microrganismos foram inoculados em meio líquido (Item 3.2.1.2) contendo 5 g/L de rocha e umidade inicial de 85%. Foram testados os microrganismos *T. ressei*, *T. asperellum* e *T. harzianum* isoladamente e os três em associação.

Os parâmetros avaliados foram o comportamento do crescimento celular e a concentração de fósforo produzido ao longo do processo de biolixiviação de rocha fosfática utilizando-se *T. ressei* estão na Figura 20 (A). O pH foi avaliado ao longo do teste e manteve-se em 4,3 ± 0,30. Na figura 20 (B) quantidade de ácidos orgânicos total produzidos durante o processo variou entre 1,3 a 2,0 µmol/mL. O ponto máximo de produção de ácido foi atingido no sétimo dia e mantendo-se praticamente constante até o décimo dia com 1,0 µmol/mL de ácido cítrico, 0,7 µmol/mL de ácido acético e 0,2 µmol/mL de ácido propiônico. A quantidade de fósforo solubilizado foi de 94,3 mg/L, ou seja, 12,1% de eficiência no décimo quarto dia.



(A)



(B)

Figura 20 - Crescimento de *T. ressei* no meio com 5 g/L de rocha fósforo, para o microrganismo em FES com 85% de umidade inicial (A) e produção de ácidos ao longo do teste (B).

Comparando este teste com a fermentação líquida utilizando *T. ressei*, tem-se que a solubilização de fósforo que tinha sido de 52,3 mg/L de fósforo para a fermentação líquida, na fermentação sólida a solubilização foi de 94,3 mg/L de fósforo. Este aumento indica que a eficiência foi superior em 80,3%. Observa-se também que a solubilização máxima foi alcançada no nono dia para fermentação líquida, enquanto que para a FES foi no décimo

quarto dia. Porém, no nono dia a quantidade de fósforo solubilizada no processo em FES já foi superior ao processo em fermentação líquida (67,2 mg/L de fósforo).

Na Figura 21 (A), observa-se a concentração de fósforo produzida ao longo do processo de biolixiviação de rocha fosfática e o comportamento do crescimento celular utilizando *T. asperellum*.

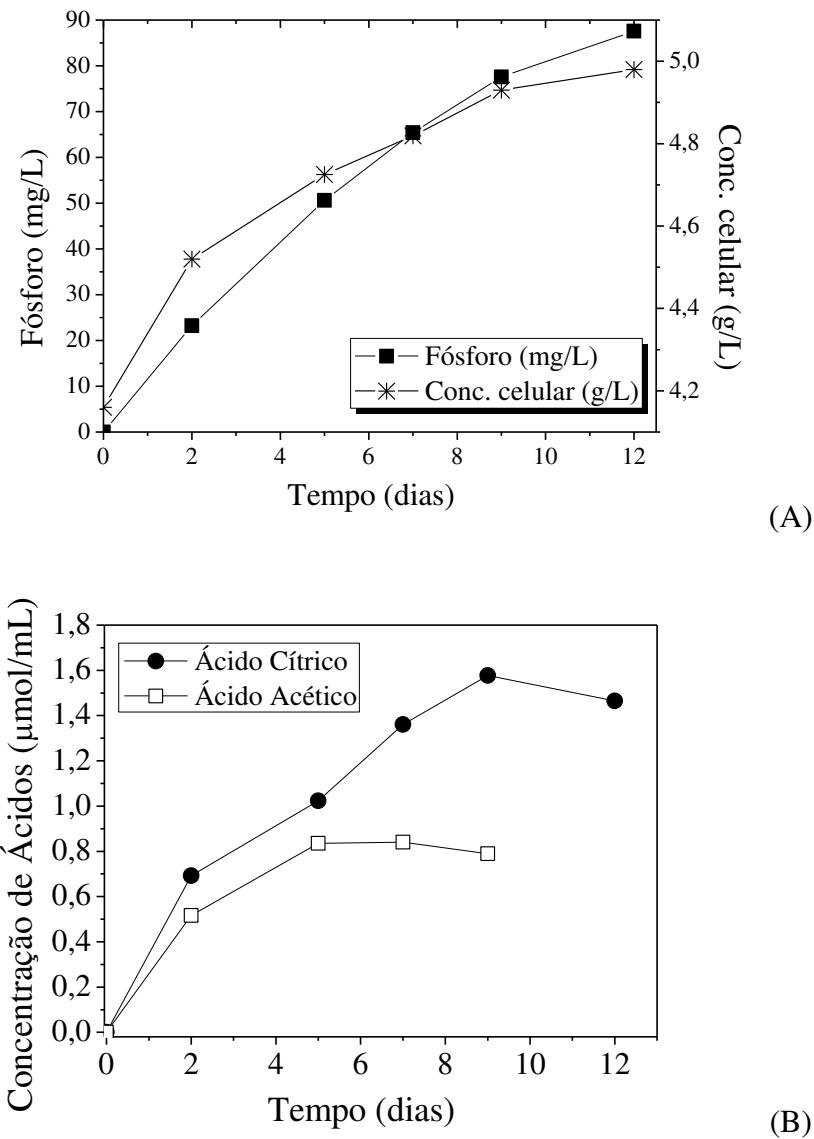
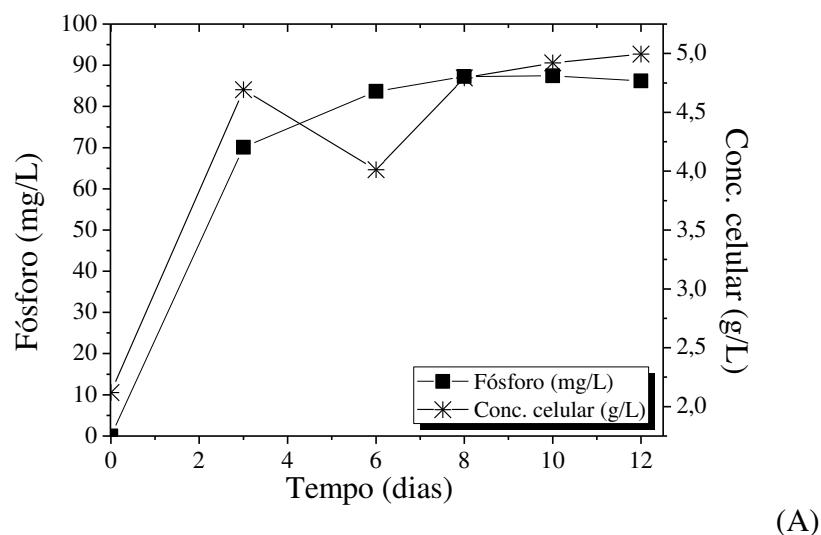


Figura 21 - Crescimento de *T. asperellum* no meio com 5 g/L de rocha e fósforo solubilizado (A), produção de ácidos ao longo do teste (B) em fermentação estado sólido com 85% de umidade inicial.

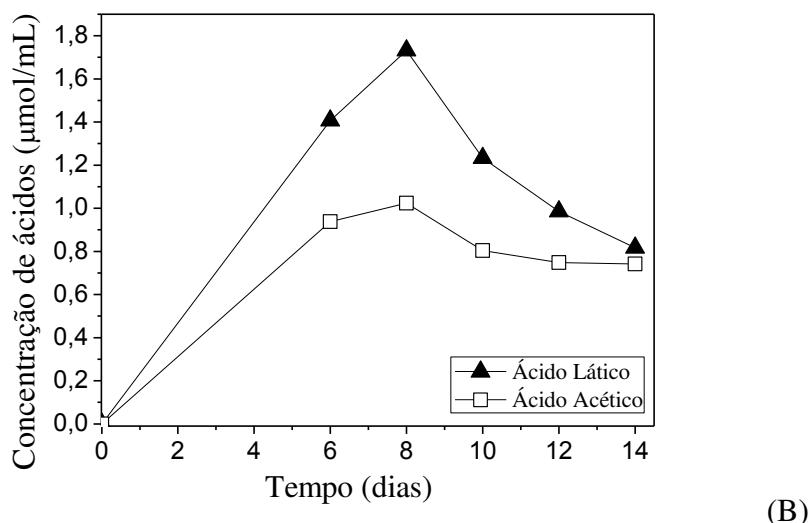
O pH foi avaliado ao longo do teste e manteve-se em  $4,2 \pm 0,3$ . Na figura 21 (B) verifica-se a produção dos ácidos cítrico e acético, a variação dos ácidos orgânicos total produzidos

durante o processo foi de 1,2 a 2,4  $\mu\text{mol/mL}$  e a máxima produção de ácidos foi atingida no nono dia. A quantidade de fósforo solubilizado foi de 87,6 mg/L, ou seja, 11,2% de eficiência no décimo segundo dia.

As concentrações de fósforo e celular ao longo do processo de biolixiviação de rocha fosfática utilizando *T. harzianum* são verificadas na Figura 22 (A).



(A)



(B)

Figura 22 - Crescimento de *T. harzianum* no meio com 5 g/L de rocha e fósforo (A), produção de ácidos ao longo do teste (B) em fermentação estado sólido com 85% de umidade inicial.

É possível verificar que o aumento da solubilização de fósforo coincide com o aumento na concentração celular. O pH variou de 4,5 no primeiro dia a 5,6 no décimo segundo dia. Na Figura 22 (B), avalia-se a quantidade de ácidos orgânicos total produzidos durante o processo,

com variação de 1,6 a 2,8 µmol/mL. A concentração máxima foi no oitavo dia com formação de 1,7 µmol/mL de ácido lático e 1,0 µmol/mL de ácido acético. A solubilização foi de 87,4 mg/L no sexto dia e eficiência de 11,2%, isto representa uma eficiência 27,6% superior em comparação à fermentação líquida, sem ajuste do pH e a produção de ácidos total também foi superior em 53,9%.

Para os testes realizados com a associação de *T. harzianum*, *T. asperellum* e *T. ressei*, os resultados para concentração de fósforo produzida ao longo do processo de biolixiviação de rocha fosfática e o comportamento do crescimento celular pode ser analisado na Figura 23 (A). O pH manteve-se em de  $4,4 \pm 0,5$ . Na Figura 23 (B), a quantidade total de ácidos orgânicos produzida é apresentada. Durante o processo, a concentração variou de 2,1 a 3,0 µmol/mL; a concentração máxima foi atingida no sexto dia com produção de 1,6 µmol/mL de ácido cítrico, 0,9 µmol/mL de ácido lático e 0,5 µmol/mL de ácido acético.

A concentração de fósforo solúvel foi de 104,6 mg/L e 13,4% de eficiência a partir do sexto dia. No teste feito em fermentação líquida utilizando a mesma a solubilização de rocha fosfática foi de 120,3 mg/L. A fermentação em estado sólido foi 13,1% menor em comparação com o processo realizado em fermentação líquida. A concentração de ácidos total também foi menor em 10,4% e a quantidade de biomassa foi igual para os dois experimentos.

Os resultados obtidos em tais testes concordam com as afirmações de Baziramakenga; Simard e Leroux (1995), que os ácidos orgânicos podem também afetar a solubilidade de elementos minerais diretamente, pelas reações de troca iônica, de quelação ou ligando indiretamente por meio da estimulação de atividades microbianas.

A partir dos resultados obtidos para os testes realizados em fermentação submersa e FES, foi possível verificar que os melhores resultados foram alcançados nos testes realizados para fermentação em estado sólido. Assim, o teste utilizando a associação dos três microrganismos do gênero *Trichoderma* foi realizado para verificar a influência da umidade. O teste foi realizado em reatores cônicos de bancada, utilizando bagaço de cana previamente lavado e esterilizado, meio líquido (Item 3.2.1.2) contendo 5 g/L de rocha com umidade inicial de 50%.

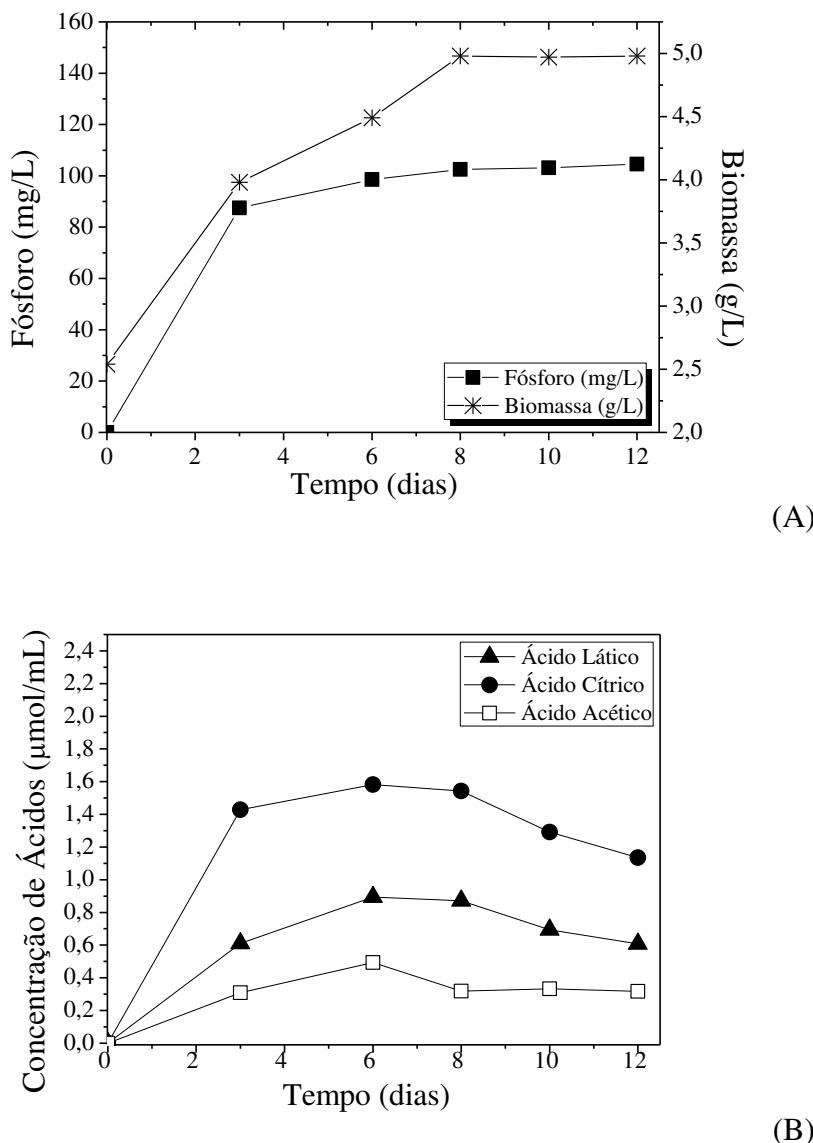


Figura 23 - Crescimento da associação de *T. harzianum*, *T. asperellum* e *T. ressei* no meio com 5 g/L de rocha e fósforo (A), produção de ácidos ao longo do teste (B) em FES com 85% de umidade inicial.

Os resultados para o teste realizado em fermentação sólida com umidade inicial de 50% são apresentados na Figura 24 (A), na qual acompanha-se a concentração de fósforo produzido ao longo do processo de biolixiviação de rocha fosfática e o comportamento do crescimento. O pH inicial foi de 4,5 diminuindo gradativamente até 4,0 no décimo segundo dia. Os parâmetros avaliados apresentaram comportamento semelhante para as duas condições de umidade inicial testadas. O fósforo solúvel no processo foi de 141,5 mg/L e a eficiência do teste com umidade inicial de 50% obteve eficiência da solubilização de rocha fosfática de

35,3%, maior em comparação a fermentação sólida com 85% de umidade inicial. Na Figura 24 (B) observa-se que a concentração de ácidos total produzidos variou entre 1,7 e 4,1  $\mu\text{mol/mL}$  e a máxima concentração foi atingida no terceiro dia com produção de 1,2  $\mu\text{mol/mL}$  de ácido lático, 2,1  $\mu\text{mol/mL}$  de ácido cítrico e 0,8  $\mu\text{mol/mL}$  de ácido acético. A maior eficiência pode ser explicada pelo fato da produção de ácidos ter sido 37,5% maior em relação ao teste com umidade inicial de 85%.

Os resultados dos testes realizados em fermentação líquida e em fermentação sólida, observa-se comportamento semelhante em relação aos parâmetros avaliados, porém os testes em fermentação sólida apresentaram maior eficiência. Os testes em fermentação sólida com umidade inicial de 50%, apresentaram melhores resultados e confirmam a melhor condição de ação dos fungos, que é em ambiente com menor umidade.

Os testes realizados em FES com umidade inicial de 85%, 50mL de meio, empregando os microrganismos *T. asperellum*, *T. harzianum* e *T. ressei* isoladamente e em associação apresentaram eficiência de 12,1%; 11,3%; 11,3% e 13,4%, respectivamente em relação à solubilização de fósforo. Ao realizar o teste com umidade inicial de 50%, 8,5 mL de meio, a eficiência passou de 13,4% para 18,2%, o que pode ser justificado pelo aumento de 37,5% na quantidade de ácidos total.

A redução do pH do meio sugere um efeito de produção de ácidos orgânicos na solubilização de fosfato, o que é confirmado por meio de análise de correlação entre o pH e a quantidade de ácidos total. Verifica-se, portanto, que o teste realizado com umidade inicial de 50% foi o único que apresentou uma queda gradativa do valor de pH ao longo do teste. Para os testes realizados com umidade inicial de 85% o pH manteve-se constante ou apresentou aumentosgradativos. Estudos mencionam que a diminuição do pH do meio de cultura pode ser o resultado da captação iônica seletiva por fungos, e não um efeito direto da produção de ácido orgânico (COUTINHO; FELIX; YANO-MELO, 2012).

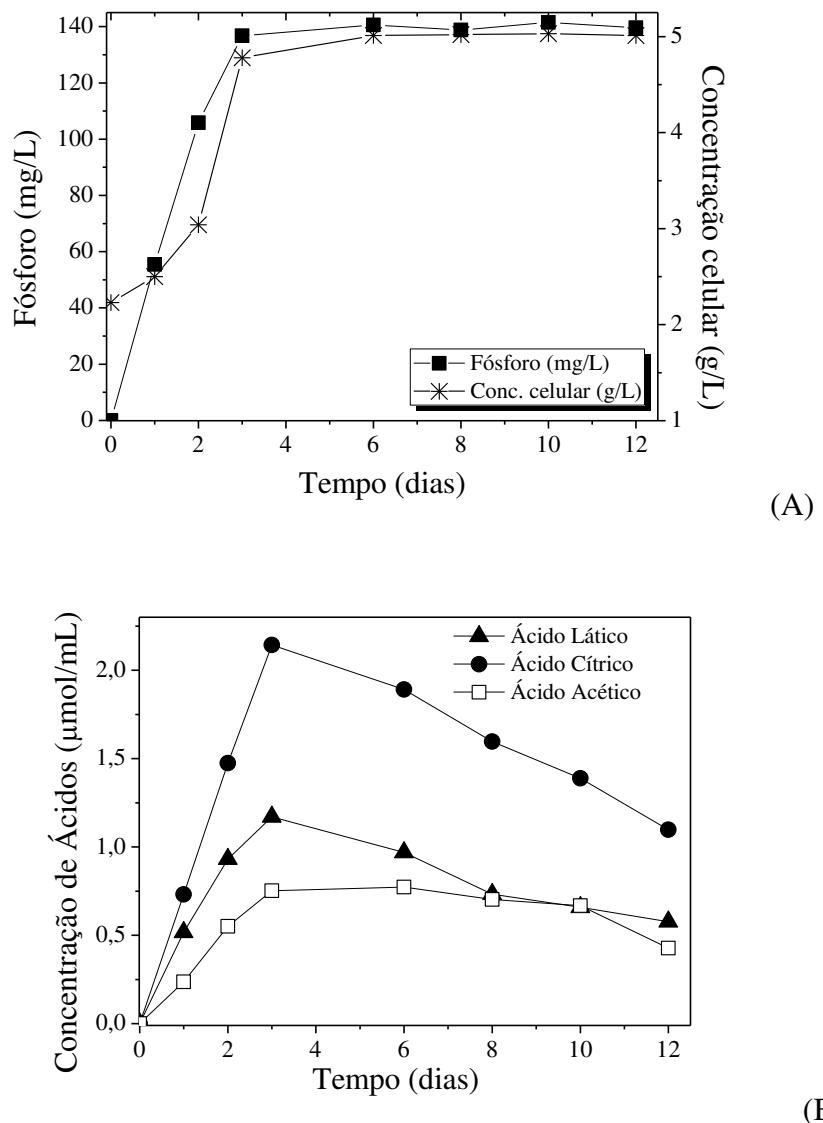


Figura 24 - Crescimento da associação de *T. harzianum*, *T. asperellum* e *T. ressei* no meio com 5 g/L de rocha e fósforo solubilizado (A), produção de ácidos ao longo do teste (B) em fermentação sólida com umidade de 50%.

A Tabela 11 apresenta a consolidação dos resultados para os testes em FES com umidade inicial de 85 e 50%, no qual é possível verificar a maior eficiência do processo com umidade inicial de 50%, com maior produção de ácidos, diminuição gradativa do pH, além do processo ter sido mais rápido.

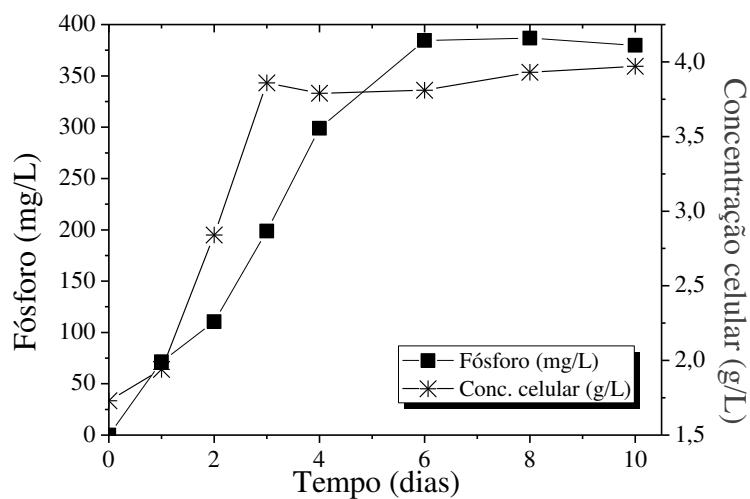
Tabela 11- Quadro comparativo dos resultados dos testes em fermentação em estado sólido

	Associação (85%)	Associação (50%)
pH	2,05-2,971	4,52-4,00
Células (g/L)	5,0	5,0
P (mg/L)	104,57	141,53
Eficiência (%)	13,42	18,16
Ácidos ( $\mu\text{mol/mL}$ )	2,971	4,086
Tempo (dias)	8	6

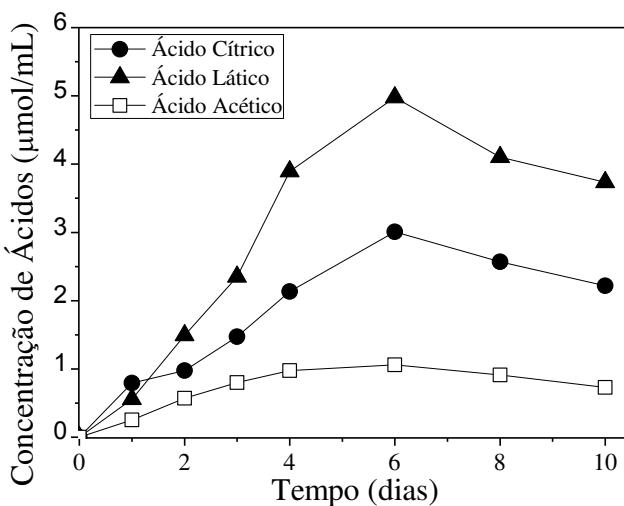
#### 4.3 - Fermentação em estado sólido em biorreatores do tipo tambor rotativo

Os testes em biorreatores do tipo tambor rotativo foram realizados com 40 g de bagaço previamente lavado, seco e esterilizado, utilizando-se quantidades iguais de cada microrganismo na associação de *T. asperellum*, *T. harzianum* e *T. ressei*. Estes microrganismos foram inoculados em meio líquido (Item 3.2.1.2) contendo 5 g/L de rocha e colocados no biorreator. A velocidade de rotação do biorreator adotada foi de 2,4 m/s, tal valor foi escolhido depois de testes preliminares com velocidades mais baixas e obtenção de valores semelhantes. Valores mais altos não foram testados devido à possível quebra de hifas, o que poderia atrapalhar o processo. Ar úmido foi passado na linha numa velocidade de 1,9 m/s (CABRAL, 2016).

Os valores para os parâmetros concentração de fósforo produzido ao longo do processo de biolixiviação de rocha fosfática e o comportamento do crescimento celular avaliados são apresentados na Figura 25 (A). A umidade inicial foi de 55%, permanecendo em  $55 \pm 4\%$  ao longo de todo o experimento. O pH permaneceu na faixa de  $4,51 \pm 0,3$  do primeiro ao décimo dia. Na Figura 25 (B) analisa-se a concentração de ácidos total, os quais a concentração dos ácidos total variou entre 1,602 e 9,047  $\mu\text{mo/mL}$ , atingindo o máximo no sexto dia com formação de 1,062  $\mu\text{mo/mL}$  de ácido acético, 3,007  $\mu\text{mol/mL}$  de ácido cítrico, e 4,978  $\mu\text{mo/mL}$  de ácido lático.



(A)



(B)

Figura 25 - Crescimento da associação de *T. harzianum*, *T. asperellum* e *T. ressei* no meio com 5 g/L de rocha e fósforo solubilizado (A), produção de ácidos ao longo do teste (B) em FES com umidade inicial de 55% em reator do tipo tambor rotativo.

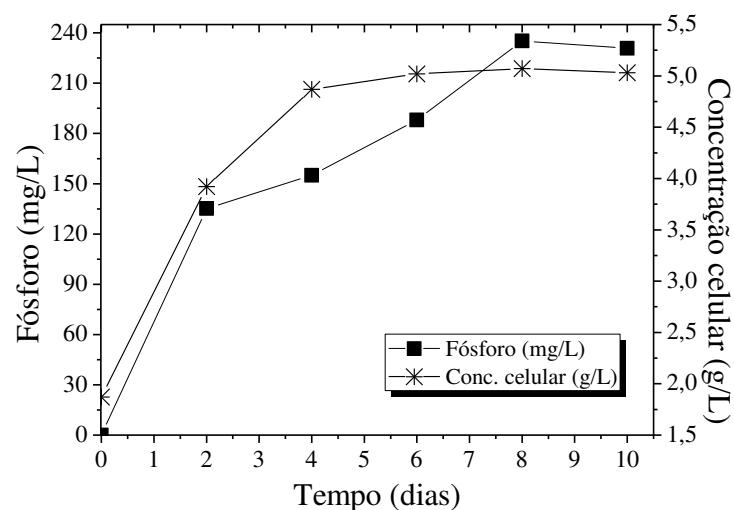
Observa-se que, para o aumento na concentração celular, tem-se também um aumento na solubilização do fósforo. A maior solubilização de fósforo ocorreu no período de maior formação de ácidos, 6 dias, e igual a 386,79 mg/L e 49,63% de eficiência.

Foram realizados também testes em biorreator do tipo tambor rotativo em condição semelhante a citada anteriormente, porém a umidade inicial foi de 40% para este teste.

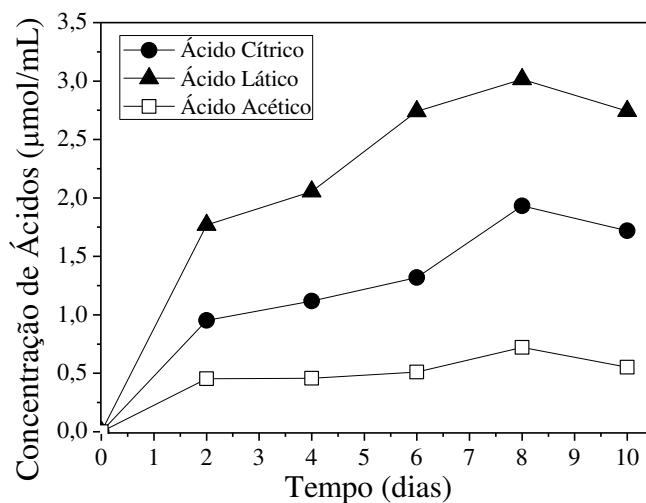
Na Figura 26 (A) observa-se a concentração de fósforo produzido ao longo do processo de biolixiviação de rocha fosfática e o comportamento do crescimento celular utilizando a associação dos microrganismos com umidade inicial de  $40\% \pm 1,5\%$ . O pH foi de  $4,0 \pm 0,2$  ao longo de todo o processo. Na Figura 26 (B) a formação dos ácidos total foi analisada e o ácido lático atingiu a concentração de  $3,0 \mu\text{mol/mL}$  no oitavo dia, além da formação de  $0,7 \mu\text{mol/mL}$  de ácido acético e  $2,0 \mu\text{mol/mL}$  de ácido cítrico, totalizando  $5,7 \mu\text{mol/mL}$  de ácidos. A solubilização foi de  $235,66 \text{ mg/L}$ ,  $30,2\%$  também no oitavo dia.

Analizando os resultados obtidos em reator rotativo verificou-se uma redução de  $39,1\%$  na solubilização de fósforo comparando-se a umidade inicial de  $55\%$  e  $40\%$ . Comparativamente aos testes feitos em reator cônicos de bancada ( $50\%$  umidade inicial), observa-se uma eficiência  $173,3\%$  maior, o que pode ser explicado pelo aumento em  $54,8\%$  na produção dos ácidos, uma vez que a biomassa foi menor. O aumento na eficiência pode ser relacionado a aeração do processo, uma vez que os microrganismos utilizados são aeróbios e pela configuração do reator permitir uma maior homogeneidade ao sistema.

Vassilev e colaboradores (2013) verificaram que a umidade inicial é um dos parâmetros mais importantes nos processos de fermentação em estado sólido por fungos. Sabe-se que, o baixo nível de umidade provoca uma diminuição da produtividade do ácido fúngico e a atividade metabólica mais provável devido à solubilidade reduzida é a aquisição de nutrientes pela biomassa fúngica.



(A)



(B)

Figura 26 - Crescimento da associação de *T. harzianum*, *T. asperellum* e *T. ressei* no meio com 5 g/L de rocha e fósforo (A), produção de ácidos ao longo do teste (B) em biorreator do tipo tambor rotativo em FES com umidade inicial de 40%.

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos na FES, para avaliação e comparação dos parâmetros analisados ao longo dos testes, facilitando a visualização da melhor condição de operação do processo.

Tabela 12- Quadro comparativo dos testes em FES realizada em reatores do tipo cônico e tambor rotativo

	Associação (40%)rotativo	Associação (55%) rotativo	Associação (50%)cônico
pH	4,0 ± 0,2	4,5 ± 0,3	4,5 - 4,00
Células (g/L)	5,0	4,0	5,0
P (mg/L)	235,2	386,8	141,5
Ácidos ( $\mu\text{mol/mL}$ )	5,7	9,0	4,1
Tempo	8	6	6

Analisando os valores contidos na tabela, verifica-se que o teste realizado em reator do tipo tambor rotativo com umidade inicial de 55%, foi a condição testada que mais favoreceu o processo de solubilização do fósforo. Observa-se também um menor tempo de fermentação, assim como a maior produção de ácidos.

#### 4.4 - Fermentações preliminares com as bactérias *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* e as bactérias acidófilas *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Acidithiobacillus thiooxidans* em meio líquido.

Nesta etapa, os microrganismos cresceram em reator cônico de bancada de 500 mL, contendo meio líquido de crescimento específico para cada um deles, sendo meio caldo nutritivo para os *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* e *Pseudomonas fluorescens*, para a cepa de *Bacillus subtilis* foi utilizado o meio LB e os meios T&K e 9K foram utilizados para as bactérias *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *A. thiooxidans*, respectivamente. O crescimento foi por um período de uma semana sem monitoramento do crescimento e do pH. Após esse período os cultivos foram centrifugados, os sobrenadantes desprezados e as células foram adicionados nos respectivos meios líquidos (Item 3.2.1.2) contendo 5 g/L de rocha. O pH inicial foi de 2,12, ajustado com solução de ácido sulfúrico 1N. As fermentações bacterianas foram realizadas para cada microrganismo separadamente e também foi realizado um teste com a associação de todas as bactérias.

Ao avaliar as Figura 27 a 31 (A) verificam-se a concentração de fósforo obtida ao longo do processo de biolixiviação de rocha fosfática e o comportamento do crescimento celular utilizando as bactérias *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*,

*Pseudomonas fluorescens* e a associação de bactérias, respectivamente, em fermentação líquida e as Figuras 27 a 31 (B) apresentam os resultados para as concentrações de ácidos lático, acético e propiônico produzidos ao longo da fermentação.

No teste utilizando *B. megaterium*, Figura 27, a concentração total de ácidos produzidos foi máxima no quinto dia e igual a 7,9 µmol/mL. Obteve-se 2,1 µmol/mL de ácido lático, 4,4 µmol/mL de ácido acético e 1,4 µmol/mL de ácido propiônico. O pH manteve-se em  $2,3 \pm 0,1$ . Segundo Silva (2012), a concentração de ácidos orgânicos e o pH do meio reativo são variáveis que normalmente medem a habilidade dos microrganismos em solubilizar os cristais do composto insolúvel.

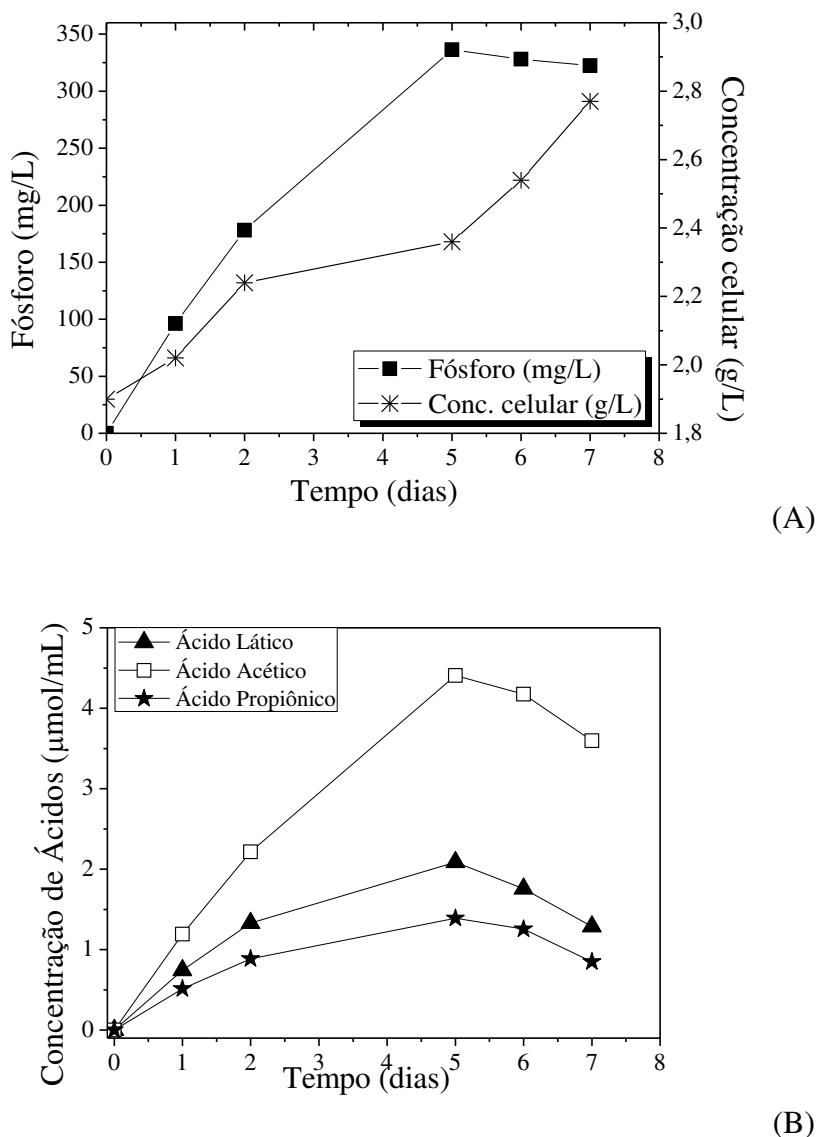


Figura 27 - Crescimento do microrganismo *B.megaterium* no meio com 5 g/L de rocha e produção de fósforo (A) produção de ácidos ao longo do teste (B).

Verifica-se que o ponto de maior solubilização da rocha fosfática foi também o dia de maior produção de ácidos total corroborando assim com a teoria defendida por Trabelsi e colaboradores (2017), de que a solubilização dos fosfatos presente no solo em muitos casos ocorre devido à excreção de ácidos orgânicos sintetizados por microrganismos.

A concentração de fósforo obtido no quinto dia de fermentação foi de 336,4 mg/L correspondendo a uma solubilização de 43,1%. Após o quinto dia a solubilização permaneceu praticamente a mesma devido a uma diminuição da concentração de ácidos orgânicos neste período. Wyciszkiewicz e colaboradores (2016) estudaram a solubilização de fósforo a partir de ossos de aves e peixes, cinza e fosforita, dos quais obtiveram fósforo solúvel no meio variando entre 68,9 e 1289 mg/L. A concentração de fósforo sofreu variação devido às diferentes fontes de fosfato utilizadas, com composições de fósforo solúvel variando entre 0,7 a 24,7%. Dobrowolska-Iwanek e Chojnacka (2016) verificaram que quatro ácidos orgânicos foram detectados em testes utilizando *Bacillus megaterium*: acético, propiônico, lático e glucônico.

Nos testes realizados por Wyciszkiewicz e colaboradores (2016), quatro ácidos orgânicos foram detectados em testes utilizando *Bacillus megaterium*: acético, propiônico, lático e glucônico. Nestes testes, a produção de ácidos foi responsável pela queda no pH, aumentando a concentração de íons hidrogênio e maior liberação de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, no presente trabalho o teste realizado iniciou com pH igual a 2 e permaneceu praticamente constante ao longo do experimento.

Nos testes utilizando *B. subtilis* (Figura 28), a concentração total de ácidos foi máxima e igual a 7,7 µmol/mL no quinto dia, dos quais 3,9 µmol/mL de ácido lático, 2,2 µmol/mL de ácido acético e 1,6 µmol/mL de ácido propiônico. O pH apresenta faixa de 2,3 ± 0,1. A concentração máxima de fósforo solúvel também ocorreu no quinto dia e foi de 334,5 mg/L, com eficiência de 43,1%.

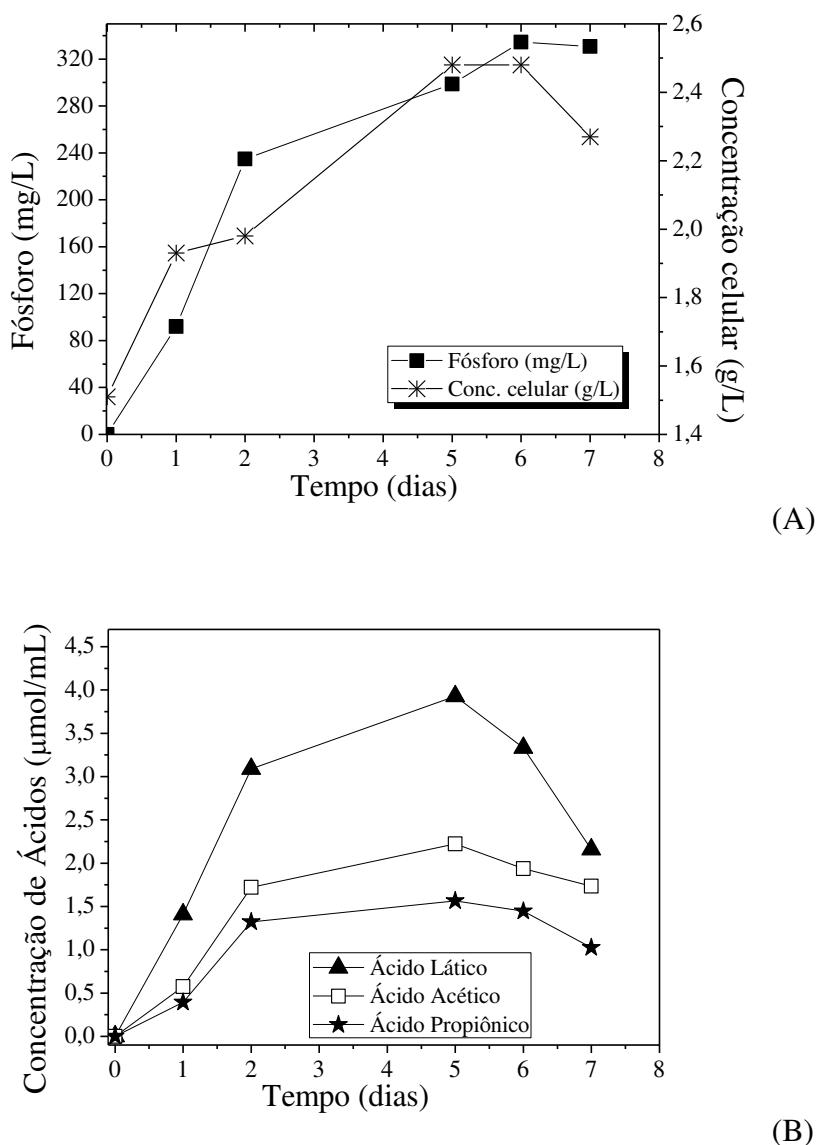


Figura 28 - Crescimento de *B. subtilis* no meio com 5 g/L de rocha e produção de fósforo (A), produção de ácidos ao longo do teste (B).

Nos experimentos utilizando *B. licheniformis* (Figura 29), o pH manteve-se em  $2,3 \pm 0,1$ . A concentração de ácidos total foi maior no quinto dia, num total de  $6,8 \mu\text{mol}/\text{mL}$  ( $1,3 \mu\text{mol}/\text{mL}$  de ácido propiônico,  $2,0 \mu\text{mol}/\text{mL}$  de ácido lático e  $3,5 \mu\text{mol}/\text{mL}$  de ácido acético). A maior solubilização de fósforo foi igual a  $296,5 \text{ mg/L}$ , eficiência de  $38,0\%$  ocorrida no quinto dia, assim como a maior concentração de biomassa confirmando a interligação dos parâmetros.

No presente trabalho utilizando *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* e *Pseudomonas fluorescens*, os ácidos produzidos foram lático, cítrico, acético e propiônico. A eficiência de solubilização foi praticamente a mesma para todas as bactérias testadas, com variação de  $42 \pm 1,5\%$  e o tempo de fermentação foi de 5 dias.

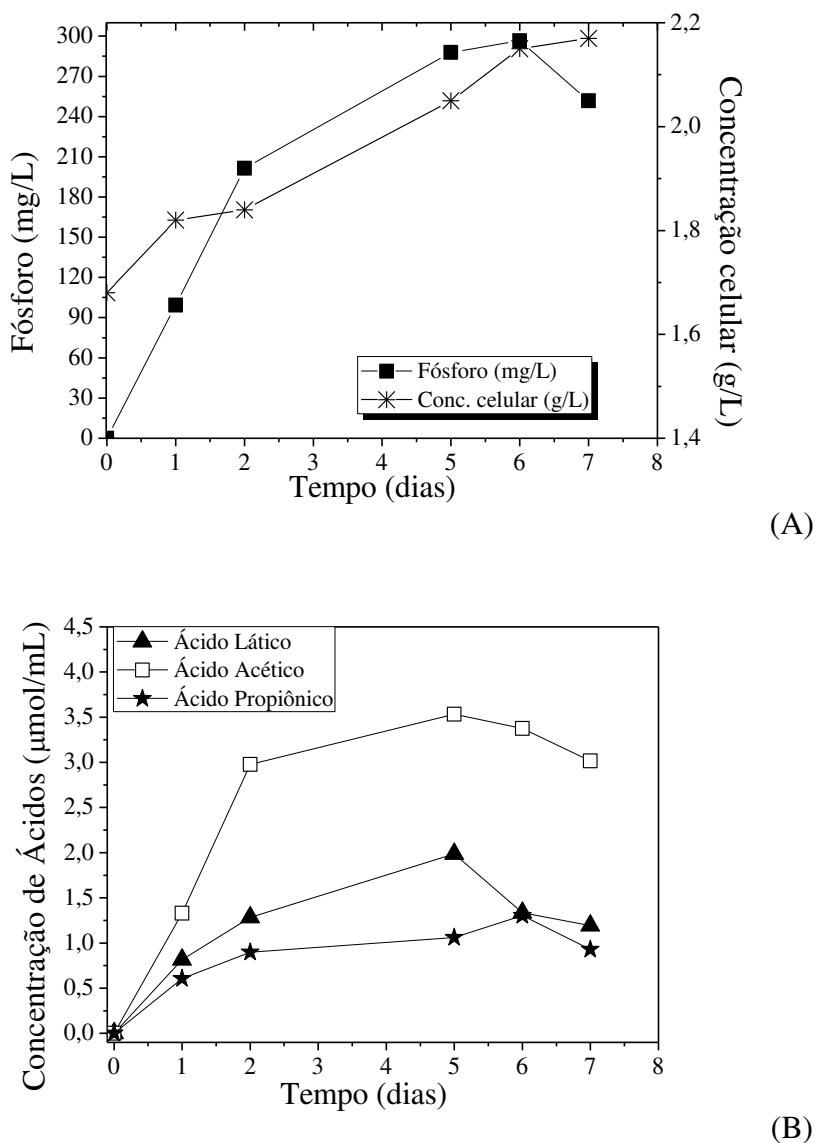


Figura 29 – Quantidade de fósforo solubilizado e concentração celular de *B.licheniformis* no meio com 5g/L de rocha (A), produção de ácidos ao longo do teste (B).

Vazquez e colaboradores (2000) propuseram que a produção de ácidos orgânicos por microrganismos da rizosfera de manguezais ocorreu em decorrência de possíveis mecanismos envolvidos na solubilização de fosfato de cálcio insolúvel. Para isto trabalharam com 6 espécies de bactérias, sendo elas, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus licheniformis*, *Vibrio proteolyticus*, *Paenibacillus macerans* e *Xanthobacter agilis*. Os autores verificaram que todas as espécies foram capazes de solubilizar fosfato insolúvel, embora em graus diferentes, sendo *V. proteolyticus* a espécie mais ativa na solubilização seguida da *X. agilis*. Obtiveram ainda, por meio de cromatografia gasosa, a identificação dos ácidos

orgânicos produzidos. Para as bactérias, os ácidos mais comuns produzidos foram lático, succínico, isobutírico, isovalérico e ácido acético.

Para a fermentação líquida com *Pseudomonas fluorescens* (Figura 30), o pH teve variação de  $2,2 \pm 0,1$ . O processo apresenta estabilidade a partir do quinto dia, período em que ocorre uma constância no valor de fósforo solubilizado e a quantidade de biomassa e a concentração de ácidos atinge o máximo e depois decresce, ou seja, a concentração passa a ser insuficiente para continuação do processo de solubilização.

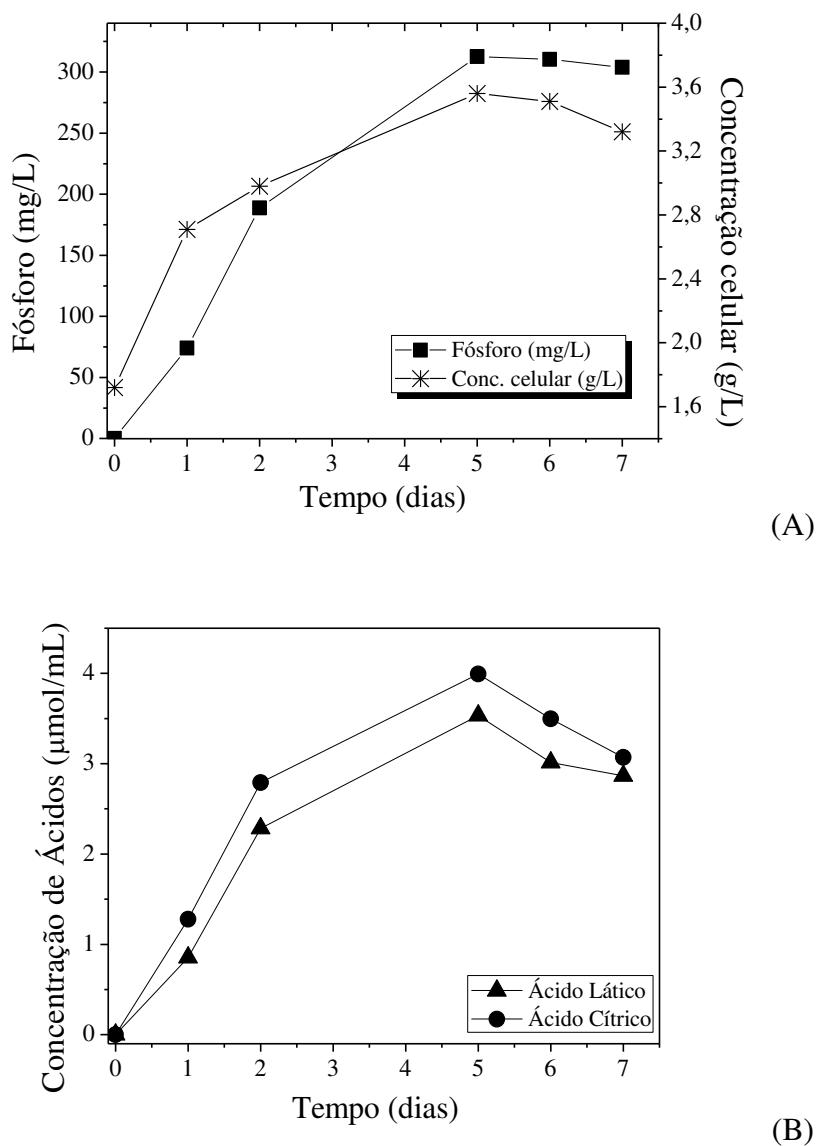


Figura 30 - Crescimento de *Pseudomonas fluorescens* no meio com 5 g/L de rocha e fósforo solubilizado (A), produção de ácidos ao longo do teste (B).

A concentração de fósforo solúvel foi de 312,7 mg/L, 40,1% de eficiência. A concentração de ácidos total máxima foi de 7,5 µmol/mL, sendo 4,0 µmol/mL de ácido cítrico e 3,5 µmol/mL de ácido lático.

Minaxi e colaboradores (2012) avaliaram estirpes bacterianas identificadas como *Bacillus* sp, com base no sequenciamento do rDNA 16S e verificaram muitas características benéficas desses microrganismos que auxiliam no crescimento das plantas. A estirpe solubilizou 17% de fósforo fornecidos no meio, além de ser notado uma queda de pH, que foi atribuído à produção de vários ácidos orgânicos no meio.

Na Figura 31 tem-se a concentração total de ácidos produzidos para a associação de bactérias (*B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *P. fluorescens*, *A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans*), atingindo máximo de 8,5 µmol/mL no período de dois dias e se manteve praticamente constante até o quinto dia, a partir do qual teve queda gradativa. Os ácidos formados foram o ácido lático, acético e cítrico, com destaque para o ácido lático que teve a maior concentração (4,2 µmol/mL) dentre os ácidos produzidos. O pH ficou no intervalo de 2,3 ± 0,1. A solubilização teve um pico no segundo dia e atingiu o máximo no quinto dia igual a 328,9 mg/L, eficiência de 40,1%. A maior concentração de biomassa e concentração de ácidos também ocorreu no quinto dia, confirmando a relação entre os parâmetros.

Yu e colaboradores (2012) estudaram os efeitos da associação com bactérias solubilizadoras de fosfato e bactérias fixadoras de nitrogênio na solubilização de rocha fosfática e o efeito gerado na promoção de crescimento e na absorção de nutrientes por mudas de noz. Esses pesquisadores encontraram uma forte correlação entre pH e concentração de fósforo solúvel, bem como a produção total de ácidos orgânicos e solubilização de fósforo. A associação de *Pseudomonas chlororaphis* e *Arthrobacter pascens* (A.P.) resultou em uma planta com maior altura e maior absorção de fósforo e nitrogênio, além de um aumento nas quantidades máximas destes elementos disponíveis no solo, variando entre 93,5 e 173,0 mg/L.

No presente estudo, ao trabalhar com a associação de bactérias, não foi observado um aumento significativo na eficiência do processo. O mesmo foi observado por Yu e colaboradores (2012) nos testes com inoculação de *B. megaterium* e *Antrobacter pascens*, no qual não conseguiram aumentar a quantidade máxima de fósforo e nitrogênio disponíveis no solo.

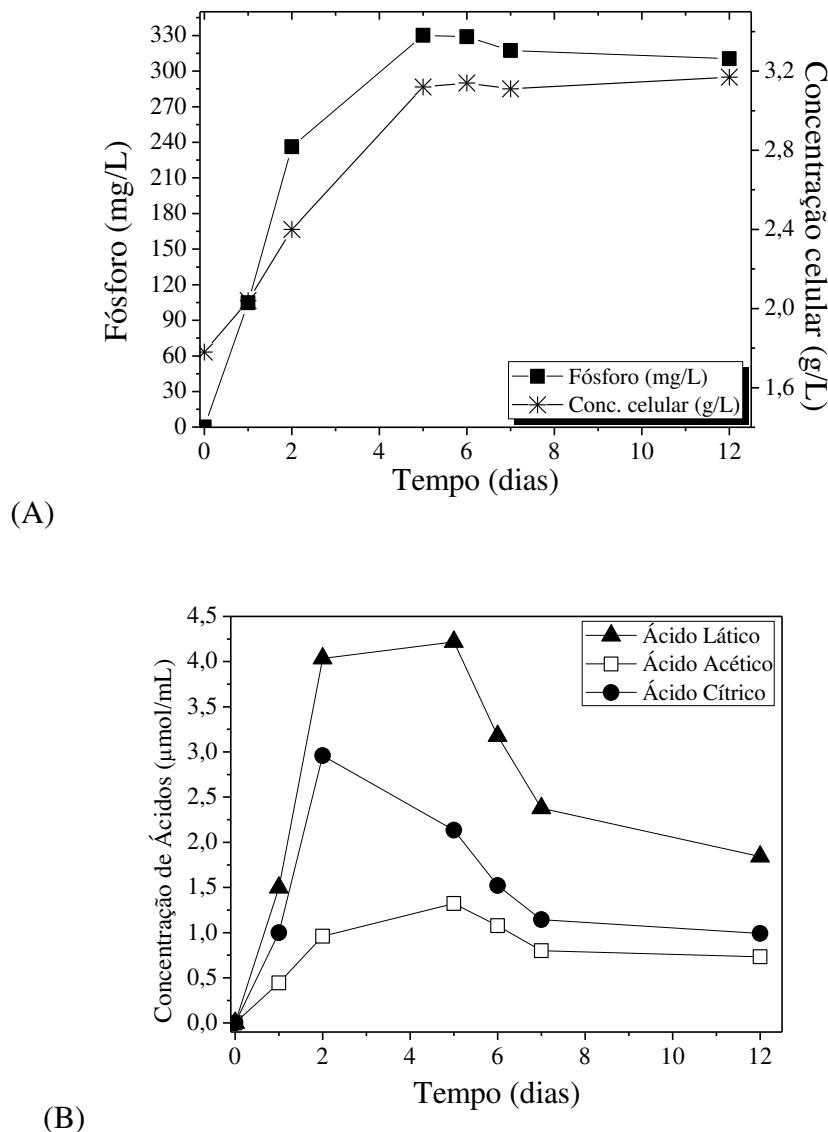


Figura 31 - Crescimento da associação das bactérias no meio com 5 g/L de rocha e fósforo solubilizado (A), produção de ácidos ao longo do teste (B).

Na Tabela 13 são observados os resultados obtidos para os testes em fermentação líquida utilizando bactérias, para avaliação e comparação dos parâmetros analisados ao longo dos testes, facilitando a visualização da melhor condição de operação do processo.

Tabela 13- Quadro comparativo dos testes em fermentação líquida utilizando bactérias

	<i>B. megaterium</i>	<i>B.licheniformis</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>P. fluorescens</i>	Associação
pH	2,3 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,3 ± 0,1
Células (g/L)	2,8	2,2	2,5	3,6	3,2
P (mg/L)	336,4	296,5	334,5	312,7	328,9
Eficiência (%)	43,2	38,1	42,9	40,1	42,2
Ácidos (μmol/mL)	7,9	6,8	7,7	7,5	8,5
Tempo (dias)	5	6	6	5	5

Ao avaliar os valores, verifica-se que o teste realizado em fermentação líquida apresentou eficiência de solubilização bem próxima para os microrganismos testados. O *Bacillus megaterium* se destaca por ter solubilizado maior quantidade de fósforo em intervalo de tempo inferior. A associação não foi promissora, pois não houve aumento de eficiência no processo.

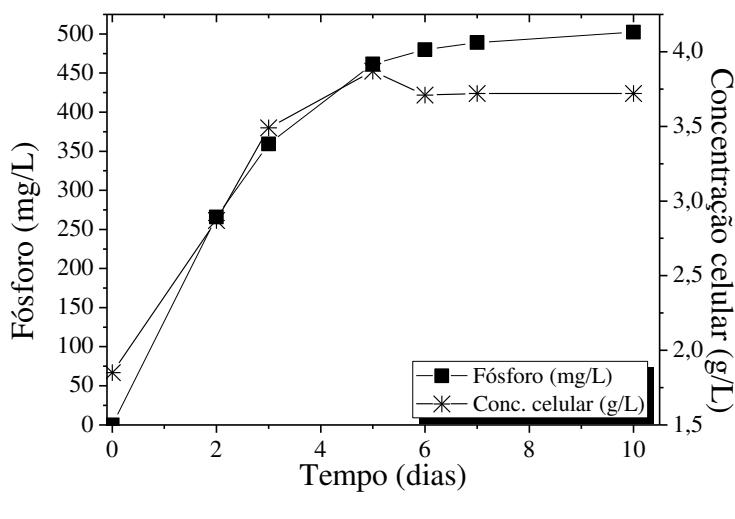
Na sequência, fez-se uma associação das bactérias do mesmo gênero, *Bacillus subtilis*, *B. megaterium* e *B. licheniformis*, a escolha também foi baseada nos resultados apresentados por cada microrganismo quando testadas isoladamente.

#### 4.4.1- Fermentação com a associação das bactérias

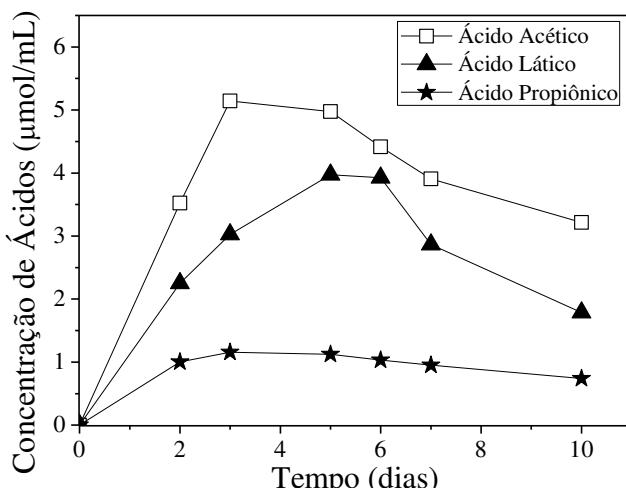
Foi realizado teste com a associação das bactérias *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus megaterium*. As bactérias cresceram em meio líquido caldo nutritivo, separadamente. Após o crescimento os microrganismos foram centrifugados, o sobrenadante desprezado e as células inoculadas em associação no meio líquido (Item 3.2.1.2) com 10 g/L de rocha e pH igual a 2. A associação das três bactérias foi feito pelo fato de tais bactérias apresentarem melhores resultados isoladamente, em comparação com a associação de todas as bactérias.

Na Figura 32 (A), são apresentados os resultados da solubilização de fósforo no processo de biolixiviação de rocha fosfática são apresentados, o qual atingiu o valor máximo no sexto dia, com pouca variação até o décimo dia. O comportamento do crescimento celular seguiu o mesmo comportamento da solubilização atingindo o máximo no quinto dia e permanecendo estável até o fim do processo. Na Figura 32 (B) a concentração de ácidos orgânicos total produzida foi monitorada, alcançando a concentração máxima e igual a 8,5 μmol/mL no

terceiro dia e diminuindo gradativamente até o décimo dia. Foram produzidos os ácidos lático, propiônico e o ácido acético, sendo que o ácido acético alcançou a maior concentração entre os ácidos formados.



(A)



(B)

Figura 32 - Crescimento da associação de *B. subtilis*, *B. megaterium* e *B. licheniformis* em meio com 10 g/L de rocha e fósforo (A), produção de ácidos ao longo do teste (B).

A variação do pH foi de 2,53 inicialmente a 3,37 no décimo dia. A associação (*B. megaterium*, *B. licheniformis* e *B. subtilis*) apresentou uma solubilização com eficiência de 32,2% (502,3 mg/L de fósforo), enquanto a associação de todas (*Bacillus*, *Pseudomonas* e *Acidithiobacillus*) obteve solubilização de 42,2%. Vale ressaltar que o teste feito somente com

a associação (*B.megaterium*, *B.licheniformis* e *B.subtilis*) foi com 10 g/L de rocha, e sabe-se que quanto maior a concentração de rocha menor a eficiência.

Yu e colaboradores (2012) detectaram que a solubilização de rocha fosfática no meio líquido a partir das duas estirpes de bactérias solubilizadoras de fosfato (*Pseudomonas chlororaphis* e *Bacillus megaterium*) foi acompanhada por notável queda no pH e aumento na produção total de ácido orgânico, respectivamente.

#### **4.4.2 - Fermentação líquida com as bactérias acidófilas para avaliar a influência do pH inicial do meio**

Ensaios foram realizados com as bactérias acidófilas *A.thiooxidans* e *A. ferrooxidans* em meio líquido (SAMPAIO et al., 2003) contendo rocha 5 g/L. Foram feitos testes com o pH inicial igual a 2 e monitorado ao longo do processo com solução de ácido sulfúrico 1N e sem ajuste inicial. A concentração de ácidos produzida não foi analisada, pois as acidófilas não produzem ácidos orgânicos.

Nas Figuras 33 e 34, o fósforo solúvel no processo de biolixiviação de rocha fosfática foi quantificado e o comportamento do crescimento celular avaliado. Foi feito teste com ajuste inicial do pH para 2 (A) e teste sem ajuste de pH inicial (B), contendo 5 g/L de rocha fosfática. Para o processo com ajuste do pH este manteve-se em  $2,2 \pm 0,1$  enquanto para os testes sem ajuste do pH a variação foi de 2,3 no instante inicial aumentando gradativamente até 5,0 no sexto dia e diminuindo para 4,0 no nono dia. A concentração máxima de biomassa foi atingida no quarto dia, com leve decréscimo posterior. A concentração de fósforo solúvel atingiu o máximo de 227,1 mg/L, 29,1% de eficiência no sexto dia para os testes feito com ajuste do pH. Já para o teste sem controle do pH a solubilização máxima foi de 148,6 mg/L, 19,1% de eficiência alcançada no nono dia em conformidade com a queda do pH nesse período.

Segundo Davis; Solomon e Berg (1990), os processos metabólicos da bactéria *A.thiooxidans* ocasionam diminuição do pH, que às vezes chega próximo do pH = 2.

No presente trabalho os testes utilizando pH inicial igual a 2 apresentaram resultados superiores em 34,5% para solubilização em comparação aos testes realizados sem ajuste de pH inicial. Avdalovic e colaboradores (2015) observaram que a variação do pH inicial 2,5 das suspensões foi diminuída para pH 2 ao longo de 28 dias, utilizando *Acidithiobacillus sp.* A

solubilização do fósforo a partir da rocha fosfática foi correlacionada com a diminuição do pH através da concentração de ácido sulfúrico produzido pelas bactérias.

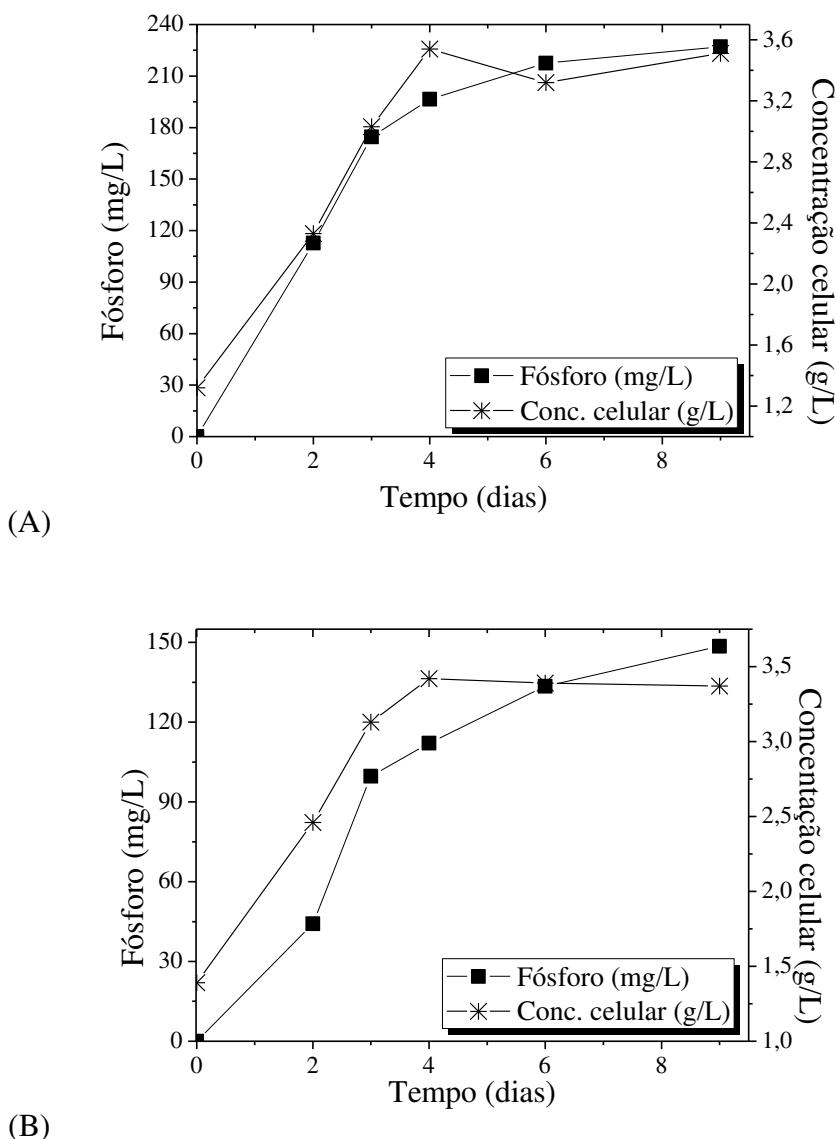


Figura 33 – Concentração de fósforo e de biomassa para os *A. thiooxidans*, com ajuste inicial do meio para pH 2 (A) e sem ajuste inicial do pH (B) em meio contendo 5 g/L de rocha.

No processo utilizando *A. ferrooxidans* com ajuste do pH, este manteve-se em  $2,3 \pm 0,3$ , já para os testes sem ajuste do pH a variação foi de 2,3 no instante inicial aumentando gradativamente até o nono dia alcançando o valor de 4,1.

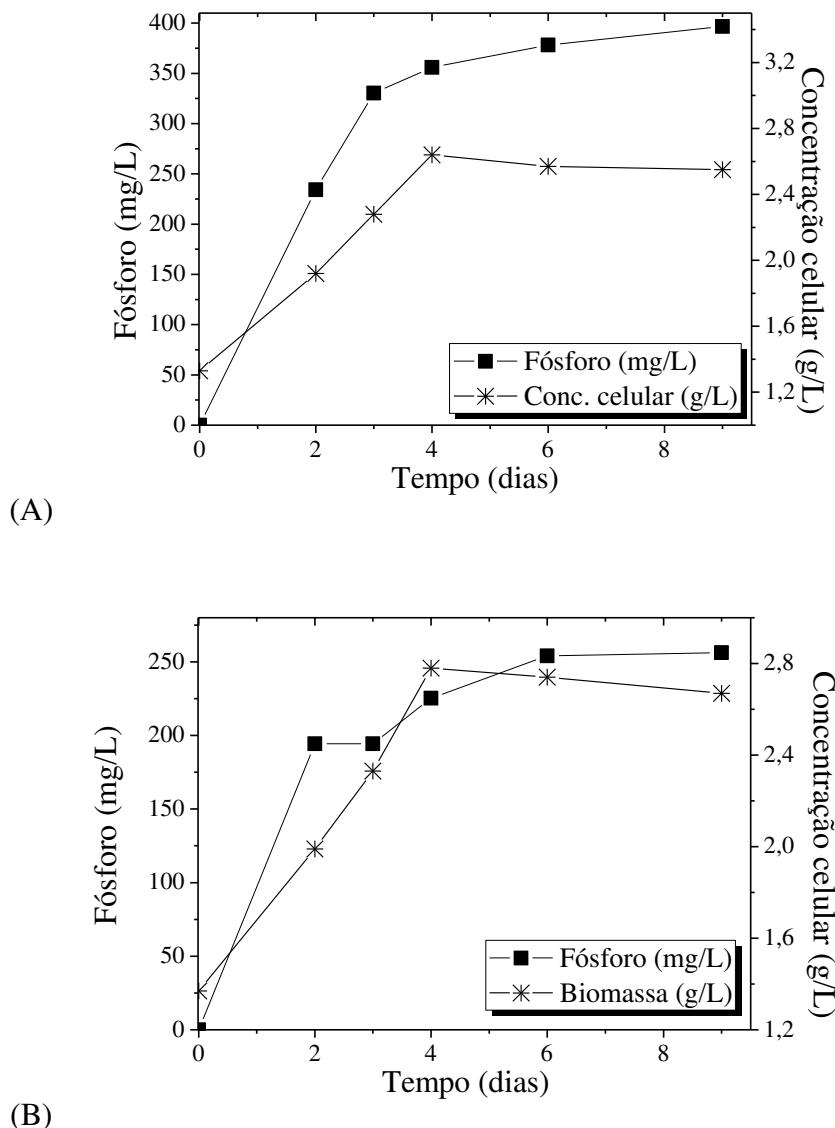


Figura 34 – Concentração de fósforo e concentração de biomassa para os testes utilizando *A. ferrooxidans*, com ajuste inicial do meio para pH 2 (A) e sem ajuste inicial do pH (B) em meio com 5 g/L de rocha.

Para os testes feito com *A. ferrooxidans*, o comportamento foi similar para as duas condições testadas, pH controlado em 2 e sem controle do pH, sendo o maior resultado alcançado para os testes com pH controlado. Tal resultado pode estar relacionado com o acréscimo de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  para ajuste do pH. A solubilização de fósforo foi de 396,6 mg/L, 50,9% de eficiência para o teste com ajuste inicial do pH e de 256,3 mg/L, eficiência de 32,9% para os testes sem ajuste inicial do pH, num período de nove dias. Comparando os resultados das duas acidófilas (*A. thiooxidans* e *A. ferrooxidans*) para as mesmas condições, com ajuste inicial

do pH e sem ajuste inicial do pH, os testes utilizando *A.ferrooxidans* geraram resultados com maior eficiência.

Gholami; Borghei e Mousavi (2011) estudaram a lixiviação bacteriana de um catalisador de refinação Mo-Co-Ni, usando *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Acidithiobacillus thiooxidans*. Os resultados mostraram que, após a biolixiviação utilizando *A.ferrooxidans* na presença de sulfato ferroso, foram obtidas extrações máximas de 63% de Al, 96% de Co, 84% de Mo e 99% de Ni após 30 dias a pH 1,8-2,0. No entanto, as extrações mais elevadas usando *A.thiooxidans* na presença de enxofre foram 2,4% de Al, 83% de Co, 95% de Mo e 16% de Ni após 30 dias a pH 3,9-4,4. Os resultados experimentais sugerem que *A.ferrooxidans* ou *A.thiooxidans* podem ser útil para solubilizar metais tóxicos como Ni, Co, Mo em catalisadores de refinaria. A pesquisa mostrou também que a maior lixiviação de metais ocorreu através da lixiviação com *A.ferrooxidans*.

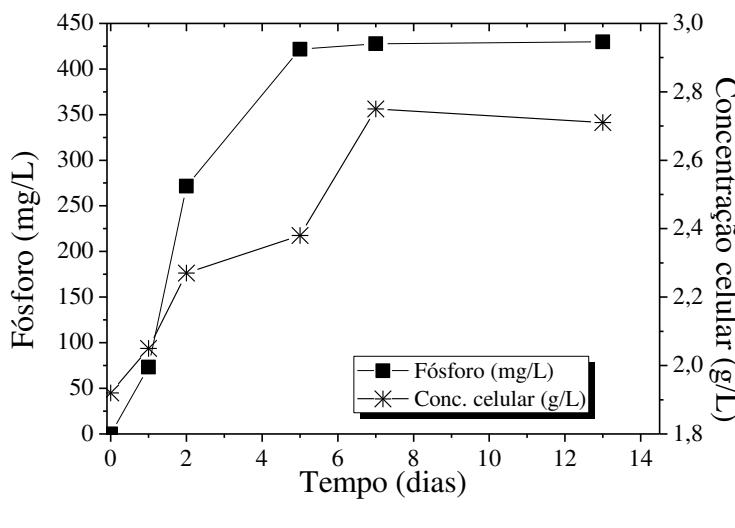
#### **4.4.3 - Fermentação líquida com as bactérias para avaliação da influência da concentração de rocha fosfática e composição do meio líquido sintético**

Foram feitos testes inoculando-se as bactérias (*B.megaterium*, *B.licheniformis* e *P.fluorescens*) isoladamente e diretamente em meio caldo nutritivo modificado. O fosfato de potássio dibásico foi retirado e substituído por rocha fosfática na concentração de 5 g/L.

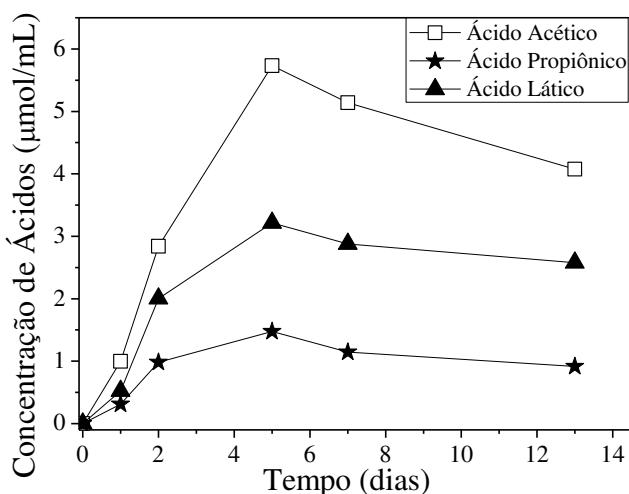
Nas Figuras 35 a 41 (A), analisam-se a quantidade de fósforo solúvel no processo de biolixiviação de rocha fosfática e o comportamento do crescimento celular. Para o teste realizado utilizando-se *Bacillus megaterium*, o pH aumentou gradativamente ao longo do processo saindo de 1,96 no primeiro dia e chegando a 4,34 no décimo terceiro dia. Nas Figuras 35 a 41 (B), tem-se a concentração de ácidos orgânicos produzida. Utilizando *B. megaterium*, a concentração de ácidos foi máxima no quinto dia totalizando 10,425 µmol/mL com formação dos ácidos acético, propiônico e lático, destacando-se o ácido acético. A solubilização de fósforo foi máxima e igual a 429,7 mg/L no quinto dia em conformidade com a produção de ácidos e obteve 55,14% de eficiência, um aumento de 21,71% em relação ao teste feito no qual as bactérias cresceram em meio caldo nutritivo e inoculados posteriormente em meio líquido (Item 3.2.1.2), contendo 5 g/L de rocha.

Rolewicz; Rusek e Borowik (2017) estudaram *B.megaterium* para obtenção de fertilizantes granulares à base de cinzas provenientes da combustão de resíduos e ossos terrestres com solubilização de fósforo e os testes das plantas piloto confirmaram que é possível produzir

fertilizantes fosfatados granulados usando o microrganismo para solubilização de fósforo e que os fertilizantes obtidos são caracterizados por conteúdo de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> semelhante ao superfosfato simples.



(A)



(B)

Figura 35 - Crescimento de *B.megaterium* e quantidade de fósforo solubilizado em meio caldo nutritivo modificado contendo 5 g/L de rocha fosfática (A) produção de ácidos orgânicos ao longo do teste (B).

No teste realizado utilizando-se *Bacillus licheniformis*, o pH manteve-se em  $2,2 \pm 0,2$ . A produção total de ácidos orgânicos obteve máximo de 11,0  $\mu\text{mol/mL}$ , com formação dos ácidos acético, lático e propiônico. O ácido acético foi o que atingiu as maiores concentrações (6,0  $\mu\text{mol/mL}$ ) no período de cinco dias, mesmo intervalo de tempo em que a concentração de biomassa e a quantidade de fósforo solúvel atingiram o máximo e posterior estabilidade,

mostrando mais uma vez a relação entre os parâmetros. A solubilização foi de 427,82 mg/L, 54,6% de eficiência valor muito próximo ao alcançado pelos testes realizado com *B.megaterium* e 43,5% maior em relação ao teste feito no qual as bactérias cresceram em meio caldo nutritivo e inoculados posteriormente em meio líquido (Item 3.2.1.2), contendo 5 g/L de rocha.

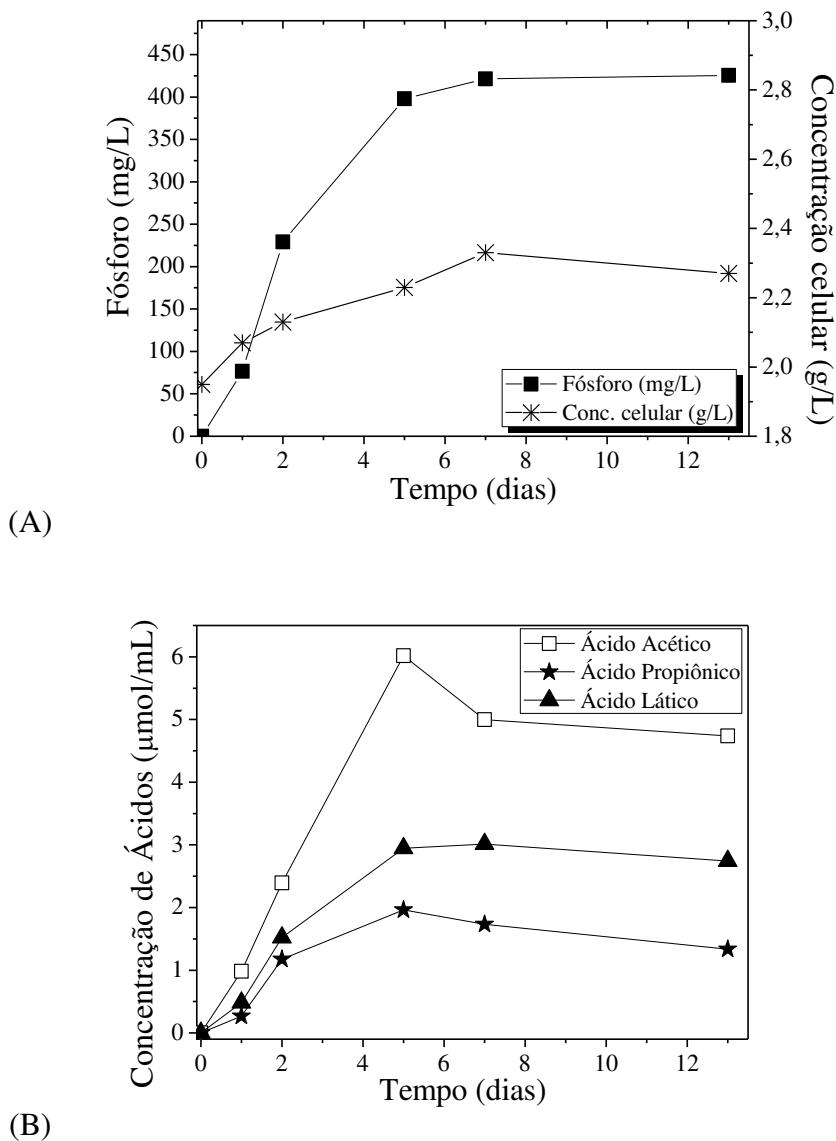


Figura 36 - Crescimento de *B.licheniformis* e quantidade de fósforo solúvel em meio caldo nutritivo modificado com 5 g/L de rocha fosfática (A) produção de ácidos orgânicos ao longo do teste (B).

Goswami e colaboradores (2014) realizaram um trabalho preliminar realizado para isolar bactérias promotoras do crescimento de plantas. De todos os isolados, a espécie de *Bacillus*

*licheniformis* mostrou os traços mais proeminentes *in vitro*. As experiências realizadas para testar a promoção do crescimento do amendoim pela estirpe de *Bacillus licheniformis* mostraram aumento de 31% no comprimento total da planta e 43% de aumento na biomassa fresca quando o NaCl 50 mM adicional foi suplementado no solo.

Para o teste realizado utilizando-se *Pseudomonas fluorescens*, o pH teve um aumento gradativo ao longo do processo sendo a variação de 1,96 a 2,94.

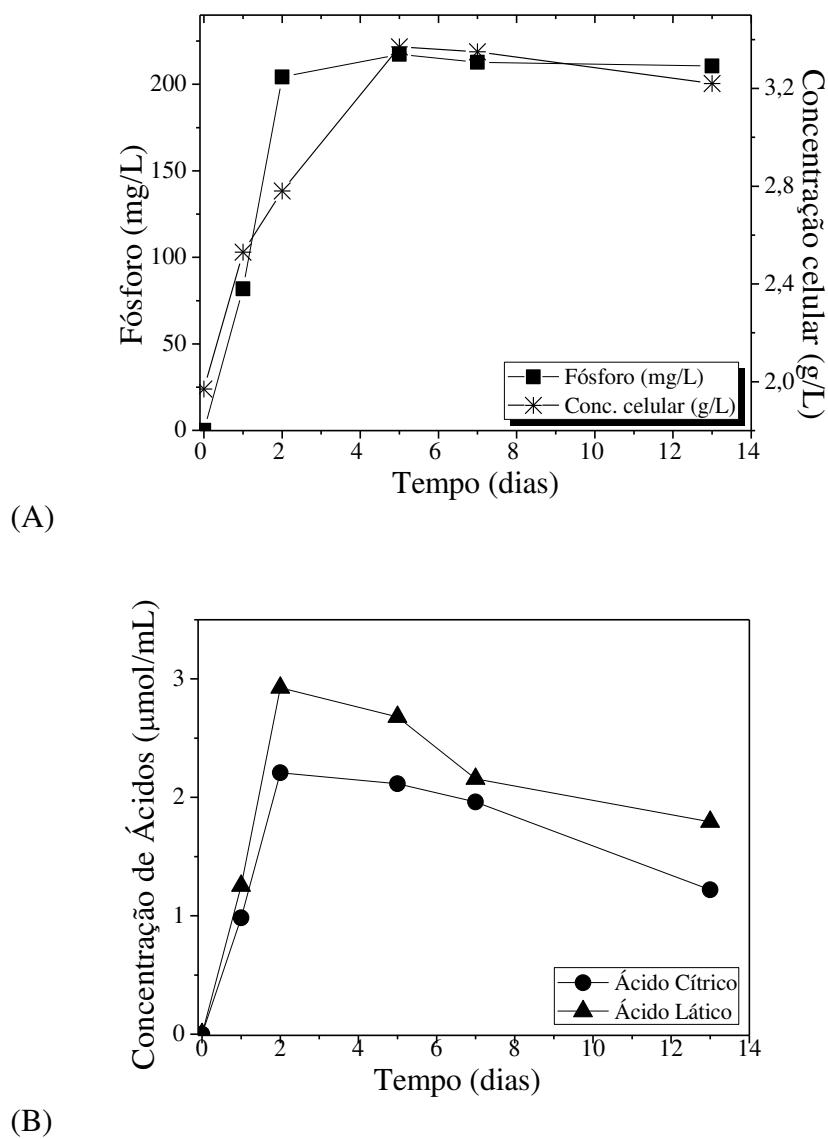


Figura 37 - Crescimento de *P. fluorescens* e fósforo solúvel em meio caldo nutritivo modificado com 5 g/L de rocha fosfática (A) produção de ácidos orgânicos ao longo do teste (B).

A concentração de ácidos orgânicos total foi máxima no segundo dia e igual a 5,1  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ , com formação dos ácidos cítrico e lático. A solubilização de fósforo foi de 217,34

mg/L de fósforo com eficiência de 27,9%, valor inferior aos encontrados para *B.megaterium* e *B.licheniformis*. Observa-se também que a solubilização foi menor em relação ao teste realizado com *P.fluorescens* no qual as bactérias cresceram em meio caldo nutritivo e inoculados posteriormente em meio líquido (Item 3.2.1.2) contendo 5 g/L de rocha. A baixa eficiência pode ser relacionada com a queda em 31,8% na produção de ácido devido a mudança na composição do meio.

Segundo Hamdali e colaboradores (2010), a eficiência do processo de solubilização de rocha fosfática está relacionado com as condições nutricionais e fisiológicas complexas e específicas dos microrganismos solubilizadores de fósforo.

Testes em meio caldo nutritivo modificado (de composição igual a 1,5g extrato de carne, 5g de peptona, 5g cloreto de sódio e 10g/L de rocha), foram realizados utilizando os microrganismos cujos os resultados estão apresentados nas Figuras 38, 39 e 40. Os mesmos foram centrifugados e inoculados no meio com a composição informada anteriormente.

Utilizando-se *Bacillus megaterium*, o pH aumentou gradativamente ao longo do processo, variando de 2,2 no primeiro dia a 6,6 no quarto dia. A concentração dos ácidos orgânicos total produzidos foi de 1,7 µmol/mL com produção dos ácidos acético, lático e propiônico, a concentração máxima foi alcançada no primeiro dia e permaneceu praticamente constante ao longo de todo o processo. A solubilização foi de 76,2 mg/L de fósforo, eficiência de 4,9% também no primeiro dia. Em comparação com o teste sem modificação no meio, houve redução 83,5% na formação de ácidos e 82,3% em relação a solubilização.

No trabalho desenvolvido por Arshadi; Mousavi e Rasoulnia (2016) foram utilizados *Bacillus megaterium* na biolixiviação de Au e Cu. Na condição ideal cerca de 72% de Cu foi solubilizado e 65g de Au/tonelada de bactérias foram extraídos.

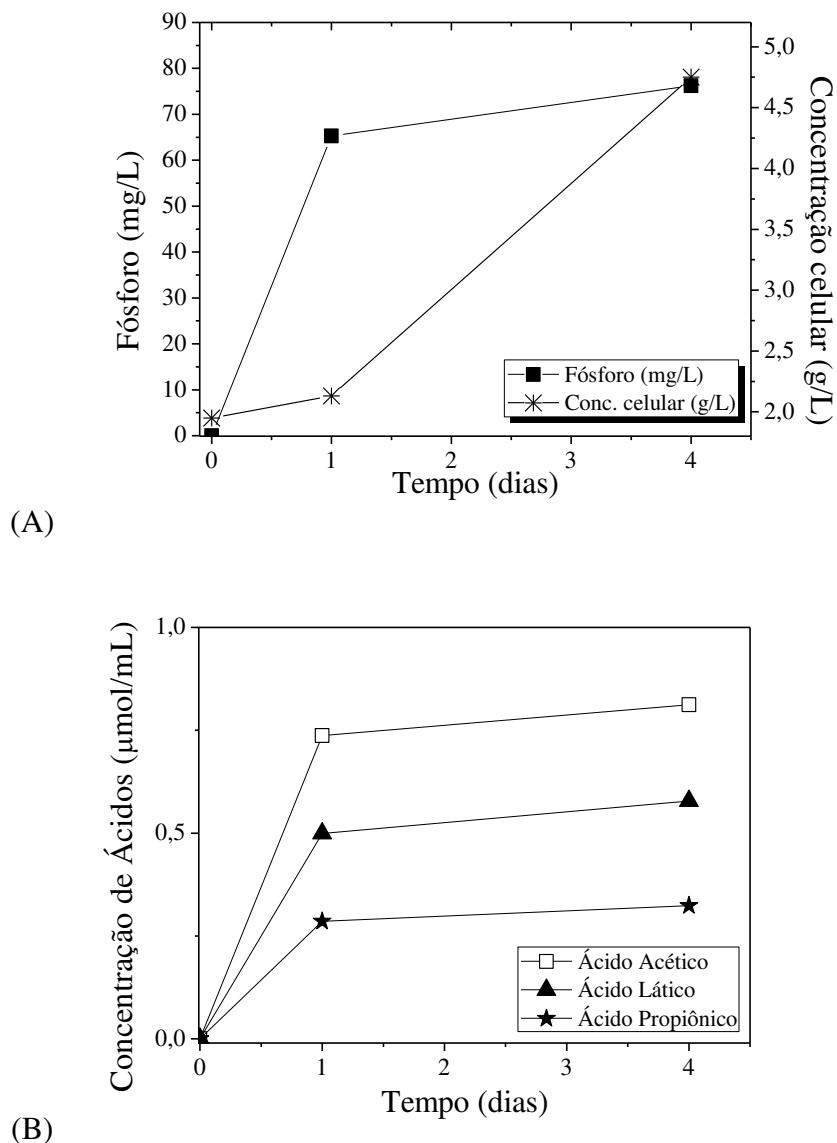


Figura 38 - Crescimento de *B. megaterium* e fósforo em meio caldo nutritivo modificado com 10 g/L de rocha fosfática (A) produção de ácidos orgânicos ao longo do teste (B)

Para o teste utilizando-se *Bacillus licheniformis*, o pH aumentou gradativamente ao longo do processo, apresentando comportamento semelhante ao observado no processo utilizando *B. megaterium* sendo a variação de 2,2 no primeiro dia a 6,6 no quarto dia. A produção de ácidos orgânicos total foi máxima e igual a 1,7 μmol/mL, com produção dos ácidos acético, lático e propiônico. Verifica-se a relação direta entre a quantidade de ácidos produzidos, quantidade de biomassa e a concentração de fósforo solúvel. A solubilização foi de 75,9 mg/L de fósforo solúvel, 4,9% de eficiência no primeiro dia e manteve-se praticamente constante no decorrer do processo. Em comparação com o teste realizado sem modificação no meio, houve redução 74,6% na formação de ácidos e 84,2% em relação a solubilização.

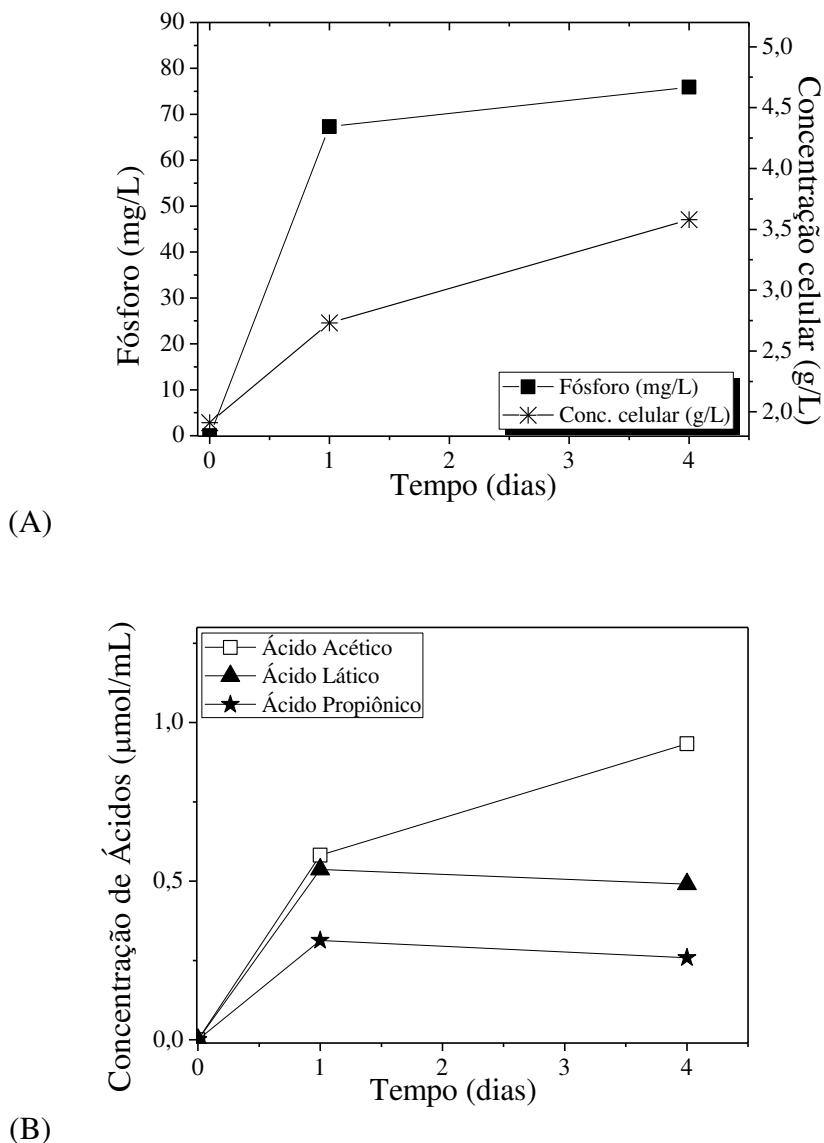


Figura 39 - Crescimento de *B.licheniformis* e fósforo em meio caldo nutritivo modificado com 10 g/L de rocha fosfática (A) produção de ácidos orgânicos ao longo do teste (B).

Para o ensaio com *Pseudomonas fluorescens*, o pH aumentou gradativamente ao longo do processo, apresentando comportamento semelhante ao observado no processo utilizando *B. megaterium* e *B. licheniformis* sendo a variação de 2,2 no primeiro dia a 6,6 no quarto dia. Foram produzidos os ácidos orgânicos cítrico e láctico; sendo a concentração de ácido cítrico a mais expressiva no processo atingindo a concentração de 0,9  $\mu\text{mol/mL}$  no primeiro dia e leve aumento até o quarto dia, atingindo 1,1  $\mu\text{mol/mL}$  no quarto dia. A concentração total variou entre 1,5 a 2,0  $\mu\text{mol/mL}$ .

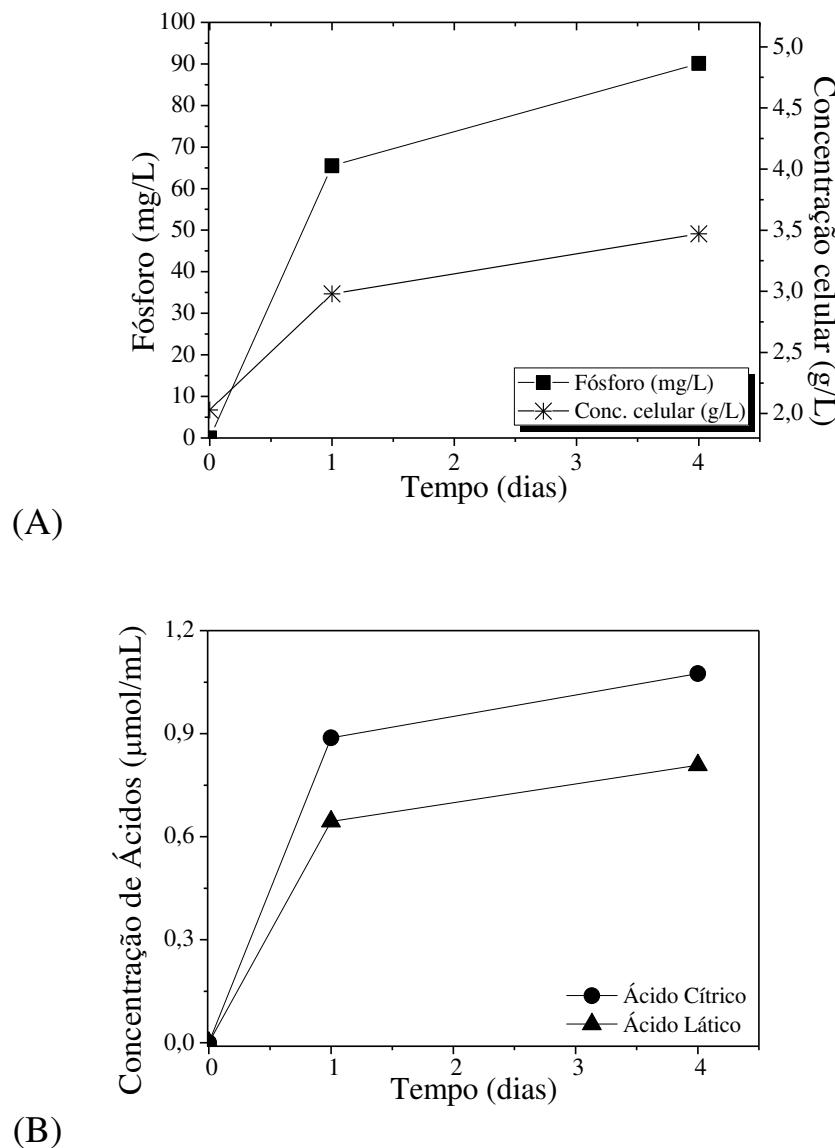


Figura 40 - Crescimento de *P. fluorescens* e fósforo em meio caldo nutritivo modificado com 10 g/L de rocha fosfática (A) produção de ácidos orgânicos ao longo do teste (B).

A solubilização de fósforo foi de 90,1 mg/L, eficiência de 5,8%, no quarto dia, representando uma queda de 58,6% em relação ao teste feito sem modificação no meio. Em relação aos ácidos houve redução em 74,6% e 84,2% em relação a solubilização. Por outro lado, ao comparar as três bactérias testadas nas mesmas condições meio caldo nutritivo modificado, tem-se que *P. fluorescens* apresentou eficiência superior a 15,7% e a produção de ácidos foi de 8,7% maior. Embora as espécies do gênero *Bacillus* tenha produzido ácidos acético, lático e propiônico, enquanto as *Pseudomonas* produziram ácidos cítrico e lático, fato este que está em conformidade com os estudos de Mendes e colaboradores (2014), os quais

afirmam que a eficiência de um determinado ácido orgânico depende das características químicas do ácido produzido, tais como a quantidade e a posição dos grupos carboxílico e hidroxila.

Os testes realizados inoculando as bactérias em meio caldo nutriente modificado e acrescentando rocha, todos apresentaram resultados piores daqueles em que as bactérias cresceram em meio caldo nutriente e então foram inoculadas em meio líquido (Item 3.2.1.2) contendo 10 g/L de rocha. O aumento na concentração de rocha fosfática, também contribuiu para a diminuição da eficiência da solubilização, tendo-se portanto que o meio é uma variável significativa no processo.

Outra condição testada foi a substituição do meio líquido (Item 3.2.1.2) por meio simples fosfato (Apêndice A), com inóculo de bactérias *B.megaterium*, sendo o pH do meio não ajustado e a concentração de rocha de 5 g/L.

No teste utilizando *Bacillus megaterium* em meio simples fosfato (Figura 41), o pH aumentou gradativamente ao longo do processo, variando de 2,2 no primeiro dia a 4,1 no décimo quarto dia. Os ácidos orgânicos produzidos foram os ácidos acético, lático e propiônico. A concentração máxima verificada foi observada no quinto dia para os ácidos e igual a 3,0 µmol/mL. A maior concentração de fósforo solúvel teve um pico no quinto dia e atingiu o máximo no décimo terceiro dia de 179,7 mg/L de fósforo com eficiência de 23,1%. Comparando com os resultados dos testes anteriores vê-se uma crescente solubilização mesmo depois do pico de ácidos orgânicos totais produzidos.

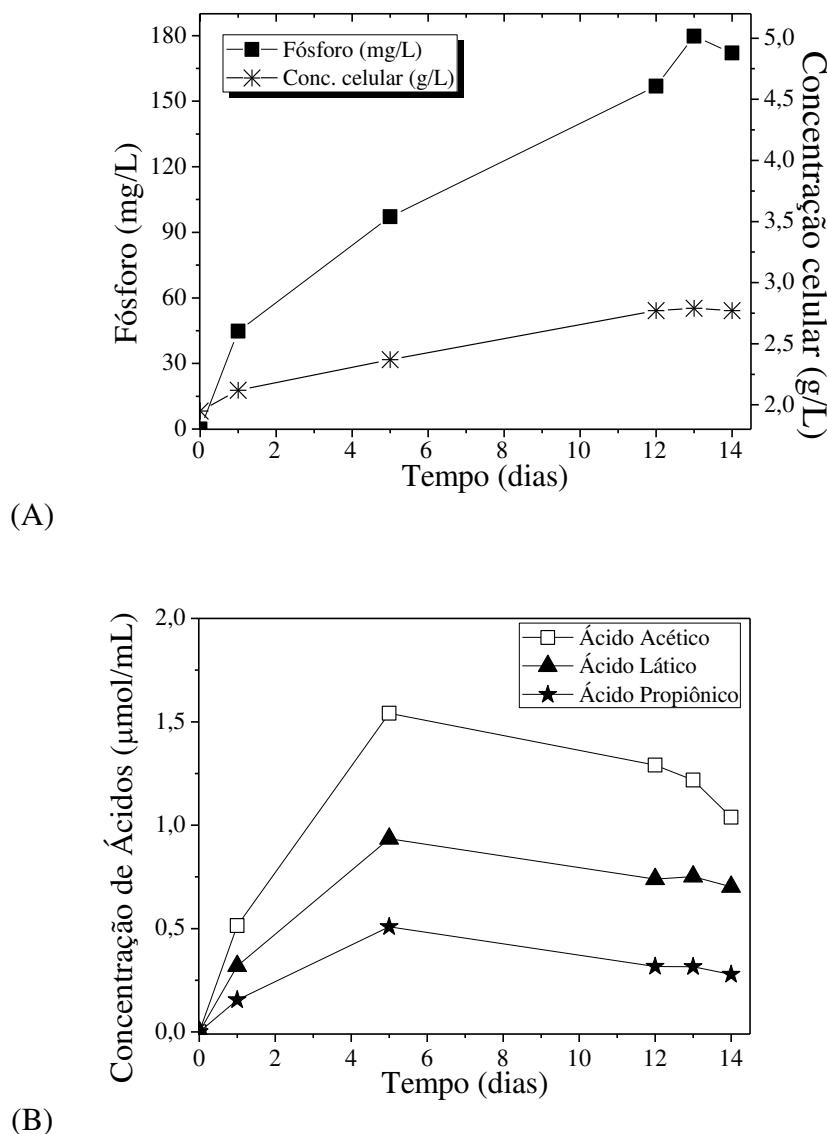


Figura 41 - Crescimento de *B.megaterium* em meio simples fosfato contendo 5g/L e fósforo (A) produção de ácidos orgânicos ao longo do teste (B).

Os resultados para os testes utilizando *B. megaterium* nos diferentes tipos de meio testado encontram-se na Tabela 14, na qual verifica-se que o meio caldo nutritivo com substituição do fosfato de potássio dibásico por rocha foi o que apresentou condições que favoreceram uma melhor solubilização, devido a maior produção de ácidos.

Tabela 14 – Resultados obtidos para os testes utilizando *B. megaterium* nos diferentes meios testados

	<i>B.megaterium</i> (meio caldo nutriente sem $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	<i>B.megaterium</i> (meio caldo nutriente modificado)	<i>B.megaterium</i> (meio simples fosfato)
pH	2,0-4,3	2,2-6,6	2,2-4,1
Células (g/L)	2,75	4,75	2,79
P (mg/L)	429,7	76,2	179,7
Eficiência (%)	55,1	9,8	23,1
Ácidos( $\mu\text{mol/mL}$ )	10,4	1,7	3,0
Tempo (dias)	5	4	13

A avaliação da concentração de rocha e composição do meio também foi realizada para a bactéria *A.ferrooxidans*. As bactérias foram inoculadas a 5% em meio líquido de cultivo T&K. O pH do meio não foi ajustado inicialmente e foi monitorado ao longo do processo, a concentração de rocha foi variada em 2, 3,5 e 5 g/L. A composição do meio líquido foi testada variando-se a concentração de sulfato ferroso, com as quantidades de 120 mM e 60 mM (33,3 e 16,7g de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$  respectivamente). O teste foi realizado com *A.thiooxidans*, em reatores cônicos de bancada, contendo meio líquido de cultivo 9K, sem ajuste inicial do pH do meio com concentração de rocha 10 g/L foram avaliados.

Nas Figuras 42 a 45 (A), são apresentados a quantidade de fósforo solúvel no processo de biolixiviação de rocha fosfática e o comportamento do crescimento celular para *A.ferrooxidans*, sem ajuste inicial do pH e sem controle ao longo do processo, em meio contendo 2, 3,5 e 5 g/L de rocha fosfática e 120 mM de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$ . Nas Figura 42 a 45 (B) verificam-se a quantidade de fósforo solúvel no processo de biolixiviação de rocha fosfática e o comportamento do crescimento celular, sem ajuste inicial do pH e sem controle ao longo do processo, em meio contendo 2, 3,5 e 5 g/L de rocha fosfática e 60 mM de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$ .

Nos testes utilizando *A. ferrooxidans* em meio T&K com 120 mM de sulfato ferroso e 2 g/L de rocha, a variação do pH foi de 2,7 no primeiro dia, diminuindo gradativamente até 1,9 no décimo sétimo dia. Para o teste em meio T&K com 60 mM de sulfato ferroso e 2 g/L de rocha a variação do pH foi de 2,7 a 2,0 do primeiro ao décimo sétimo dia. A maior variação de pH ocorreu no teste com meio contendo 120 mM de sulfato ferroso, o que justifica a

diferença na solubilização de fósforo que foi de 88,2% e 76,7% para os testes realizados em meio contendo 120 mM e 60 mM de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$  respectivamente.

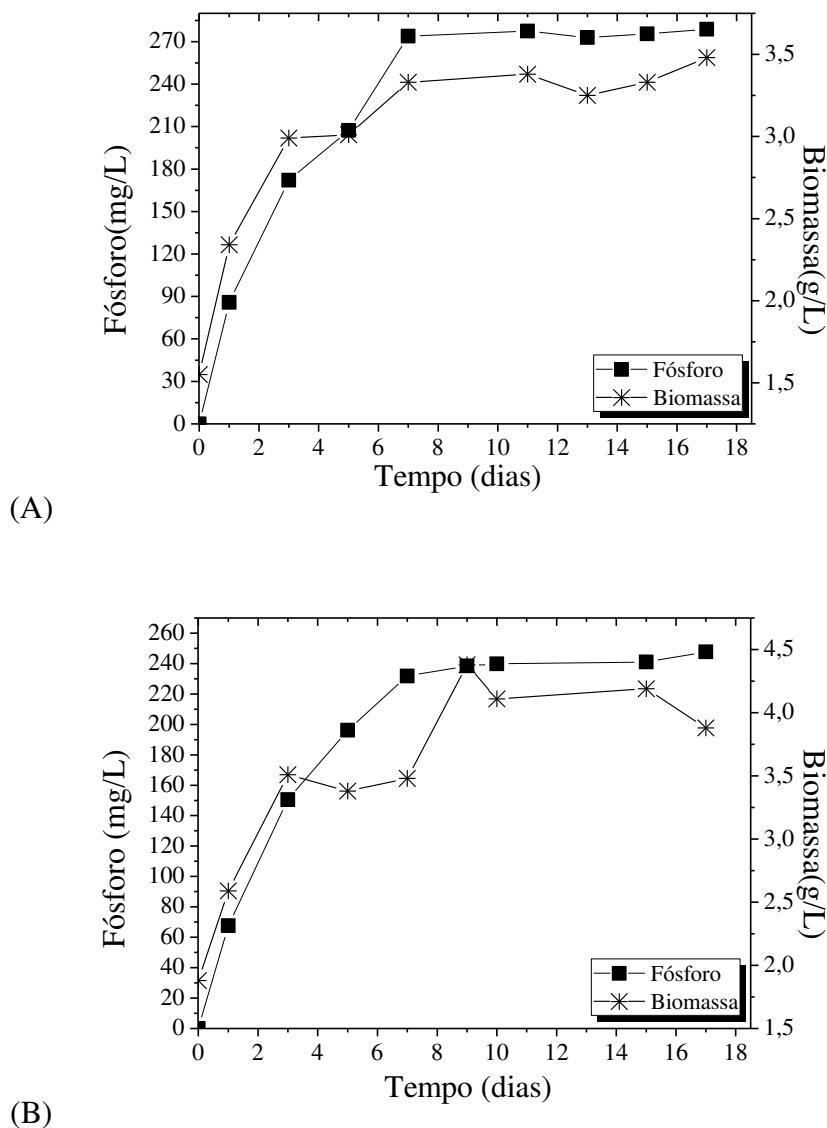
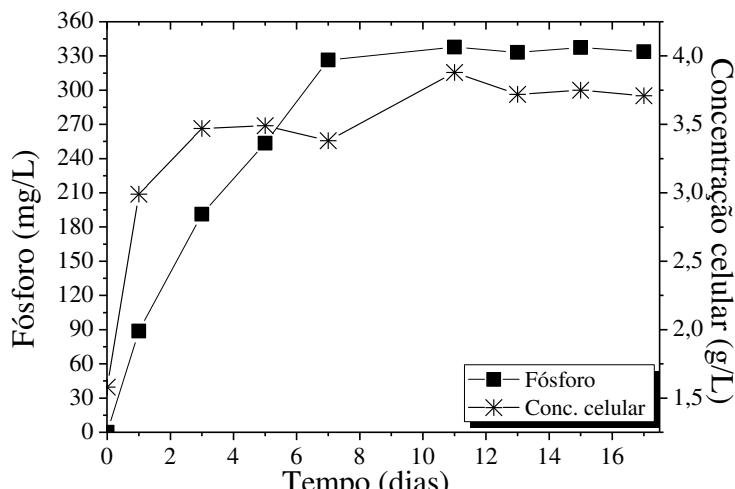


Figura 42 - Crescimento de *A. ferrooxidans* e fósforo solúvel no meio de cultivo T&K, com 2 g/L de rocha e 120 mM de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$  (A) e meio com 60 mM de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$  (B).

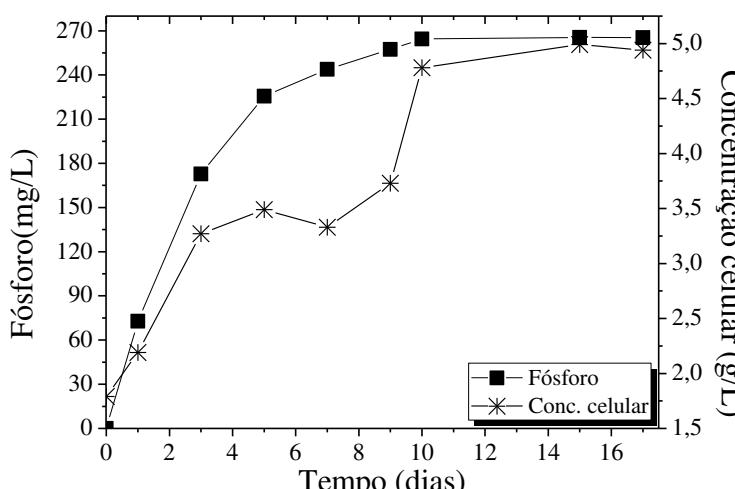
Pode-se avaliar que, a concentração de biomassa e quantidade de fósforo solúvel atingem o equilíbrio a partir do sétimo dia de fermentação para as duas concentrações de meio estudados. Verifica-se, que o meio contendo 120 mM de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$  favoreceu uma maior produção de biomassa, justificando assim os melhores resultados, já que tais parâmetros apresentam relação direta entre si.

Nos trabalhos realizados por Avdalović e colaboradores (2015), os resultados mostraram que até 34,5% do fósforo inorgânico foi lixiviado da mistura de rocha fosfática com pirita, quando em suspensão com *Acidithiobacillus* sp. Ao mesmo tempo o grau de lixiviação de uma suspensão de controle sem *Acidithiobacillus* sp foi apenas de 3,8.

No teste utilizando *A. ferrooxidans* em meio contendo 3,5 g/L de rocha fosfática e 120 mM de Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a variação do pH apresentou comportamento semelhante ao teste realizado com concentração de rocha de 2 g/L, sendo de 2,7 no primeiro dia e diminuindo gradativamente até 1,84 no décimo sétimo dia. Para o testes em meio contendo 3,5 g/L de rocha fosfática e 60 mM de Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a variação do pH foi de 2,7 a 2,0 do primeiro ao décimo sétimo dia.



(A)

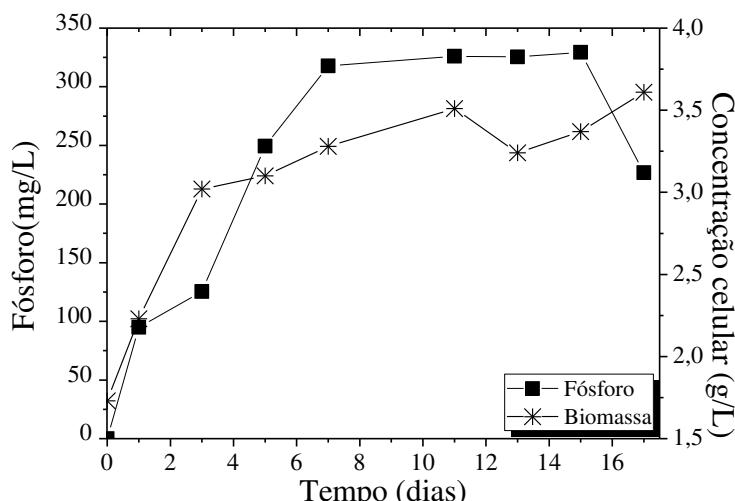


(B)

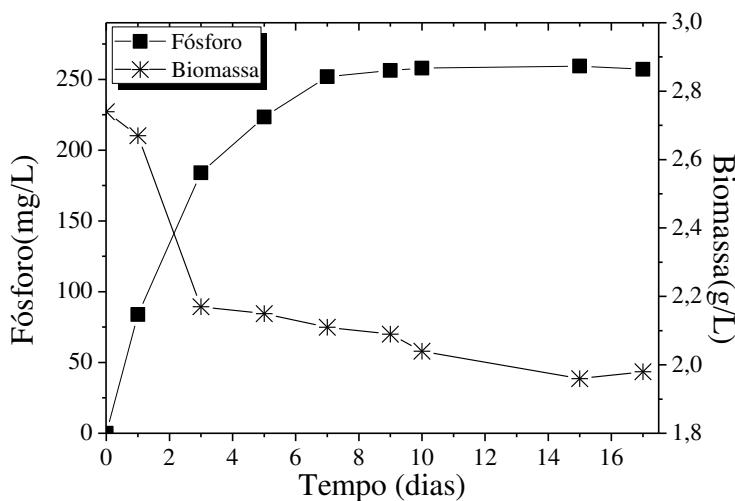
Figura 43 – Crescimento de *A. ferrooxidans* e fósforo solúvel no meio de cultivo T&K, com 3,5 g/L de rocha com 120 mM de Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (A) e com 60 mM de Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (B).

Verifica-se que o período para estabilização e máxima produção para as variáveis analisadas (concentração de fósforo solúvel e quantidade de biomassa), apresentam mesmo comportamento do teste feito utilizando rocha na concentração de 2 g/L e o processo estabilizou-se no mesmo período de sete dias. A solubilização de fosfato foi de 330 mg/L e 260 mg/L, eficiência de 42,4% e 33,4% para os testes realizados em meio contendo 120 mM e 60 mM de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$ , respectivamente.

Nos testes em meio contendo 5 g/L de rocha fosfática e 120 mM de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$ , a variação do pH para o processo apresentou comportamento semelhante aos testes realizados com concentração de rocha de 2 e 3,5 g/L com variação de 2,6 no primeiro dia, diminuindo gradativamente até 1,9 no décimo sétimo dia.



(A)



(B)

Figura 44 – Crescimento de *A.ferrooxidans* e fósforo solúvel no meio de cultivo T&K, com 5 g/L de rocha e 120 mM de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$  (A) meio com 60 mM de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$  (B).

Para os testes em meio contendo 5 g/L de rocha fosfática e 60 mM de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$ , a variação do pH foi de 2,7 a 1,9 do primeiro ao décimo sétimo dia. A solubilização de fosfato foi de 325 mg/L e 255 mg/L, eficiência de 41,7% e 32,7% para os testes realizados em meio contendo 120 mM e 60 mM de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$ , respectivamente.

Ao avaliar a capacidade de solubilização do microrganismo, verifica-se que em mesmas condições ocorreu maior eficiência para concentrações mais baixas de rocha fosfática. Comparando os testes feitos com variação do meio de cultivo T&K, nota-se que o meio de cultivo com 120 mM de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$  apresenta melhores resultados.

Xiao e colaboradores (2008), verificaram que o teor máximo de fósforo solúvel foi registrado quando adicionados 2,5 g/L de rocha fosfática no meio inoculado com *C. krissii* (108,9 mg/ L), seguido de *P. expansum* (105,0 mg/ L) e *M. ramosissimus* (100,1 mg/L). Observou-se também que à medida que a concentração de RF adicionada diminuiu de 2,5 para 1,0 g/L, ocorreu um ligeiro aumento na capacidade de solubilização de RF à medida que o teor de P solúvel aumentou. Porém, à medida que a concentração de RF adicionada aumentou de 2,5 para 4,0 g/L, ocorreu uma diminuição visível no teor de fósforo solúvel.

No teste utilizando bactéria *A. thiooxidans* em meio 9K com 10 g/L de rocha o pH ao longo do processo variou de 3 no instante inicial, aumentado gradativamente até 5,3 no décimo quarto dia. A concentração de ácidos produzida não foi quantificada, pois as acidófilas não produzem ácidos orgânicos. Verifica-se que a concentração de fósforo solúvel máxima e a quantidade de biomassa foram estabelecidas no décimo terceiro dia com solubilização de 144,5 mg/L de fósforo, eficiência de 9,3%. O pH aumentou, fato que não auxilia o processo, porém houve solubilização e uma possível explicação é ter ocorrido a complexação dos cátions que estão ligados ao P, ou pela liberação de prótons  $\text{H}^+$  a partir do processo de troca catiônica ou da cadeia respiratória.

A variação na concentração de rocha de 5 para 10 g/L, mostra que as bactérias alcançam maior eficiência para menores concentrações, mesmo comportamento apresentado por *A.ferrooxidans*. As eficiências atingidas foram de 19,1% e 9,3% para as mesmas condições e concentração de rocha de 5 e 10 g/L, respectivamente.

Bhatti e Yawar (2010) estudaram a solubilização de fósforo a partir de fosfato com bactérias acidófilas (*Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Acidithiobacillus thiooxidans*). A amostra de rocha de fosfato foi suplementada com lama de enxofre e a oxidação bacteriana do enxofre e do mineral de enxofre foi um sistema gerador de ácido. A dissolução de fósforo a partir de fosfato foi principalmente atribuída à concentração de ácido sulfúrico produzido

pelas bactérias no meio de lixiviação. *A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans* solubilizaram quantidades significativas de fósforo no processo de biolixiviação. A cultura mista destas bactérias solubilizaram quantidades mais elevadas de fósforo (70,2% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) com 10% de densidade da pasta durante 40 dias de lixiviação, em comparação com a cultura pura sozinha. A taxa de solubilização máxima de fósforo foi de 564,8 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/L.d e foi alcançado em solução de lixiviação inoculada com cultura mista. A dissolução de fósforo foi encontrada como fenômeno dependente do pH.

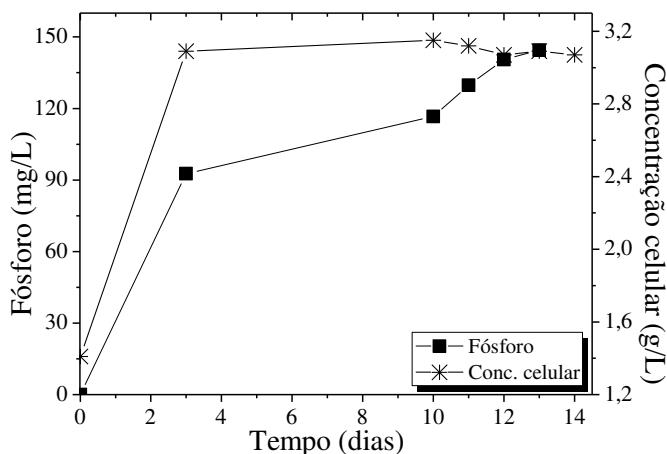


Figura 45 – Concentração de fósforo e concentração de biomassa para os testes utilizando *A.thiooxidans*, pH inicial do meio não foi ajustado, concentração de rocha 10 g/L.

#### 4.4.4 - Fermentação líquida com acréscimo de Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ao meio caldo nutritivo

Com o objetivo de avaliar o comportamento dos *bacillus* na presença de Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, onde o Fe<sup>3+</sup> é a fonte de energia para a bactéria. Testes foram realizado com bactérias *B.megaterium* e *P.fluorescens*, e a *A.ferrooxidans* separadamente, em meio caldo nutritivo com 5g/L de rocha fosfática e 33,3 g/L de FeSO<sub>4</sub> (120 mM), sem ajuste inicial do pH, para avaliação do comportamento e posterior associação das culturas.

Nas Figuras 46 a 48 (A), verifica-se o fósforo solúvel no processo de biolixiviação de rocha fosfática e o comportamento do crescimento celular. Nas Figuras 46 a 48 (B) analisa-se a concentração de ácidos produzidos.

Nos testes utilizando a bactéria *B.megaterium*, o pH ao longo do processo diminuiu gradativamente de 4,1 no instante inicial e finalizando o processo com pH 2,9 no sétimo dia.

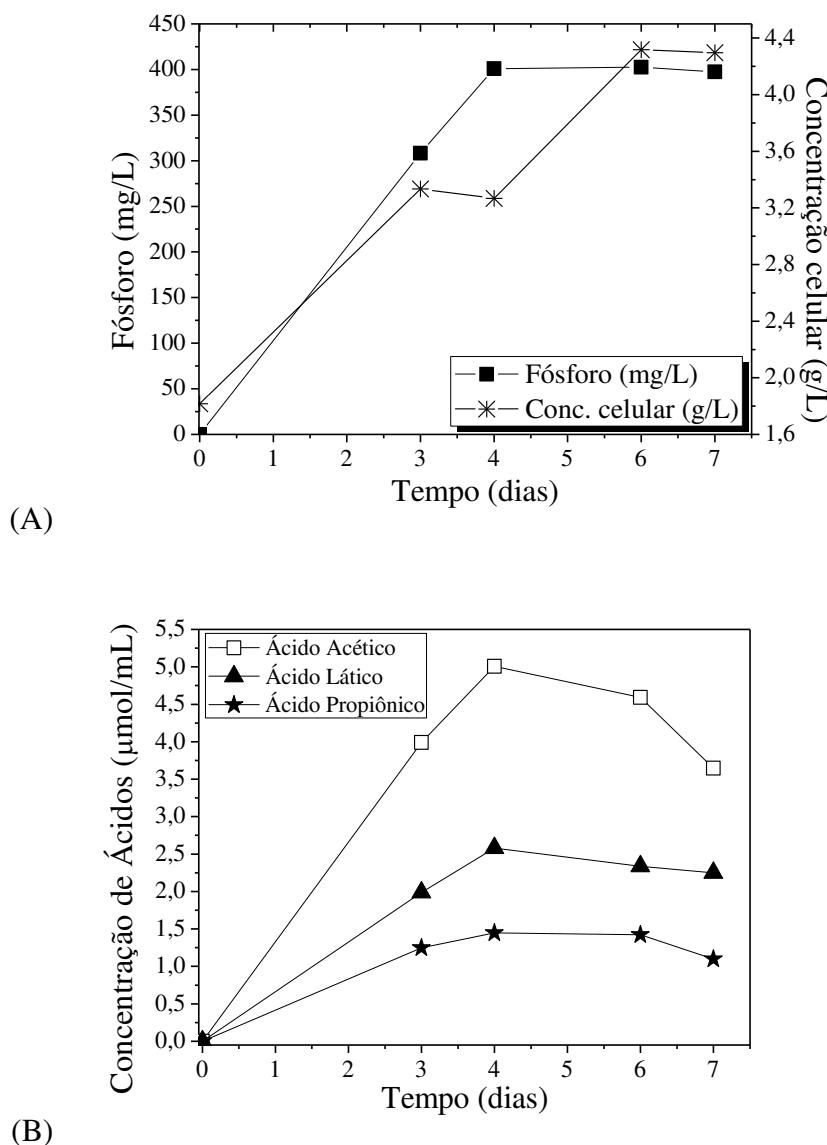


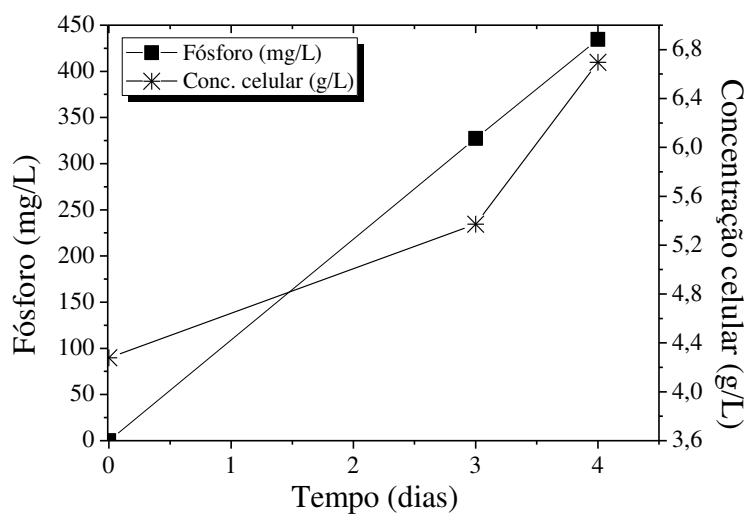
Figura 46 – Concentração de fósforo e concentração de biomassa (A) concentração de ácidos (B), para os testes utilizando *B.megaterium* crescendo em meio caldo nutritivo com 5 g/L de rocha fosfática e 33,3 g/L de FeSO<sub>4</sub>.

Foram identificados os ácidos acético, lático e propiônico, sendo a maior concentração de ácidos total igual a 9,0 μmol/mL no quarto dia. Para a concentração de fósforo solúvel e quantidade de biomassa, o máximo valor atingido foi no sétimo dia, 402,38 mg/L de fósforo (51,6%) e 4,3 g/L respectivamente. Em comparação com o teste feito em meio caldo nutritivo sem nenhuma modificação, observa o comportamento semelhante e eficiências praticamente iguais, sugerindo assim que a mudança no meio não influenciou na eficiência da bactéria.

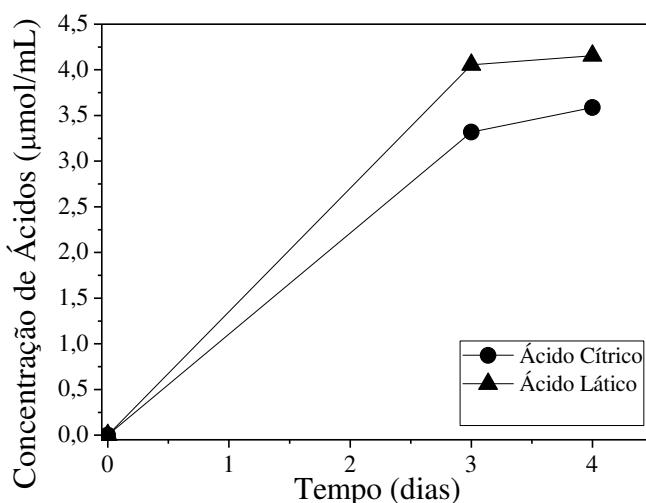
Bidondo e colaboradores (2012) estudaram a interação entre fungos e *Bacillus megaterium* em experimento em estufa projetado com milho como planta hospedeira com a

adição de fosfato de cálcio tribásico e concluíram que a inoculação com o *Bacillus megaterium* afetou positivamente a micorrização do milho. Os resultados fornecem evidências de que o efeito pode ser causado pela liberação de fósforo solubilizado na rizosfera pela bactéria *Bacillus megaterium*. Os resultados mostraram também que, para aplicações em potencial, algumas características das cepas são fundamentais na seleção das combinações.

Nos ensaios utilizando a bactéria *P. fluorescens*, o pH diminuiu gradativamente ao longo do processo, sendo igual a 3,9 inicialmente e igual a 2,5 no quarto dia.



(A)



(B)

Figura 47 – Concentração de fósforo e concentração celular para os testes utilizando *P. fluorescens* (A) e concentração de ácidos (B) em meio caldo nutritivo com 5 g/L de rocha fosfática e 33,3 g/L de FeSO<sub>4</sub>.

Observa-se a formação dos ácidos cítrico e lático, a concentração de tais ácidos aumentou gradativamente ao longo do processo com concentração total de 7,7  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  no quarto dia. A concentração de fósforo solúvel e a quantidade de biomassa também aumentaram ao longo do tempo. A solubilização foi de 430 mg/L de fósforo, atingindo uma eficiência 55,2% de solubilização. Comparando tal resultado, com os resultados obtidos utilizando caldo nutriente, tal condição mostrou ser mais promissora com aumento de 49% na eficiência, corroborando com os estudos de Hamdali e colaboradores (2010), que afirmam que a eficiência do processo de solubilização de rocha fosfática baseia-se em condições nutricionais e fisiológicas complexas e específicas dos microrganismos solubilizadores de fósforo.

Na fermentação utilizando a bactéria acidófila *A.ferrooxidans*, o pH manteve-se em  $2,6 \pm 0,2$ . A fermentação atingiu solubilização máxima de 280,0 mg/L de P com 35,9% de eficiência e manteve-se estável a partir do sexto dia. Em comparação ao teste realizado com *A.ferrooxidans* em meio T &K, verifica-se que a eficiência foi semelhante para os dois casos. Priha e colaboradores (2014) demonstraram que a biolixiviação do fósforo utilizando culturas bacterianas acidófilas é um fenômeno dependente do pH. Os rendimentos alcançados para biolixiviação de fósforo foram de até 97% em 21 dias para minério de fluorapatita com baixo teor, em soluções com um teor de sólidos de 1%. Com adaptação, enxofre elementar foi adicionado como fonte de energia, a mistura bacteriana foi aclimatada a suspensões com um teor de 10-30% de sólidos.

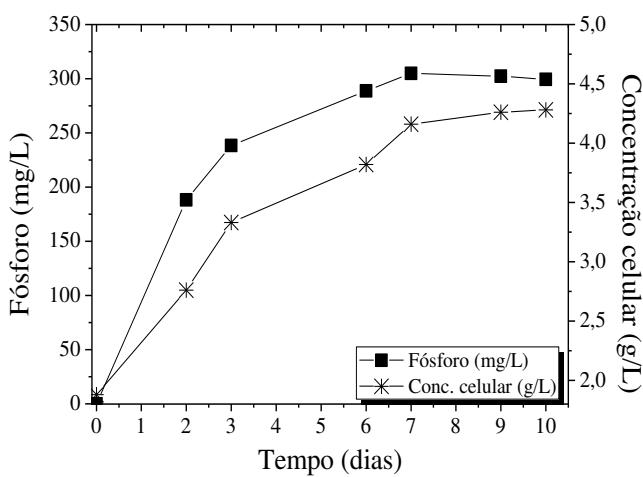


Figura 48 – Concentração de fósforo e concentração de biomassa para os testes utilizando *A.ferrooxidans*, em meio caldo nutriente com 5 g/L de rocha fosfática e 33,3 g/L de  $\text{FeSO}_4$ .

Foram avaliados também testes realizado com bactérias *B.megaterium* e *P.fluorescens*, e a acidófila *A.thiooxidans* separadamente, em meio caldo nutriente com 5g/L de rocha fosfática

e enriquecido com 10 g/L de S, condição necessária ao crescimento de *A.thiooxidans*, sem ajuste inicial do pH.

Nas Figuras 49 a 51 (A), avaliam-se o fósforo solúvel no processo de biolixiviação de rocha fosfática e o comportamento do crescimento celular, nas Figuras 49 a 51 (B), analisam-se a concentração de ácidos produzida.

No teste utilizando *B.megaterium*, o pH manteve-se praticamente constante ao longo do processo e igual a  $6,5 \pm 0,2$ . Verifica-se a formação dos ácidos acético, lático e propiônico, com maior concentração de ácido acético alcançado no terceiro dia, e concentração total de ácidos igual a 3,2  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ . A concentração de fósforo solúvel e a quantidade de biomassa tiveram o ápice e posterior estabilidade a partir do quarto dia. A solubilização foi de 151,8 mg/L de fósforo e eficiência de 19,5%. Comparativamente aos testes realizados com meio caldo nutriente e com meio caldo nutriente modificado acrescido de 33,3 g/L de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$ , esta condição apresentou resultados com 60% de decréscimo na eficiência. Nesse caso, as condições nutricionais e fisiológicas foram favoráveis para o microrganismo, porém, não favoreceram a formação de ácidos orgânicos.

Vale ressaltar também que para os diferentes testes utilizando *B.megaterium*, a maior solubilização de fósforo foi obtida para o teste com maior produção de ácido acético. Tal efeito corrobora com os estudos de Wu e colaboradores (2017), no qual descobriram que a amostra de rocha liberou mais  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  com uma redução significativa do valor de pH no caldo de fermentação. Em combinação com os resultados do HPLC, o ácido acético produzido pelo metabolismo bacteriano foi assim considerado como o componente efetivo da promoção da dissolução da rocha. Esta pesquisa também demonstrou que *Bacillus megatherium* libera elementos essenciais (fósforo e potássio) para o estabelecimento e crescimento de plantas a partir de rochas. Assim os resultados indicam que o *Bacillus megatherium* pode promover o intemperismo e aumentar os elementos nutritivos no meio ambiente, melhorando a formação do solo e o crescimento das plantas.

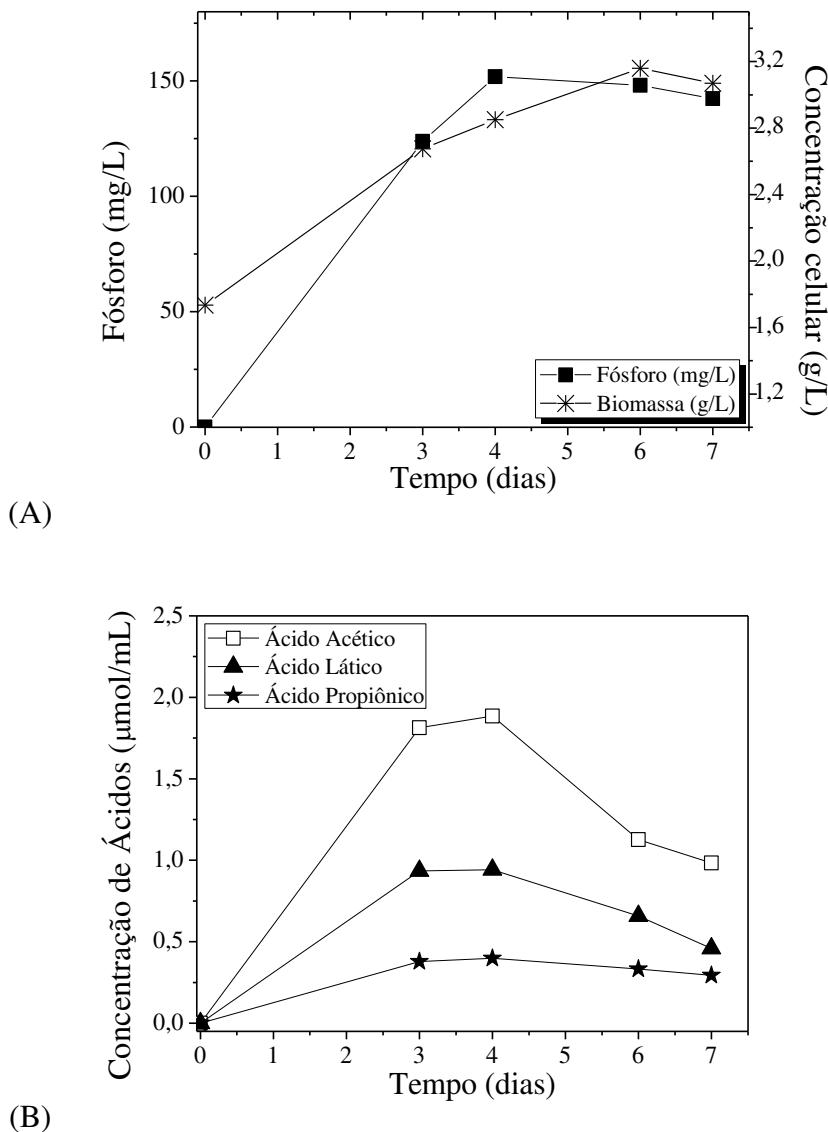


Figura 49 – Concentração de fósforo e concentração de biomassa (A) concentração de ácidos orgânicos (B), para os testes utilizando *B.megaterium*, em meio caldo nutritivo com 5 g/L de rocha fosfática e 10 g/L de S.

Na fermentação utilizando a bactéria *P.fluorescens*, em meio caldo nutritivo acrescido de 10 g/L de enxofre, o pH manteve-se constante ao longo do processo e igual a  $6,3 \pm 0,2$ . Analisando-se a concentração de ácidos produzida, foram identificados os ácidos cítrico e lático, com maior produção no quarto dia e concentração de ácidos total igual a  $3,3 \mu\text{mol}/\text{mL}$ . No quarto dia verifica-se a maior concentração de fósforo solúvel igual a 130 mg/L, 16,7 % de eficiência e quantidade de biomassa.

Comparativamente aos resultados obtidos para os testes realizados com meio caldo nutriente e meio caldo nutriente acrescido com 33,3 g/L de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$ , o resultado com meio caldo nutriente acrescido de 10 g/L de S apresentou os piores resultados, concordando com a menor produção de ácidos total e também com o pH menos ácido do processo.

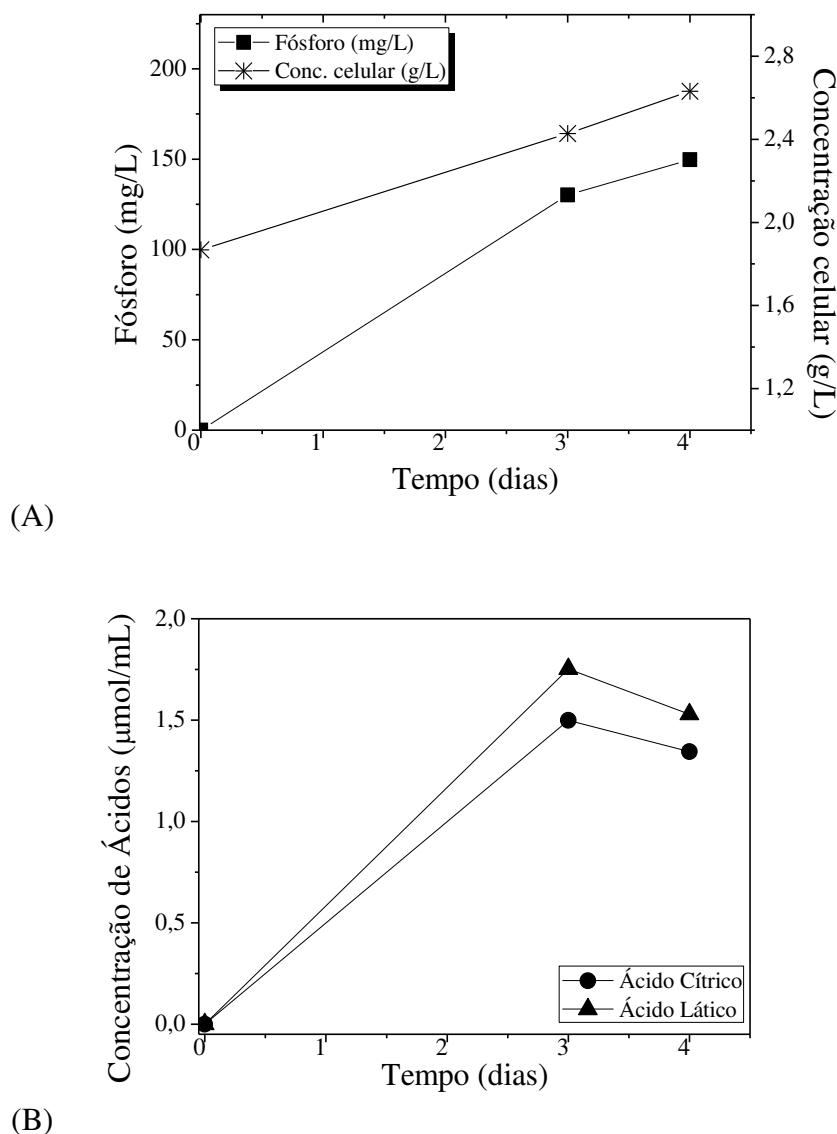


Figura 50 – Concentração de fósforo e concentração de biomassa (A) concentração de ácidos orgânicos (B), para os testes com *P. fluorescens*, crescendo em meio caldo nutriente com 10 g/L de S.

Tao e colaboradores (2008) estudaram os microrganismos capazes de solubilizar e mineralizar os conjuntos de fósforo (P) nos solos. Foram avaliadas as espécies de *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Burkholderia caryophylli*, *Pseudomonas cichorii* e *Pseudomonas syringae*. As capacidades de solubilização e remoção de fósforo das

bactérias foram medidas e apresentaram habilidades inorgânicas de solubilização em fósforo variando entre 8,2 a 62,8 µg de fósforo / mL. Uma correlação linear foi encontrado entre pH da cultura e fósforo solubilizado.

No processo utilizando a bactéria acidófila *A.thiooxidans*, o pH aumentou gradativamente de 4,7 para 8,7 ao longo do processo e verifica-se proporcionalidade entre a quantidade de biomassa e a concentração de fósforo solúvel. A eficiência máxima do processo foi alcançada no sétimo dia, com a solubilização de 274,2 mg/L de fósforo, equivalente a 35,2% de eficiência a partir do qual permaneceu praticamente constante. Em comparação com o teste realizado em meio 9K, o teste apresentou eficiência superior em 54,2%.

Aria e colaboradores (2010) conduziram estudos para avaliar a melhor combinação para inoculação utilizando vermicomposto. *Acidithiobacillus thiooxidans* e enxofre, para solubilização de fosfato de rocha da província. Os resultados revelaram que, a maior concentração de sulfato e o pH mais baixo foram obtidos em tratamentos com 20% de enxofre, 15% de vermicomposto.

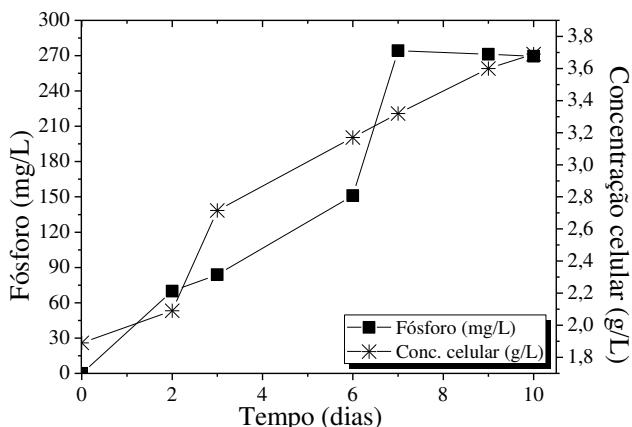


Figura 51 – Concentração de fósforo e concentração de biomassa para os testes utilizando *A.thiooxidans*, crescendo em meio caldo nutritivo com 10 g/L de S.

Segundo Rathi e colaboradores (2015), o primeiro passo para o desenvolvimento de consórcios compatíveis de bactérias benéficas com o objetivo de aplicação em plantas de cultivo seria estudar sua compatibilidade em experiências de cultivo e inoculação de plantas de laboratório. A compatibilidade cultural é muitas vezes medida pela capacidade das bactérias de co-agregar com a bactéria parceira com a qual eles são misturados. Assim, após

os testes com os microrganismos isolados, foram avaliados testes com os microrganismos em associação.

#### **4.4.5 - Fermentação líquida com associação das bactérias**

A fim de avaliar o comportamento da associação das bactérias com as acidófilas, teste em reatores cônicos de bancada, utilizando a associação *B.megaterium* + *A.ferrooxidans* e *P.fluorescens* + *A.ferrooxidans*, em meio líquido caldo nutritivo contendo 5g/L de rocha, sem ajuste inicial de pH, acrescido de 33,3g/L de Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foram realizados.

Nas Figuras 52 e 53 (A), analisam-se o fósforo solúvel no processo de biolixiviação de rocha fosfática e o comportamento do crescimento celular, em meio caldo nutritivo acrescido de 33,3 g/L de Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e nas Figuras 52 e 53 (B), verificam-se a formação dos ácidos.

Para a associação da *B.megaterium* e *A. ferrooxidans*, o pH manteve-se praticamente constante  $3,05 \pm 0,2$  ao longo do processo. Ácidos acético, lático e propiônico foram formados ao longo da fermentação, com a maior concentração foi de ácido acético no sétimo dia e a concentração total de ácidos de 4,9  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ . Foram solubilizados 383,35 mg/L de fósforo (49,2% de eficiência) no intervalo de tempo igual a 14 dias. Em comparação aos testes realizados com as bactérias isoladamente obteve-se resultados com taxa de eficiência equivalente, porém o tempo do processo passou de 5 para 7 dias, não se mostrando vantajoso.

Xiao e colaboradores (2011b) avaliaram a biosolubilização de fósforo a partir de fosfato de rocha (RF) por uma bactéria moderadamente termofílica, *Acidithiobacillus caldus* e uma bactéria mesofílica, *Acidithiobacillus thiooxidans*. A capacidade de solubilização de fosfato de *A. caldus* foi mais eficaz do que *A. thiooxidans* quando realizada a pH 2,5, 160 rpm, 45° C e 30° C para o termófilo moderado e o mesófilo, respectivamente. Além disso, a taxa de solubilização de fósforo de RF por *A. caldus* foi influenciada marcadamente pelo pH inicial, temperatura, concentração de RF e dosagem de adição de S .

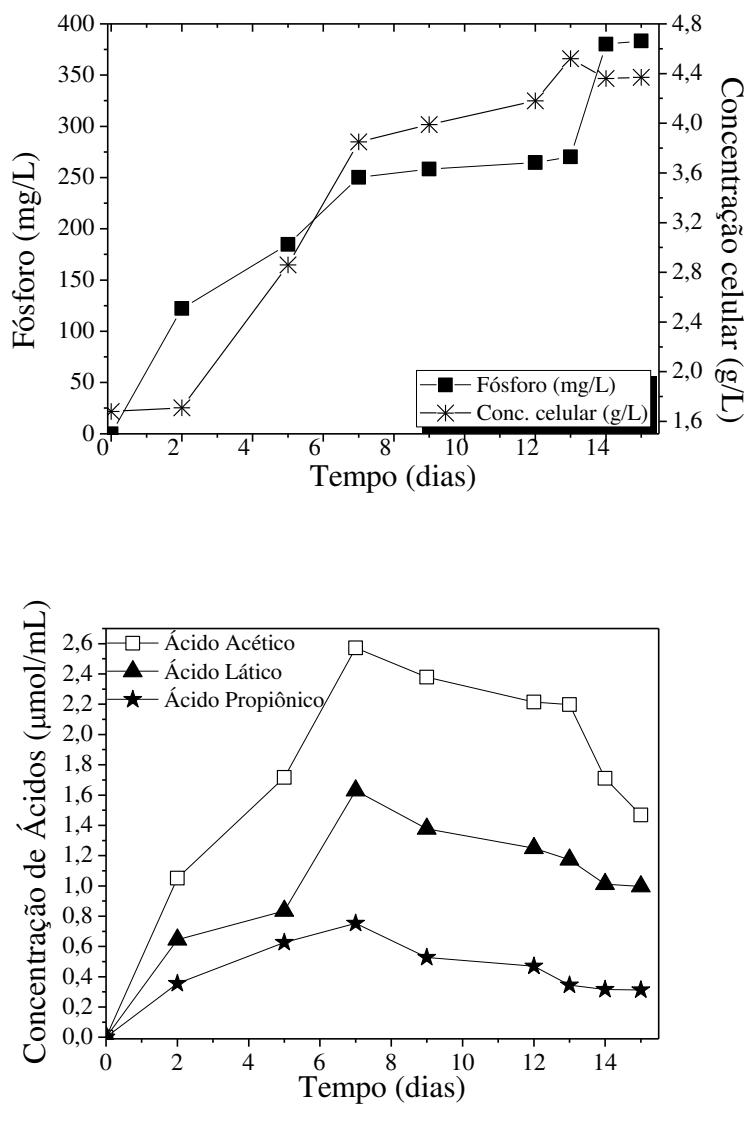


Figura 52 – Concentração de fósforo e concentração de biomassa (A) concentração de ácidos orgânicos (B) para os testes utilizando *B.megaterium* + *A.ferrooxidans* em meio caldo nutritivo com 5 g/L de rocha fosfática acrescido de 33,3 g/L de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$ .

Nos testes utilizando a associação de *A.ferrooxidans* e *P.fluorescens*, o pH manteve-se praticamente constante  $3,3 \pm 0,3$  ao longo do processo. Observa-se a formação dos ácidos cítrico e lático ao longo da fermentação, com concentração de ácidos total de  $4,012 \mu\text{mol}/\text{mL}$  no sexto dia, mesmo período que a solubilização do fósforo foi máxima. A partir deste período a concentração de ácidos total diminuiu gradativamente e a concentração de fósforo solúvel permaneceu constante na faixa de  $245 \text{ mg/L}$ , eficiência de  $31,44\%$ , ou seja, os ácidos orgânicos não foram mais suficientes para contribuir com a solubilização de fosfato, fato que pode ser observado também devido a constância do pH.

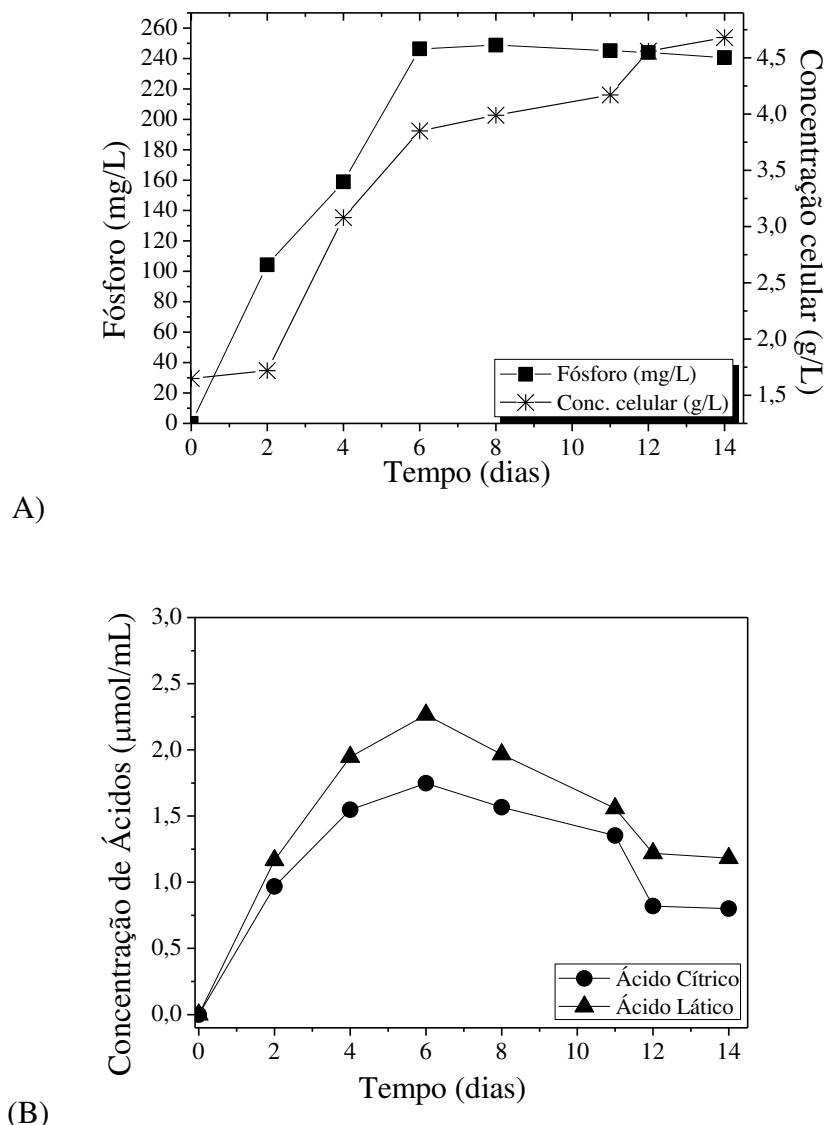


Figura 53 – Concentração de fósforo e concentração de biomassa (A) concentração de ácidos orgânicos (B) para os testes utilizando *P. fluorescens* + *A. ferrooxidans* em meio caldo nutritivo com 5 g/L de rocha fosfática acrescido de 33,3 g/L de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$ .

Chen e colaboradores (2006) realizaram o isolamento, rastreio e caracterização de 36 estirpes de bactérias solubilizantes de fosfato. As atividades de solubilização de fosfato mineral de todos os isolados foram testadas em meio de fosfato tricálcico, analisando o teor de P solúvel após 72 h de incubação a 30° C. Os isolados pertenciam ao gênero *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Serratia* e um para os *Chryseobacterium*, *Delfia*, *Gordonia* e *Phyllobacterium*. A atividade solubilizante de P destas estirpes foi associada com a liberação de ácidos orgânicos e queda no pH do meio. A análise por HPLC detectou oito tipos diferentes de ácidos orgânicos, nomeadamente: ácido cítrico, ácido glucônico, ácido lático,

ácido succínico, ácido propiônico, e três ácidos orgânicos desconhecidos das culturas desses isolados. Uma relação inversa entre pH e fósforo solubilizado foi evidente neste estudo.

As associações *B.megaterium* + *A.ferrooxidans* e *P.fluorescens* + *A.ferrooxidans* não apresentaram resultados melhores em relação as culturas puras, logo parece ter ocorrido um processo de inibição ou as condições nutricionais e fisiológicas complexas e específicas de cada microrganismo solubilizador não foi atendida.

Foram realizados também testes com a associação das bactérias com a acidófila *A.thiooxidans*, com o intuito de avaliar o comportamento dessa associação em meio líquido caldo nutritivo contendo 5g/L de rocha, sem ajuste inicial de pH, acrescido de 10 g/L de S.

Nas Figuras 54 e 55 (A), avalia-se o fósforo solúvel no processo de biolixiviação de rocha fosfática e o comportamento do crescimento celular, nas Figuras 54 e 55 (B) tem-se a formação dos ácidos.

Para a associação de *A.thiooxidans* com *B.megaterium*, o pH manteve-se na faixa de  $3,0 \pm 0,3$  ao longo do processo. Verificou-se a formação dos ácidos acético, lático e propiônico e a concentração de ácidos total foi de 8,564 µmol/mL no sexto dia. A partir do sexto dia a solubilização do fósforo aumenta, alcançando 450 mg/L, eficiência de 57,75% e o processo se torna estável.

Comparativamente com os testes realizados com as culturas isoladas em meio caldo nutritivo modificado acrescido de S, a associação apresentou resultados superiores a 30% em relação a soma do resultado de cada um isoladamente, com maior produção de ácidos. Porém, ao comparar com o teste feito com *B.megaterium* isoladamente em caldo nutritivo sem nenhuma modificação o resultado é equivalente, ou seja, não apresenta melhora. Conclui-se portanto, que o meio caldo nutritivo oferece as melhores condições nutricionais para o desenvolvimento e produção de ácidos para *B.megaterium*.

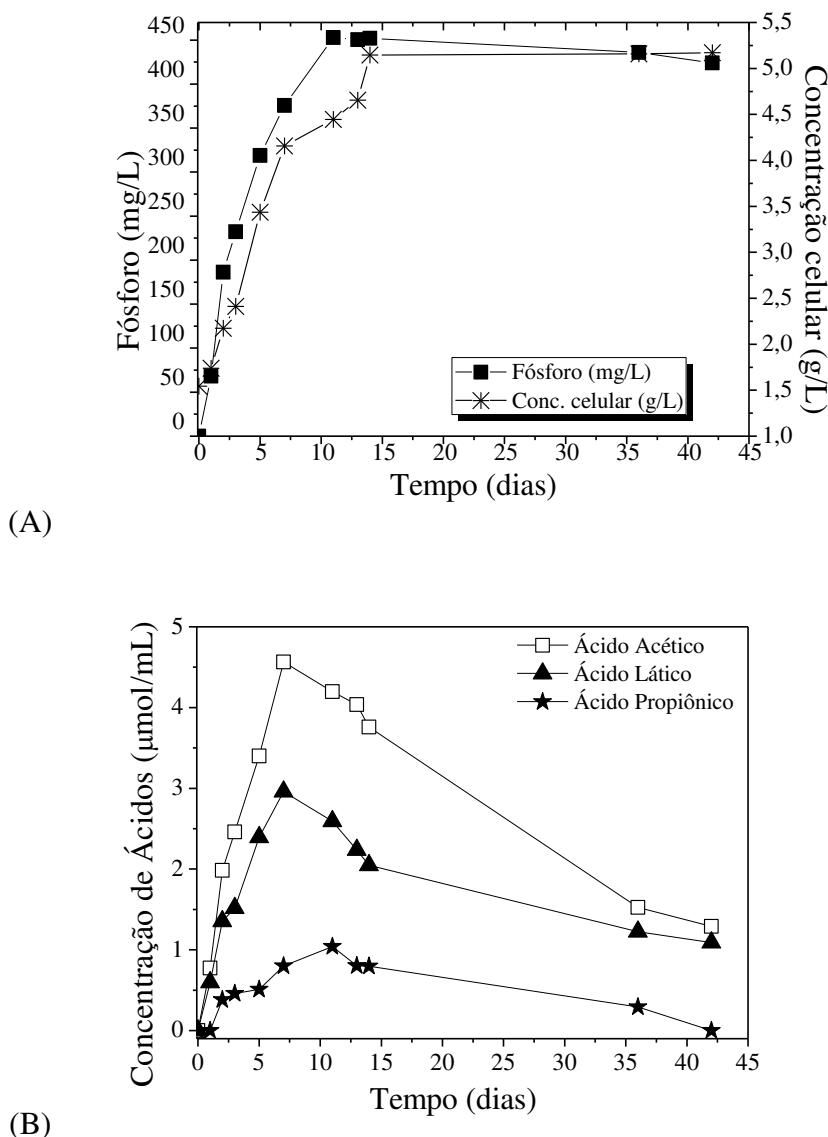
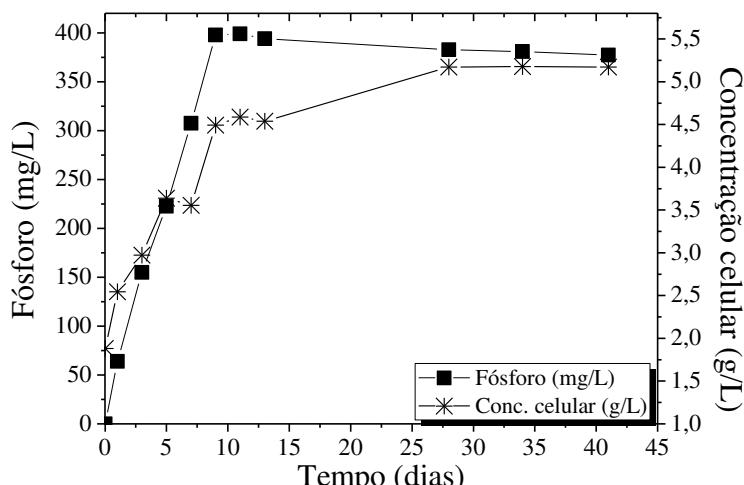


Figura 54 – Concentração de fósforo e concentração de biomassa (A) concentração de ácidos orgânicos (B) para os testes utilizando *B.megaterium* + *A.thiooxidans* em meio caldo nutritivo, acrescido de 10 g/L de S.

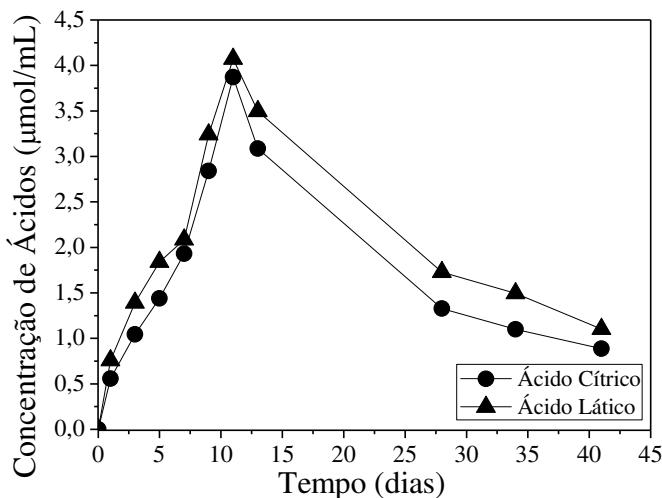
Na fermentação utilizando a associação de *A.thiooxidans* com *P.fluorescens*, o pH permaneceu em  $3,5 \pm 0,32$  ao longo do processo. Observa-se a formação dos ácidos cítrico e lático, totalizando 7,942 μmol/mL a solubilização máxima de fósforo de 400 mg/L, ou seja, obteve-se 51,33% de eficiência no décimo dia, mesmo período em que a concentração de ácidos atingiu o máximo.

A associação de *A.thiooxidans* com *P.fluorescens* apresentou eficiência de 51,33%, para a associação e para a cultura isolada de *P.fluorescens* a eficiência foi de 16,29% nos testes realizados em meio caldo nutritivo acrescido com S. Já para o teste sem modificação do meio

caldo nutriente a eficiência foi de 27,85%. Portanto observa-se uma melhora nos resultados ao trabalhar com a associação dessas culturas.



(A)



(B)

Figura 55 – Concentração de fósforo e concentração de biomassa (A) concentração de ácidos (B) para os testes utilizando *P.fluorescens* + *A.thiooxidans* em meio caldo nutriente com 5 g/L de rocha fosfática, acrescido de 10 g/L de S.

Tal efeito, segundo Xiao; Chi; Fang (2013) pode ser explicado pelo fato de que as bactérias acidófilas autotróficas podem obter energia para o crescimento por oxidação de Fe (II) e / ou formas reduzidas de enxofre. Contudo, a sua atividade oxidante é sempre reprimida em diferentes graus pela produção de compostos orgânicos no caldo. É interessante notar que algumas bactérias acidófilas heterotróficas são capazes de metabolizar compostos orgânicos como fonte de energia e desintoxicar o ambiente de crescimento para bactérias acidófilas

autotróficas, formando assim um mutualismo com bactérias acidófilas autotróficas no processo de biolixiviação mineral.

Analizando os dados obtidos para as associações entre bactérias e acidófilas, tem-se que a associação da *B.megaterium* + *A.thiooxidans* foi a que apresentou melhores resultados. Diante disto foram realizados testes para o aumento da eficiência com a utilização de uma nova configuração de reator.

#### **4.4.6 - Fermentação líquida em reator do tipo *air lift***

Foram avaliados bactérias puras e em associação. Testes em fermentação em meio líquido caldo nutritivo, sem ajuste inicial do pH, acrescido de 10 g/L de S, com aeração de 350 cm<sup>3</sup>/min, foram realizados e testadas para as bactérias *B.megaterium* e a associação *B.megaterium* + *A.thiooxidans*.

Nas Figuras 56 a 59 (A), avalia-se o fósforo solúvel no processo de biolixiviação de rocha fosfática e o comportamento do crescimento celular, nas Figuras 56 a 59 (B) verifica-se a formação dos ácidos.

Para o teste utilizando a bactéria *B.megaterium*, a variação do pH foi de 3,1 no primeiro dia a 4,4 no vigésimo dia do processo. Verificou a formação dos ácidos acético, lático e propiônico, a concentração destes ácidos aumentou gradativamente até o sexto dia. A concentração máxima de ácidos total foi de 4,9 µmol/mL, permanecendo constante até o décimo dia e diminuiu gradativamente até o vigésimo dia. A concentração de fósforo solúvel e a quantidade de biomassa atingiram o máximo no décimo segundo dia com pouca variação até o vigésimo dia, com eficiência de 48,4% e solubilização de 377,15 mg/L de fósforo. Comparando os resultados obtidos nos testes em reator *air lift*, com os testes realizados em reator cônico de bancada, tem-se que o reator *air lift* apresenta um aumento na eficiência do processo. A maior eficiência pode ser explicada, pela maior produção de ácidos, favorecido pela aeração, já que os *Bacillus megaterium* são microrganismos aeróbios.

O mecanismo de complexação de cátions pode ser importante na solubilização de fósforo, nos casos em que a estrutura do ácido orgânico é complexa, essa complexação depende do pH (WHITELAW; HARDEN; HELYAR, 1999)

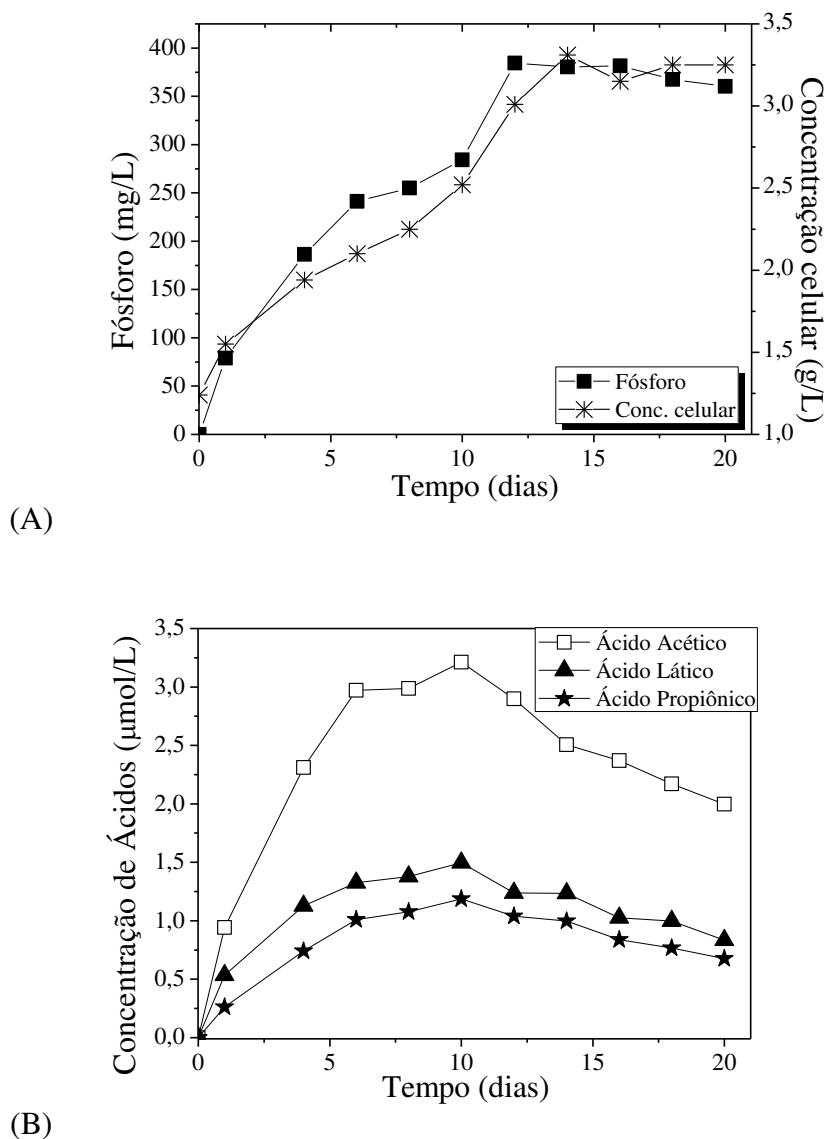


Figura 56 – Concentração de fósforo e concentração de biomassa (A) concentração de ácidos (B), para os testes em reator do tipo *air lift* utilizando *B.megaterium* em meio caldo nutritivo com 5 g/L de rocha fosfática, acrescido de 10 g/L de S, pH inicial do meio não foi ajustado.

Utilizando a associação da bactéria acidófila *A.thiooxidans* com *B.megaterium*, a variação do pH foi de 3,2 no primeiro dia aumentando gradativamente até 5,4 no vigésimo primeiro dia do processo. Avaliou-se a formação dos ácidos acético, lático e propiônico, totalilizando 7,3  $\mu\text{mol/mL}$ , a solubilização máxima de fósforo foi de 402 mg/L, eficiência de 51,6% atingida no décimo segundo dia.

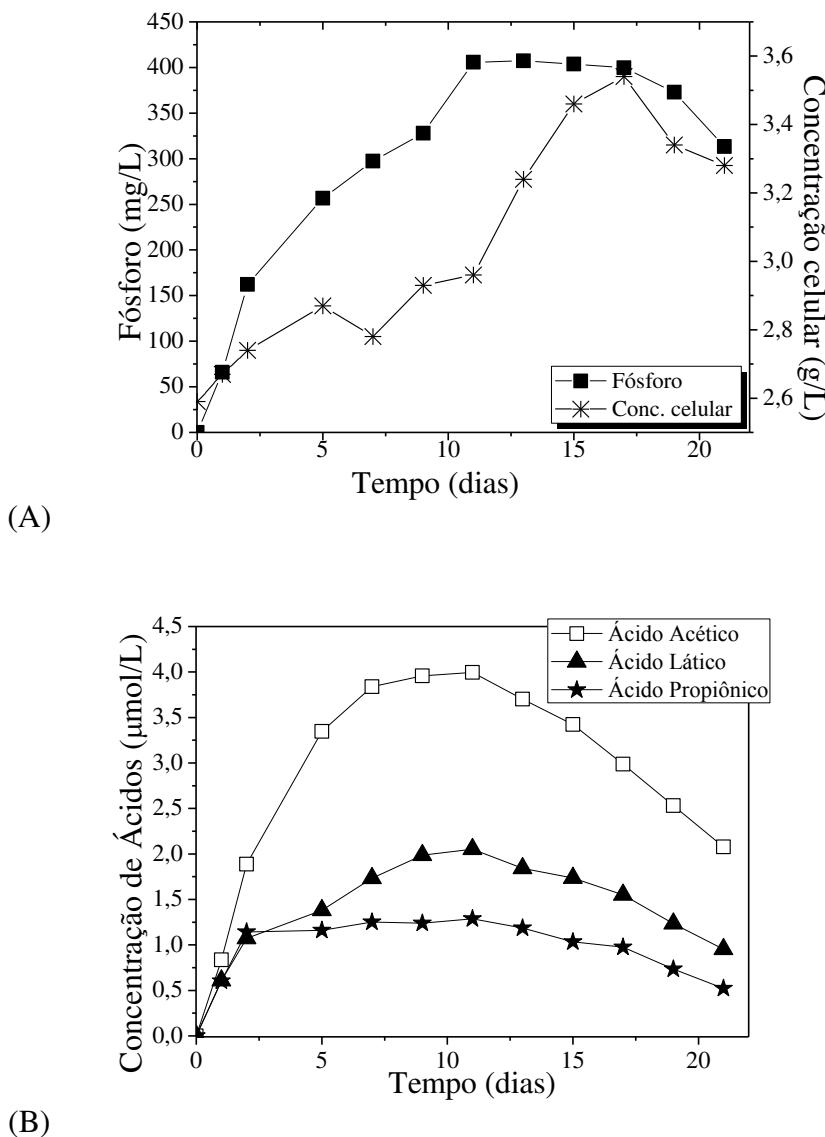


Figura 57 – Concentração de fósforo e concentração de biomassa (A) concentração de ácidos (B), para os testes em reator do tipo *air lift* utilizando a associação *B.megaterium* + *A.thiooxidans* em meio caldo nutritivo com 5 g/L de rocha fosfática acrescido de 10 g/L de S, pH inicial do meio não foi ajustado.

Para os testes feitos em associação de *B.megaterium* com *A.thiooxidans* o reator *air lift*, apresentou piores resultados em relação aos testes feitos em reatores cônicos de bancada. Fato esse que pode ser explicado pela maior produção de ácidos nos reatores cônicos de bancada, justificando assim o pH ficar sempre na faixa ácida, ao contrário do reator *air lift* que permaneceu na faixa neutra e básica.

Fang e Zhou (2007) desenvolveram um estudo com o objetivo de aumentar as eficiências de biolixiviação de Cr através da introdução de microrganismos heterotróficos para

degradação de matéria orgânica. Para realização do estudo utilizaram uma associação de *Brettanomyces* B65 e *A. thiooxidans* TS6 realizada em reator *air lift*. Obtiveram redução de pH das lamas e aumento do potencial de oxi-redução resultando em solubilização de Cr aumentada. O teste utilizando a associação obteve melhora ao se comparar os 5 dias necessários para solubilização máxima de Cr (processo de biolixiviação única sem inoculação de *Brettanomyces* B65). O período de biodegradação foi significativamente reduzido a 3 dias para o sistema combinado de biolixiviação. Além disso, pouco nitrogênio e fósforo foram perdidos e o conteúdo de Cr ficou abaixo dos níveis permitidos para a aplicação da terra após 3 dias de tratamento de biolixiviação.

Visto que a associação de *Bacillus* com a acidófila não se mostrou promissora no reator *air lift*, realizou-se então o processo com fermentação líquida em mesmo reator, utilizando meio líquido (SAMPAIO et al., 2003), sem ajuste inicial do pH, contendo rocha na concentração de 5 g/L e aeração de 350 cm<sup>3</sup>/min. Foram testadas as bactérias *B.subtilis* e a associação *B.megaterium* + *B.subtilis*+ *B.licheniformis*

No teste utilizando a bactéria *B.subtilis*, a variação do pH foi de 3,1 no primeiro dia aumentando gradativamente até 4,5 no vigésimo quinto dia do processo. Ocorreu a formação dos ácidos acético, lático e propiônico, com concentração de ácidos total igual a 8,8 µmol/mL. O processo solubiliza 329,0 mg/L de fósforo e eficiência de 42,2% no décimo segundo dia e a quantidade de biomassa também torna-se estável nesse período.

Comparando com os testes feito utilizando meio líquido (Item 3.2.1.2), os testes em reatores do tipo *air lift* apresentaram solubilização de fósforo equivalentes, ou seja, mesmo o microrganismo sendo aeróbico, a aeração não contribuiu para melhorias no processo. Outro ponto a ser analisado está relacionado com o tempo de processo, o teste feito em reator cônico de bancada atingiu o máximo em 6 dias, já no reator *air lift* o período foi de dez dias. A maior quantidade de microrganismos e a maior produção de ácidos na fermentação utilizando o reator *air lift* não contribuiu para melhorias no processo. A circulação do meio favorecendo uma maior homogeneização também não foi suficiente para gerar maior eficiência no processo. Assim verifica-se que o reator *air lift* não se mostrou vantajoso para o processo utilizando *B.subtilis* isoladamente.

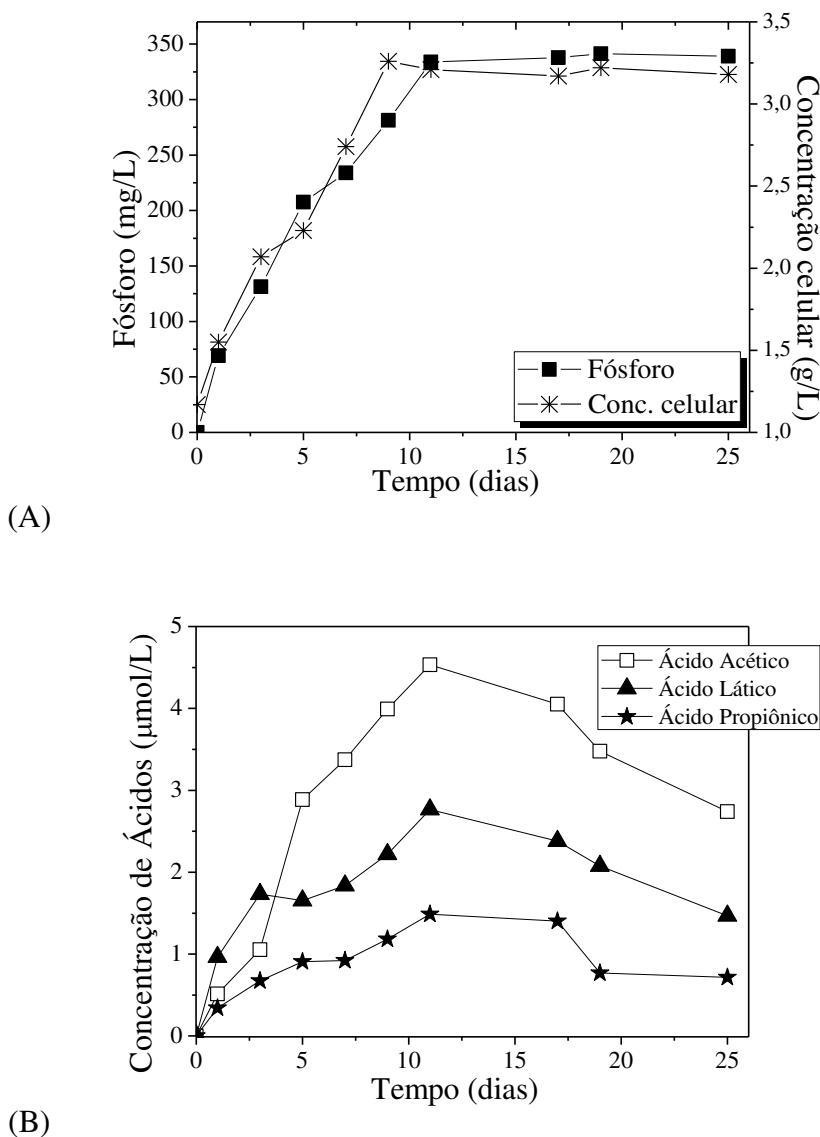


Figura 58 – Concentração de fósforo e concentração de biomassa (A) concentração de ácidos (B), para os testes em reator do tipo *air lift* utilizando *B. subtilis* em meio líquido, contendo rocha em concentração de 5 g/L, sem ajuste inicial do pH.

No ensaio utilizando a associação de bactérias *B. megaterium* + *B. subtilis* + *B. licheniformis*, a variação do pH foi de 3,3 no primeiro dia aumentando gradativamente até 4,7 no vigésimo quinto dia do processo. O comportamento para o teste empregando a associação, foi semelhante ao observado para a cultura de *B. subtilis* isolada. Observou-se a formação dos ácidos cítrico, lático e propiônico, com concentração total de ácidos de 10,3  $\mu\text{mol/mL}$  no nono dia.

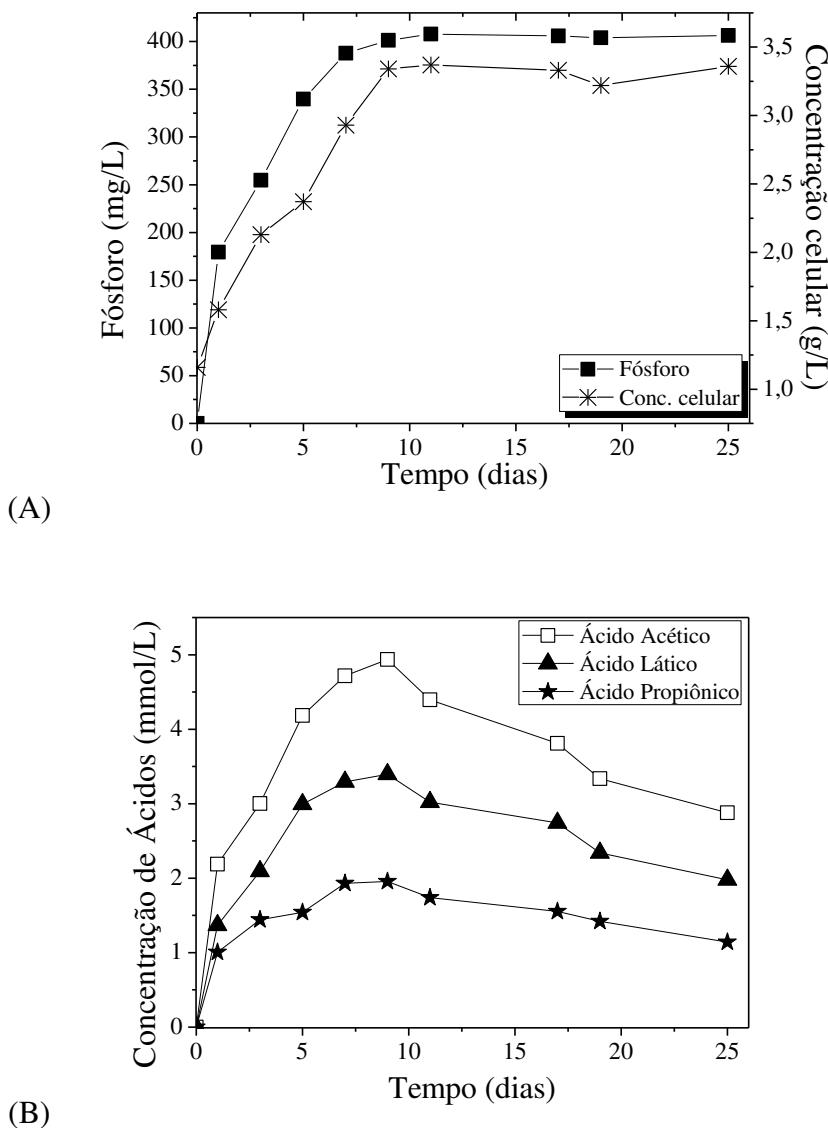


Figura 59 – Concentração de fósforo e concentração de biomassa para os testes em reator do tipo *air lift* utilizando *B.megaterium+B.subtilis+B.licheniformis*.

A associação utilizando reator do tipo *air lift* obteve eficiência máxima no décimo dia e igual a 407,9 mg/L de fósforo, representando uma melhoria de 18% em relação a cultura pura *B.subtilis* em reator *air lift* e eficiência inferior em 18,8% quando comparado a associação das culturas feito em reator do tipo cônico de bancada.

Assim foi possível verificar que o reator do tipo *air lift* não se mostrou vantajoso para os processos realizados com *Bacillus* e suas associações, já para os processos contendo acidófilas apresenta melhorias ao longo do processo.

---

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSÕES

---

- Os fungos do gênero *Trichoderma* mostraram-se promissores no processo de solubilização do fósforo a partir da rocha fosfática, sendo o tempo de incubação variável entre 3 e 6 dias para o processo em fermentação submersa.

- Dentre as espécies de *Trichoderma* avaliadas, nas condições testadas, todas apresentaram comportamento semelhante em relação às variáveis analisadas (pH, produção de ácidos, fósforo solúvel e quantidade de biomassa), sendo que a associação (co-cultura), mostrou-se mais eficiente.

- Verificou-se que a produção de ácidos, assim como o pH do meio são parâmetros de fundamental importância para o processo de solubilização de fósforo independente do MSF utilizado.

- A composição do meio e as condições de crescimento do microrganismo são variáveis significativas, uma vez que foi verificada uma relação direta entre a quantidade de biomassa e a concentração de fósforo solúvel.

- Os processos realizados em fermentação sólida utilizando fungos apresentaram melhores resultados, quando desenvolvidos em reatores do tipo tambor rotativo com umidade inicial de 55% em média.

- A configuração de reatores do tipo tambor rotativo apresentou maior eficiência para solubilização de fósforo em relação aos reatores do tipo cônico de bancada e a velocidade de rotação não foi um parâmetro relevante para o processo.

- A maior eficiência dos reatores do tipo tambor rotativo também pode ser observada pela diferença no tempo de fermentação. Nos reatores de bancada o tempo variou entre 6 e 12 dias, já para os reatores do tipo tambor rotativo a solubilização de fósforo estabiliza-se entre 8 e 10 de dias de fermentação.

- As bactérias do gênero *Bacillus* (*B.megaterium*, *B.subtilis* e *B.licheniformis*) apresentaram mesmo potencial solubilizador para rocha fosfática, quando testadas isoladamente.

- Quando analisado o desempenho das *Acidithiobacillus*, a *A.ferrooxidans* apresentou melhores resultados comparados a *A.thiooxidans*, porém ambas obtiveram menor potencial de solubilização em relação as bactérias do gênero *Bacillus* testadas.

- Para os testes realizados com as bactérias como microrganismos solubilizadores de fosfato, verifica-se mais uma vez a relevância do pH no meio.
- A composição do meio de crescimento para a bactéria, assim como a composição do meio para solubilização é importante para o processo.
- A concentração de rocha utilizada no processo de solubilização é uma variável de grande interesse, sendo que quanto menor a concentração de rocha, maior a eficiência do processo.
- Para os testes realizados com bactérias, a configuração realizada com reatores do tipo reator cônico de bancada foram mais eficientes que a configuração utilizando reatores do tipo *air lift*.
- As bactérias apresentaram melhores resultados do que os fungos testados ao longo deste trabalho. O melhor resultado foi obtido para *A. ferrooxidans* com 88% de solubilização do fósforo para teste contendo 2 g/L de rocha. Para os testes em concentração de rocha igual a 5 g/L a máxima eficiência foi obtida para o teste realizado utilizando associação em reator do tipo tambor rotativo com umidade inicial de 55%, alcançando eficiência de 49,64%. Avaliando-se os resultados obtidos para as bactérias tem-se que, *B. megaterium* e *B. subtilis* apresentaram desempenho semelhante sendo melhor para o teste realizado com meio caldo nutritivo o qual retirou-se o fosfato de potássio dibásico apresentando eficiência de 54,5%.

---

## **SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

---

- Estudar novas configurações de reatores para se trabalhar com bactérias.
- Testar novas associações microbianas para solubilização de fluorapatita.
- Avaliar melhor o fungo *Penicillium oxalicum*
- Estudar a produção da enzima fosfatase pelos microrganismos estudados (fungos e bactérias), no processo de biossolubilização de fósforo.
- Avaliar o emprego de diferentes biomassas para utilização nos processos de fermentação em meio sólido.
- Avaliar o uso de culturas em anaerobiose.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ABHILASH, B. D. Microbial processing of apatite rich low grade Indian uranium ore in bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 619–623, 2013.
- ACEVEDO, E.; GALINDO-CASTAÑEDA, T.; PRADA, F.; NAVIA, M.; ROMERO, H.M. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Colombia. **Applied Soil Ecology**, v. 80, p. 26–33, 2014.
- AMARAL, A.J.R. IN: SCHOBENHAUS, C.; QUEIROZ, E.T.; COELHO, C. E. S. **Geologia do fosfato. Principais depósitos minerais do Brasil.** In: Brasilia: DNPM/CPRM. p. 634.
- ARIA, M. M.; LAKZIAN, A.; HAGHNIA, G.H.; BERENJI, A.R.; BESHARATI, H.; FOTOVAT, A. Effect of *Thiobacillus*, sulfur, and vermicompost on the water-soluble phosphorus of hard rock phosphate. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 2, p. 551–554, jan. 2010.
- ARSHADI, M.; MOUSAVI, S. M.; RASOULNIA, P. Enhancement of simultaneous gold and copper recovery from discarded mobile phone PCBs using *Bacillus megaterium*: RSM based optimization of effective factors and evaluation of their interactions. **Waste Management**, v. 57, p. 158–167, nov. 2016.
- AVDALOVIĆ, J.; BEŠKOSKI, V.; GOJGIĆ-CVIJOVIĆ, G.; MATTINEN, M.L.; STOJANOVIĆ, M.; ZILDŽOVIĆ, S.; VRVIĆ, M. M. Microbial solubilization of phosphorus from phosphate rock by iron-oxidizing *Acidithiobacillus* sp. B2. **Minerals Engineering**, v. 72, p. 17–22, 2015.
- BABANA, A. H.; KASSOGUÉ, A.; DICKO, A.H.; MAÎGA, K.; SAMAKÉ, F.; TRAORÉ, D.; FANÉ, R.; FARADJI, F.A. Development of a Biological Phosphate Fertilizer to Improve Wheat (*Triticum Aestivum L.*) Production in Mali. **Procedia Engineering**, v. 138, p. 319–324, 2016.
- BARBOSA, O. C. A. B. R.; BRAUN, O.P.G.; DYER, R.C.; CUNHA, C.A.B.R **Geologia da região do triângulo mineiro. Rio de Janeiro: DNPM/DFPM**, 1970.
- BAZIRAMAKENGA, R.; SIMARD, R. R.; LEROUX, G. D. Determination of organic acids in soil extracts by ion chromatography. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, n. 3, p. 349–356, 1995.
- BEAR, F. E. **Chemistry of the Soil.** Van Nostrand Reinhold Inc., U.S.; Internacional student edition, 1964.
- 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**, v. 3, n. 2, p. 97–110, 2014.

- BHATTI, T. M.; YAWAR, W. Bacterial solubilization of phosphorus from phosphate rock containing sulfur-mud. **Hydrometallurgy**, v. 103, n. 1–4, p. 54–59, jun. 2010.
- BIDONDO, L. F.; BOMPADRE, J.; PERGOLA, M.; SILVANI, V.; COLOMBO, R.; BRACAMONTE, F.; GODEAS, A. Differential interaction between two *Glomus intraradices* strains and a phosphate solubilizing bacterium in maize rhizosphere. **Pedobiologia**, v. 55, n. 4, p. 227–232, 10 jul. 2012.
- BOSECKER, K. Bioleaching: Metal solubilization by microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3–4, p. 591–604, 1997.
- BRANCO, S. M.; MURGEL, P. H.; CAVINATTO, V. M. Compostagem: solubilização biológica de rocha fosfática na produção de fertilizante organomineral. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 6, n. 3, p. 115–122, 2001.
- CABRAL, B. **Biossolubilização de fósforo proveniente de concentrado de rocha fosfática por Trichoderma harzianum em diferentes biorreatores**. Universidade Federal de Uberlândia- Uberlândia- MG, 2016.
- CABRAL, B.; CARMO, T.S.; SOUZA, L.S.; LOPES, V.S.; FALLEIROS, L.N.S.S.; CARDOSO, V.L.; RIBEIRO, E.J. **Influence of recycling in phosphorus biosolubilization from rock phosphate concentrate in air-lift bioreactor**. XXI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS. Anais. Aracaju- Sergipe: 2017
- CERRI, M. **Avaliação de transferência de calor e massa de um biorreator airlift de circulação interna de bancada para a produção de ácido clavulânico**. Universidade Federal de São Carlos. São Carlo -SP, 2005.
- CHANG, R.; GOLDSBY, K. . **Química**. AMGH EDITORA LTDA, uma parceria entre GRUPO A EDUCAÇÃO S.A. e McGRAW-HILL EDUCATION, 2013.
- CHAUHAN, A. et al. Tricalcium phosphate solubilization and nitrogen fixation by newly isolated *Aneurinibacillus aneurinilyticus CKMV1* from rhizosphere of *Valeriana jatamansi* and its growth promotional effect. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 294–304, abr. 2017.
- CHAVES, A. **Rotas tecnológicas convencionais e alternativas para a obtenção de fertilizantes**. (P. E. CERRADOS, Ed.) Congresso Brasileiro de Rochagem. Anais. Planaltina - DF: 2010
- 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**, v. 34, n. 1, p. 33–41, nov. 2006.
- COELHO, H. J. **Regulamentação de Insumos Agrícolas Fertilizantes Orgânicos, Condicionadores de solo e substratos**. Disponível em: <[http://www.cnpma.embrapa.br/eventos/2007/workshop/organica/download/insumos\\_fertilizantes.pdf](http://www.cnpma.embrapa.br/eventos/2007/workshop/organica/download/insumos_fertilizantes.pdf)>. Acesso em: 11 mar. 2017.

- CORBRIDGE, D. E. C. **Phosphorus: Chemistry, Biochemistry and Technology**. CRC Press, 2013.
- COUTINHO, F. P.; FELIX, W. P.; YANO-MELO, A. M. Solubilization of phosphates in vitro by *Aspergillus spp.* and *Penicillium spp.* **Ecological Engineering**, v. 42, p. 85–89, maio 2012.
- CUNNINGHAM, J. .; KUIACK, C. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 1451–1458, 1992.
- DAVIS, P. .; SOLOMON, E.; BERG, L. . **The World of Biology**. Saunders C ed. Saunders College Publishing - Philadelphia, PA: 1990.
- Decreto 4954/04, Art.2, inc. VI. , 2004.**
- DHILLON, G. S. et al. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 1160–1167, jul. 2011.
- DIAS, E. G.; LAJOLO, R. D. **O meio ambiente na produção de fertilizantes fosfatados no Brasil**. 2010
- DIAS, V. **Fertilizantes: Uma Visão Global Sintética**. BNDES Setorial: Rio de Janeiro: 2004.
- DONI, F.; ZAIN, C.R. C. M.; ISAHAK, A.; FATHURRAHMAN, F.; SULAIMAN, N.; UPHOFF, N.; YUSOFF, W.M.W. Relationships observed between *Trichoderma* inoculation and characteristics of rice grown under System of Rice Intensification (SRI) vs. conventional methods of cultivation. **Symbiosis**, v. 72, n. 1, p. 45–59, 8 maio 2017.
- FANG, D.; ZHOU, L.-X. Enhanced Cr bioleaching efficiency from tannery sludge with coinoculation of *Acidithiobacillus thiooxidans TS6* and *Brettanomyces B65* in an air-lift reactor. **Chemosphere**, v. 69, n. 2, p. 303–310, 2007.
- FÖLLMI, K. B. The phosphorus cycle, phosphogenesis and marine phosphate-rich deposits. **Earth-Science Reviews**, v. 40, n. 1, p. 55–124, 1996.
- FUNKE, B. R.; CASE, C. L.; TORTORA, G. J. **Microbiologia**. ARTMED EDITORA S.A. Porto Alegre, 2012.
- GADAGI, R. .; SA, T. New isolation method for microorganisms solubilizing iron and aluminum phosphates using dyes. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 48, n. 4, p. 615–618, 1 ago. 2002.
- GAIND, S. Phosphate dissolving fungi: Mechanism and application in alleviation of salt stress in wheat. **Microbiological Research**, v. 193, p. 94–102, dez. 2016.

- GARBEVA, P.; VAN VEEN, J.; VAN ELSAS, J. Microbial diversity in soil: selection microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 243–270, 2004.
- GARCÍA-LÓPEZ, A. M.; AVILÉS, M.; DELGADO, A. Plant uptake of phosphorus from sparingly available P-source as affected by *Trichoderma asperellum T34*. **Agricultural and Food Science**, v. 24, p. 249–260, 2015.
- Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. Hypocrea jecorina). **Nat Biotech**, v. 26, n. 5, p. 553–560, maio 2008.
- GERKE, J. Phosphate aluminum, and iron in the soil solution of three different soils in relation to varying concentration of citric aci. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 155, n. 4, p. 339–343, 1992.
- GHOLAMI, R. M.; BORGHEI, S. M.; MOUSAVI, S. M. Bacterial leaching of a spent Mo-Co-Ni refinery catalyst using *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. **Hydrometallurgy**, v. 106, n. 1–2, p. 26–31, fev. 2011.
- GOLDSTEIN, A. H. **Bioprocessing of Rock Phosphate Ore: Essential Technical Considerations for the Development of a Succesful Commercial Technology**. IFA Technical Conference. **Anais**.New Orleans: 2000
- GOSWAMI, D.; DHANDHUKIA, P.; PATEL, P.; THAKKER, J. N. Screening of PGPR from saline desert of Kutch: Growth promotion in *Arachis hypogea* by *Bacillus licheniformis* A2. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 66–75, 20 jan. 2014.
- GRANT, R. F.; ROBERTSON, J. A. Phosphorus uptake by root systems: mathematical modelling in ecosys. **Plant and Soil**, v. 188, n. 2, p. 279–297, 1997.
- GUAZZELLI, M. J. B.; RUPP, L. C. D.; VENTURINI, L. **PROGRAMA DE FORTALECIMENTO DA VITICULTURA FAMILIAR DA SERRA GAÚCHA**, 2012.
- KAHN, H.A.B.; SANT'AGOSTINO, L.M.; TASSINARI, M.M.M.L.; ULSEN, C.B. Apatite From Alkaline Complexes Geological Aspects, Behavior In Mineral Processing And Characterization Techniques. **Ninth International Congress for Applied Mineralogy, 2008, Brisbane. Ninth International Congress for Applied Mineralogy - Proceedings**. Brisbane: Australasian Institute of Mining and Metallurgy, p. 507–514, 2008.
- HAGER, T. **Feeding a Hungry World**. Alabama, USA: International Fertilizer Development Center, 2014.
- HAMDALI, H.; SMIRNOV, A.; ESNAULT, C.; OUHDOUCH, Y.; VIROLLE, M.J. Physiological studies and comparative analysis of rock phosphate solubilization abilities of *Actinomycetales* originating from Moroccan phosphate mines and of *Streptomyces lividans*. **Applied Soil Ecology**, v. 44, n. 1, p. 24–31, jan. 2010.
- HARMAN, G. E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species [mdash] opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nat Rev Micro**, v. 2, n. 1, p. 43–56, jan. 2004.

- HE, L.; ZHONG, Z.; YANG, H. Effects on soil quality of biochar and straw amendment in conjunction with chemical fertilizers. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 16, n. 3, p. 704–712, mar. 2017.
- HIROTA, R.; KURODA, A.; KATO, J.; OHTAKE, H. Bacterial phosphate metabolism and its application to phosphorus recovery and industrial bioprocesses. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, n. 5, p. 423–432, maio 2010.
- ILLMER, P.; SCHINNER, F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 24, p. 389–395, 1992.
- IVANOVA, R.; BOJINOVA, D.; NEDIALKOVA, K. Rock phosphate solubilization by soil bacteria. **Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy**, v. 41, n. 3, p. 297–302, 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**, v. 46, n. 1, p. 90–94, set. 2010.
- JAKLITSCH, W. M. European species of Hypocreales Part I. The green-spored species. **Studies in Mycology**, v. 63, p. 1–91, 2009.
- JONES, D. L. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. **Plant and Soil**, v. 205, n. 1, p. 25–44, 1998.
- KAHN, H. **Caracterização de matérias-primas minerais associadas a complexos alcalino-carbonatíticos**. São Paulo: Escola Politécnica da USP, 1999.
- KANG, S.; HA, C.G.; LEE, T.G.; MAHESHWARI, D.K. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a soil-inhabiting fungus *Fomitopsis sp. PS 102*. **Current Science**, v. 82, n. 4, p. 439–442, 2002.
- KANTACHOTE, D.; Nunkaew, T.; KANTHA, T.; CHAIPRAPAT, S. Biofertilizers from *Rhodopseudomonas palustris* strains to enhance rice yields and reduce methane emissions. **Applied Soil Ecology**, v. 100, p. 154–161, abr. 2016.
- KATIYAR, V.; GOEL, R. Solubilization of inorganic phosphate and plant growth promotion by cold tolerant mutants of *Pseudomonas fluorescens*. **Microbiological research**, v. 158, n. 2, p. 163–8, 2003.
- KÖCK, M. Phosphorus Metabolism in Plants. W.C. Plaxton, H. Lambers (Eds.). Wiley Blackwell, Oxford, UK (2015). 449 pp., EUR 202.50, GBP 150.00, ISBN: 978-1-118-95885-8. **Journal of Plant Physiology**, v. 193, p. 45–46, 1 abr. 2016.
- KRÜGER, O.; ADAM, C. Phosphorus in recycling fertilizers - analytical challenges. **Environmental Research**, v. 155, p. 353–358, maio 2017.

KULAIF, Y. **Perfil do fosfato (Relatório Técnico nº53 do Projeto de Assistência ao Setor de Energia - Projeto Estal).** Disponível em: <[http://www.mme.gov.br/sgm/galerias/arquivos/plano\\_duo\\_decenal/a\\_mineracao\\_brasileira/P29\\_RT53\\_Perfil\\_do\\_Fosfato.pdf](http://www.mme.gov.br/sgm/galerias/arquivos/plano_duo_decenal/a_mineracao_brasileira/P29_RT53_Perfil_do_Fosfato.pdf)>. Acesso em: 24 mar. 2013.

LAPEYRIE, F.; RANGER, J.; VAIRELLES, D. Phosphate-solubilizing activity of ectomycorrhizal fungi in vitro. **Can. J. Bot.**, v. 69, p. 342–346, 1991.

LIMA, T. M.; NEVES, C. A. R. **Sumário Mineral.** 2016

LOUREIRO, F. E. L.; MONTE, M. B. ; NASCIMENTO, M. Agrominerais - Fosfato. In: CETEM/2008, 2<sup>a</sup> EDIÇÃO (Ed.). **Rochas e Minerais Industriais.** CETEM/2008 ed.

MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental: micronutrientes e metais pesados, mitos, mistificação e fatos.** Petroquímica - São Paulo, 1994

**Manual de Fertilizantes.** 1990.

MAPA. **Instrução Normativa nº 5 de 23 de fevereiro de 2007** MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Diário Oficial da União, anexo II, 2007, 2007.

MEDEIROS, M. B. DE; WANDERLEY, P. A.; WANDERLEY, M. J. A. Biofertilizantes Líquidos. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 31, p. 38–45, 2013.

MELO, I. ; COSTA, F. . **Desenvolvimento de uma formulação granulada a base de *Trichoderma harzianum* para controle de fitopatógenos.** Disponível em: <<https://www.embrapa.br/web/mobile/publicacoes>>. Acesso em: 19 abr. 2017.

MENDES, G. DE O.; VASSILEV, N.B.; BONDUKI, V. H. A.; 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**, v. 79, n. 16, p. 4906–4913, 6 ago. 2013.

MENDES, G. DE O.; FREITAS, A.L. M.; PEREIRA, O.L.; 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**, v. 64, n. 1, p. 239–249, 2014.

MENDES, I .; REIS JUNIOR, F. B. **Microrganismos e Disponibilidade de Fósforo (P) nos Solos: uma análise crítica.** Embrapa- ed. Planaltina - DF: 2003.

MINAXI, N. L.; YADAV, R C.; SAXENA, J. Characterization of multifaceted *Bacillus sp.* RM-2 for its use as plant growth promoting bioinoculant for crops grown in semi arid deserts. **Applied Soil Ecology**, v. 59, p. 124–135, ago. 2012.

MITCHELL, D. A. et al. Group III: Rotating-Drum and Stirred-Drum Bioreactors. In: **Solid-State Fermentation Bioreactors.** Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. p. 95–114.

MITTER, B. et al. Chapter Seven - Advances in Elucidating Beneficial Interactions Between Plants, Soil, and Bacteria. In: **AGRONOMY**, D. L. S. B. T.-A. IN (Ed.). Academic Press, 2013. v. Volume 121p. 381–445.

- MULLER, J. L. et al. Comparação do crescimento de *Saccharomyces boulardii* em fermentador por batelada tipo air lift e shaker. **Ciênci. Tecnol. Aliment.**, v. 27, n. 4, p. 688–693, 2007.
- NAHAS, E.; TERENZI, H. ; 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 3.1.3.1.) in *Neurospora crassa*. **Journal of General Microbiology**, v. 128, p. 2017–2021, 1982.
- OLIVEIRA, C.A.; ALVES, V.M.C.; MARRIEL, I.E.; GOMES, E.A.; SCOTTI, M.R.; CARNEIRO, N.P. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, p. 1782–1787, 2009.
- OLIVEIRA JUNIOR, A. M.; NASCIMENTO, A.G.J.; SILVA, T.C. S.; ANDRADE, S. F.; SANTOS, E.J.; MARQUES, J.J. Uso de reator air-lift em batelada para tratamento de efluentes de uma indústria de beneficiamento de coco. **Exacta**, v. 9, n. 2, 2011.
- PIKOVSKAYA, R. . Mobilizaton of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. **Mikrobiologua**, v. 17, p. 362–370, 1948.
- PRIHA, O.; SARLIN, T.; BLOMBERG, P.; WENDLING, L.; MÄKINEN, J.; ARNOLD, M.; KINNUNEN, P. Bioleaching phosphorus from fluorapatites with acidophilic bacteria. **Hydrometallurgy**, v. 150, p. 269–275, dez. 2014.
- PRIYADHARSHINI, P.; MUTHUKUMAR, T. The root endophytic fungus *Curvularia geniculata* from *Parthenium hysterophorus* roots improves plant growth through phosphate solubilization and phytohormone production. **Fungal Ecology**, v. 27, Part A, p. 69–77, jun. 2017.
- RAHMAN, A.; BEGUM, M.F.; RAHMAN, M.; BARI, M.A.; ILIAS, G.N.M.; ALAM, F. Isolation and identification of *Trichoderma* species from different habitats and their use for bioconversion of solid waste. **Turk J Biol**, v. 35, p. 183–194, 2011.
- RAIJ, B. VAN. **Fertilidade do solo e adubação**. 1991.
- RAIJ, B. VAN. **Fertilidade do solo e manejo de nutrientes**. Piracicaba ed. 2011.
- RATHI, N. et al. Co-aggregation of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* in culture and co-colonization in black gram (*Vigna mungo* L.) roots. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 304–308, jul. 2015.
- REINHOLD, V. **Phosphates in Agriculture**. Reinhold Publ. Corp., New York, and Chapman and Hall, London, 1965.
- REIS, R. L. G. **Fertilizantes. Brasil Mineral**. Disponível em: <<http://www.flip3d.com.br/web/pub/signus/index.jsp?ipg=61919>>. Acesso em: 24 mar. 2013.
- RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 319–339, 1999.

- RODRÍGUEZ COUTO, S.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, n. 3, p. 211–219, 2005.
- ROLEWICZ, M.; RUSEK, P.; BOROWIK, K. Obtaining of granular fertilizers based on ashes from combustion of waste residues and ground bones using phosphorous solubilization by bacteria *Bacillus megaterium*. **Journal of Environmental Management**, 2017.
- SALLES, P. **Avaliação de um reator tipo tambor rotativo para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2013.
- SAMBROOK, J. ; RUSSELL, D. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Sprin ed. 2012.
- SAMPAIO, R.; ALEGRE, R.M.; MARCOS, S.K.; BARROTI, G.; ÚBEDA, B.T.R. **Estudo da Solubilidade de Fosfato de Rocha Tipo “Tapira” por Fungos do Gênero Aspergillus**. Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações. **Anais**.Florianópolis: 2003
- SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial**. Editora Bl ed. São Paulo: São Paulo: Editora Blucher, 2001.
- SHRIVASTAVA, M.; KALE, S. P.; D'SOUZA, S. F. Rock phosphate enriched post-methanation bio-sludge from kitchen waste based biogas plant as P source for mungbean and its effect on rhizosphere phosphatase activity. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, n. 3, p. 205–212, maio 2011.
- SILVA, N. D. **IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO E ANÁLISE DO SEU EFEITO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS DE *Arabidopsis thaliana***. UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO - UENF. Campos do Goytacazes - RJ, 2012.
- SILVA, V. N. **Interação de microrganismos na solubilização de fósforo e potássio de rochas para produção de biofertilizantes**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2013.
- SILVA, W. O. et al. The impact of biofertilizers with diazotrophic bacteria and fungi chitosan on melon characteristics and nutrient uptake as an alternative for conventional fertilizers. **Scientia Horticulturae**, v. 209, p. 236–240, 19 set. 2016.
- SILVA FILHO, G. . **Solubilização de fosfatos pela microbiota do solo**. Universidade Federal do Rio Grando do Sul. Porto Alegre - RS, 1998.
- SILVA FILHO, G. .; VIDOR, C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos Material e Métodos. n. 1, p. 1495–1508, 2001.
- SILVERMAN, M.; LUNDGREN, D. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. **J Bacteriol**, v. 5, n. 77, p. 642–647, 1959.

SOUZA, A. E. DE. **Departamento Nacional de Produção Mineral.** Disponível em: <<http://www.dnpm.gov.br/dnpm/paginas/balanco-mineral/arquivos/balanco-mineral-brasileiro-2001-fosfato>>. Acesso em: 11 mar. 2017.

TAO, G.-C.; TIAN, S.J.; CAI, M.Y.; XIE, G.H. Phosphate-Solubilizing and -Mineralizing Abilities of Bacteria Isolated from Soils1 Project supported by the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, the Ministry of Education of the P.R. China. **Pedosphere**, v. 18, n. 4, p. 515–523, 2008.

TRABELSI, D.; CHERNI, A.; ZINEB, A.B.; DHANE, S.F.; MHAMDI, R. Fertilization of Phaseolus vulgaris with the Tunisian rock phosphate affects richness and structure of rhizosphere bacterial communities. **Applied Soil Ecology**, v. 114, p. 1–8, jun. 2017.

TUOVINEN, O. H.; KELLY, D. P. Studies on the growth of Thiobacillus ferrooxidans. **Archiv für Mikrobiologie**, v. 88, n. 4, p. 285–298, 1973.

ULIANA, D.; KAHN, H.; BRAZ, A. B. Caracterização tecnológica dos tipos de minério de fosfato do Complexo Alcalino de Salitre, MG - Área Fosfértil. **Rev. Esc. Minas**, v. 62, n. 4, 2009.

ULRICH, A. E.; FROSSARD, E. On the history of a reoccurring concept: Phosphorus scarcity. **Science of The Total Environment**, v. 490, p. 694–707, 15 ago. 2014.

**United States Geological Survey.** Disponível em: <<http://minerals.er.usgs.gov/minerals/ubs/mcs/2009/mcs2009.pdf>>. Acesso em: 18 mar. 2013.

VASSILEV, N.; MEDINA, A.; AZCON, R.; VASSILEVA, M. Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and P uptake. **Plant and Soil**, v. 287, n. 1, p. 77, 2006.

VASSILEV, N.; MEDINA, A.; MENDES, G.; GALVEZ, A.; MARTOS, V.; VASSILEVA, M. Solubilization of animal bonechar by a filamentous fungus employed in solid state fermentation. **Ecological Engineering**, v. 58, p. 165–169, set. 2013.

VASSILEV, N.; MEDINA, A.; MENDES, G.; GALVEZ, A.; Martos, V.; VASSILEVA, M. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal laggon. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, n. 5, p. 460–468, 2000.

WHITELAW, M. A. Growth Promotion Of Plants Inoculated With Phosphate-Solubilizing Fungi. **Advances Agronomy**, v. 69, n. 0065–2113, p. 99–151, 2000.

WHITELAW, M. A.; HARDEN, T. J.; HELYAR, K. R. Phosphate solubilisation in solution culture by the soil Fungus penicillium radicum. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, n. 5, p. 655–665, 1999.

WU, Y. et al. A rock-weathering bacteria isolated from rock surface and its role in ecological restoration on exposed carbonate rocks. **Ecological Engineering**, v. 101, p. 162–169, abr. 2017.

- WYCISZKIEWICZ, M.; SAEID, A.; DOBROWOLSKA-IWANEK, J.; CHOJNACKA, K. Utilization of microorganisms in the solubilization of low-quality phosphorus raw material. **Ecological Engineering**, v. 89, p. 109–113, abr. 2016.
- XIAO, C.-Q.; Xiao, Chi, R.; LI, H.X.; XIA, M.; XIA, Z. Biosolubilization of Rock Phosphate by Three Stress Tolerant Fungal Strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, p. 719–727, 2011a.
- XIAO, C. Q.; CHI, R.-A.; HUANG, X.-H.; ZHANG, W.-X.; QIU, G.-Z.; WANG, D.-Z. Optimization for rock phosphate solubilization by phosphate-solubilizing fungi isolated from phosphate mines. **Ecological Engineering**, v. 33, n. 2, p. 187–193, 2008.
- XIAO, C. Q.; CHI, R. A.; LI, W.S.; ZHENG, Y. Biosolubilization of phosphorus from rock phosphate by moderately thermophilic and mesophilic bacteria. **Minerals Engineering**, v. 24, n. 8, p. 956–958, 2011b.
- XIAO, C. Q.; CHI, R. A.; FANG, Y. J. Effects of *Acidiphilium cryptum* on biosolubilization of rock phosphate in the presence of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition)**, v. 23, n. 7, p. 2153–2159, 2013.
- YAMADA, T. **Fósforo na Agricultura Brasileira**. Funep ed.
- YU, X.; LIU, X.; ZHU, T.-H.; LIU, G.-H.; MAO, C. Co-inoculation with phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing bacteria on solubilization of rock phosphate and their effect on growth promotion and nutrient uptake by walnut. **European Journal of Soil Biology**, v. 50, p. 112–117, maio 2012.
- YU, Z.; YU, R.; LIU, A.; LIU, J.; ZENG, W.; LIU, X.; QIU, G. Effect of pH values on extracellular protein and polysaccharide secretions of *Acidithiobacillus ferrooxidans* during chalcopyrite bioleaching. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, v. 27, n. 2, p. 406–412, fev. 2017.

---

## APÊNDICES

---

### Apêndice A – Composição meio simples fosfato

Glicose	10g;
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,6g;
KCl	0,4g;
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	5,0g;
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,087g;
Ágar	15g
Água	1000mL