

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
KAMILA FERNANDA ROSSATI

**AVALIAÇÃO DE BIOCARVÕES COMO POTENCIALIZADORES DA
SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS POR *Aspergillus niger***

Monte Carmelo

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

KAMILA FERNANDA ROSSATI

**AVALIAÇÃO DE BIOCÁRVÕES COMO POTENCIALIZADORES DA
SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS POR *Aspergillus niger***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Agronomia, da Universidade Federal de Uberlândia Campus Monte Carmelo, como requisito necessário para obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Gilberto de Oliveira Mendes

Monte Carmelo

2018

KAMILA FERNANDA ROSSATI

**AValiação de Biocarvões como Potencializadores da
Solubilização de Fosfatos por *Aspergillus niger***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Agronomia, da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Monte Carmelo, como requisito necessário para obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

Monte Carmelo, 6 de dezembro de 2018.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Gilberto de Oliveira Mendes
Orientador (a)

Prof. Dr. Bruno Sérgio Vieira
Membro da Banca

Prof. Dr. Enio Tarso de Souza Costa
Membro da Banca

Monte Carmelo
2018

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida, acima de tudo, por estar ao meu lado, guiando meus passos e dando-me sabedoria e paciência para concretização de mais uma etapa em minha vida.

À Universidade Federal de Uberlândia, Campus Monte Carmelo, pela oportunidade de realizar o curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gilberto de Oliveira Mendes, pela paciência e ensinamentos. Meus sinceros agradecimentos pela orientação e confiança durante a realização dos meus trabalhos.

A todos os professores e funcionários que estiveram comigo nessa caminhada, agradeço pelo conhecimento adquirido e amizade.

Aos membros da banca, pelo auxílio na construção desse trabalho, aprimoramento dos conhecimentos adquiridos e pela disponibilidade de participar da minha defesa.

Aos meus colegas de laboratório, Laura e Vinícius, que fizeram com que essa caminhada fosse mais tranquila e mais divertida.

Aos meus pais, Marcos, Maria, pelo apoio, ajuda e dedicação. Minha irmã, Kellin, que me ajudou.

Ao meu amado, Rafael, que esteve comigo nessa caminhada me dando apoio e me auxiliando no que fosse necessário.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	6
2 OBJETIVO.....	7
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	8
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	10
4.1 Efeito de diferentes biocarvões na solubilização de fontes de P.....	10
4.2 Potencial de liberação de P de biocarvão de lodo de esgoto em contato com solo.....	11
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
5 CONCLUSÃO.....	18
6 REFERÊNCIAS.....	18

RESUMO

Micro-organismos solubilizadores de fosfato (P) apresentam grande potencial de aplicação na agricultura como alternativa para disponibilizar P do solo para as plantas e melhorar o desempenho de fertilizantes fosfatados. A atividade desses micro-organismos é potencializada na presença de biocarvão, que demonstra capacidade de sorção de compostos inibitórios e estímulo à produção de ácidos orgânicos. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar biocarvões de diferentes materiais orgânicos como potencializadores do processo de solubilização de diferentes fontes de P. O primeiro experimento visa avaliar o efeito de diferentes biocarvões na solubilização de fontes de P. Esse experimento foi realizado em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio NBRIP, onde a fonte de P do meio original foi substituída por AlPO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Fosfato Natural de Araxá ou Fosfato Natural Bayóvar, na concentração de 3 g L^{-1} . Os biocarvões foram aplicados na dose de 3 g L^{-1} , sendo produzidos a partir de lodo de esgoto pirolisado a $300 \text{ }^\circ\text{C}$, lodo de esgoto pirolisado a $500 \text{ }^\circ\text{C}$, palha de café e serragem. Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave e, em seguida, inoculados com 1 mL de suspensão de conídios de *Aspergillus niger*. Após a inoculação, os erlenmeyers foram incubados durante 7 dias em *shaker* a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação de 165 rpm. O segundo experimento visa determinar o potencial de liberação de P de biocarvão de lodo de esgoto na presença de solo. O teste foi realizado em erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio NBRIP suplementado com solo. Os tratamentos consistiram em: fungo + biocarvão + ST, fungo + biocarvão, fungo + ST, fungo, biocarvão + ST, biocarvão, ST e controle negativo. O ST foi adicionado à dose de 25 mg P L^{-1} . O biocarvão utilizado foi o biocarvão de lodo de esgoto pirolisado a $500 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo adicionado à dose de 3 g L^{-1} . Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave, e em seguida, inoculados com 1 mL de suspensão de conídios. Em seguida, os erlenmeyers foram incubados em *shaker* a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação de 165 rpm por 7 dias. Ao final do período de incubação, as amostras foram filtradas em papel filtro quantitativo e analisadas quanto a concentração de P solúvel e pH. O biocarvão de lodo de esgoto aumenta a quantidade de P solubilizado das fontes AlPO_4 e FN Araxá por *A. niger*. Além disso, o fungo é capaz de solubilizar P do próprio biocarvão de lodo de esgoto. A adição de biocarvão de lodo de esgoto associada à inoculação com *A. niger* propicia liberação de P do biocarvão para solução contendo solo com alta capacidade de retenção de P.

Palavras chave: solubilização; biocarvão; fungo; fósforo

1 INTRODUÇÃO

O fósforo (P) é um nutriente associado a processos de produção de energia (ATP), fotossíntese e respiração, além de participar na síntese e composição de ácidos nucleicos e membrana celular, em reações de oxirredução, na ativação/inativação de enzimas, entre outros (HINSINGER, 2001). É um elemento essencial e finito, que tende a formar ligações estáveis com componentes do solo, e que não apresenta mudança no estado de oxidação e nem formas gasosas na atmosfera (BINI; LOPÉZ, 2016).

A dinâmica do P no solo tem sido objeto de muitos estudos, com o propósito de proporcionar aumento de produtividade nas culturas e melhorar o seu índice de aproveitamento pelas plantas, dando suporte a uma diminuição no uso de fertilizantes. O conhecimento das transformações do P pela microbiota do solo pode dar amparo a esse ponto, proporcionando assim, melhorias e maior sustentabilidade dos cultivos agrícolas (BINI; LOPÉZ, 2016).

As rochas fosfáticas (RFs) constituem a principal reserva de P na natureza, apresentando principalmente fluorapatita [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_6\text{F}$] em sua composição e, por isso, são pouco solúveis em água. As RFs brasileiras, na grande maioria, apresentam baixa reatividade e, como consequência, baixa ou lenta liberação de P para as plantas. Em virtude disso, a aplicação direta não é, em geral, adequada para satisfazer as necessidades das plantas mais exigentes em curto e, muitas vezes em longo prazo (NOVAIS; SMYTH, 1999)

Uma alternativa para incrementar a eficiência agronômica das rochas fosfáticas (RFs) é a utilização de micro-organismos solubilizadores de fosfato (MSF) (SCHNEIDER et al., 2010). Várias espécies de fungos e bactérias demonstram capacidade para solubilizar P. Todavia, fungos geralmente são superiores, uma vez que demonstram maior potencial de acidificação do meio circulante, condição que favorece a solubilização de P (BANIK; DEY, 1982; CHATLI; BERI; SIDHU, 2008).

Durante a solubilização da RF os micro-organismos ficam expostos a elementos químicos que são liberados juntamente com o P. Um dos principais compostos liberados, o fluoreto (F^-), causa forte queda no processo de solubilização de P (MENDES et al., 2013). Isso sugere que a maioria dos sistemas de solubilização microbiana de RF pode estar funcionando em condições não otimizadas, já que muitas RFs contêm o F em sua composição

[Ca₅(PO₄)₃F] (MENDES et al., 2013). Dessa forma, espera-se que estratégias para remover o F⁻ enquanto ele é liberado no processo de solubilização possam aumentar a eficiência global da solubilização microbiana de RFs. Uma das soluções utilizadas para remover esse F⁻ é a adição de materiais capazes de adsorvê-lo, tais como biocarvão (MENDES et al., 2014a).

O biocarvão pode ser produzido a partir de vários materiais orgânicos, incluindo resíduos agroindustriais e urbanos, sendo caracterizado como um material sustentável e de baixo custo. O biocarvão é produzido por decomposição térmica de material orgânico sob baixa disponibilidade de oxigênio e temperaturas <700 °C. O processo muitas vezes se espelha na produção de carvão vegetal, que é um das tecnologias industriais mais antigas desenvolvidas pela humanidade. Entretanto, o biocarvão distingue-se do carvão vegetal, uma vez que o biocarvão é produzido com a intenção de ser aplicado ao solo como forma de melhoria da produtividade, armazenamento de carbono e retenção de água no solo (LEHMANN; JOSEPH, 2009).

O biocarvão é um aditivo a ser considerado no processo de fabricação de biofertilizantes com MSFs. A adição de biocarvão de resíduos de azinheira (*Quercus ilex*) aumentou a solubilização de P por *Aspergillus niger* por meio da remoção do F⁻ e do aumento da produção de ácidos orgânicos pelo fungo (MENDES et al., 2014a). Dada a grande variação nas propriedades químicas e físicas de biocarvões obtidos de diferentes materiais orgânicos e temperaturas de pirólise (DOUMER et al., 2015), é plausível assumir que estes terão efeitos diferentes sobre a solubilização de fosfatos por *A. niger*. Portanto, a seleção de um biocarvão que potencialize a atividade solubilizadora de *A. niger* terá consequência direta no processo de produção de formulações de biofertilizantes com maior desempenho em campo.

2 OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar biocarvões de diferentes materiais orgânicos como potencializadores do processo de solubilização de fontes de P por *A. niger*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

O fósforo (P) é um dos elementos essenciais para o crescimento vegetal (RAGHOTHAMA, 1999). Sua função na planta está associada aos processos de produção de energia (ATP), fotossíntese e respiração, além de participar da constituição de várias biomoléculas, como, fosfolipídios, ácidos nucleicos, fosfoproteínas e coenzimas.

No solo, o P é pouco móvel e é encontrado na forma orgânica (Po) e na fração inorgânica (Pi). O ortofosfato (H_2PO_4^-) é a forma predominante na solução do solo e assimilável pelas plantas e micro-organismos do solo. A baixa mobilidade e alta tendência de adsorção pelos óxidos de Fe e Al tornam o P deficiente na maior parte dos solos brasileiros (BINI; LOPÉZ, 2016). Esse fenômeno é perceptível em solos ácidos, onde o P pode sofrer precipitação com Al^{3+} e Fe^{3+} , e em solos calcários ou alcalinos, onde precipita com o Ca^{2+} (NOVAIS; SMYTH, 1999; WHITELAW, 1999). Essas características fazem com que o solo atue como dreno e concorra com a planta pelo P (NOVAIS; SMYTH, 1999). Dessa forma, para se obter alta produtividade vegetal, a utilização de fertilizantes fosfatados faz-se prática essencial.

A utilização de fertilizantes fosfatados é menor apenas que a de fertilizantes nitrogenados (FAO, 2017). Nos últimos anos, 50% dos produtos fosfatados utilizados no Brasil foram originários de importação (FAO, 2017). Os fertilizantes fosfatados são obtidos principalmente de rochas fosfáticas (RFs) compostas por apatita [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F},\text{Cl},\text{OH})$], apresentando composição química e reatividade variável a depender de sua origem. Essa diferença de reatividade é resultante de características intrínsecas da RF, sendo o grau de substituição isomórfica de PO_4^{3-} por CO_3^{2-} na rede cristalina, a porosidade e a granulometria as mais importantes. Geralmente, as RFs que apresentam elevado grau de substituição isomórfica são capazes de liberar o P com mais facilidade para as plantas (NOVAIS; SMYTH, 1999). As RFs brasileiras, em sua maioria, apresentam baixa reatividade e isso resulta em baixa ou lenta liberação de P para as plantas. Por esse fato, a aplicação direta, em geral, não é adequada para satisfazer as necessidades das plantas em curto e, muitas vezes, em longo prazo (NOVAIS; SMYTH, 1999)

O tratamento com ácido sulfúrico ou fosfórico tem sido uma das principais opções para solubilização de RFs nas indústrias. Esse processo consome grande quantidade de

energia, além de ocasionar a quase completa dissolução da rocha, gerando produtos indesejados em forma de gases, subprodutos, ou mesmo no próprio fertilizante fosfatado (GOLDSTEIN; ROGERS; MEAD, 1993). As reservas de P que são exploradas com a tecnologia atual (RFs com alto conteúdo de P) podem ser consideradas como um recurso natural não renovável, com previsões para se esgotarem nos próximos séculos (CORDELL; WHITE, 2011; VACCARI; STRIGUL, 2011).

Para incrementar a eficiência agrônômica de RFs tem sido proposto a utilização de MSF como alternativa biotecnológica sustentável e de baixo custo (SCHNEIDER et al., 2010). Vários fungos e bactérias demonstram potencial de solubilização de P, porém, fungos são geralmente superiores, uma vez que, apresentam maior potencial de acidificação de meio onde estão inseridos, condição que favorece a solubilização de P (BANIK; DEY, 1982; CHATLI; BERI; SIDHU, 2008). Os gêneros fúngicos *Aspergillus* e *Penicillium* são capazes de solubilizar P (MENDES et al., 2014b; WHITE LAW, 1999). Entre as bactérias, os gêneros *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Erwinia*, entre outras, são capazes de solubilizar P devido à produção de ácidos orgânicos (KHAN; ZAIDI; WANI, 2007; MAHDI; HASSAN, 2011; RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999).

Durante o processo de solubilização da RF, os micro-organismos ficam expostos a elementos químicos liberados na reação (MENDES et al., 2013). Um dos principais compostos liberados, o fluoreto (F^-), pode causar forte diminuição da solubilização de P, sugerindo que a maioria dos sistemas de solubilização microbiana pode estar funcionando em condições não otimizadas. Assim, espera-se que estratégias utilizadas para remover o F^- enquanto ele é liberado no processo de solubilização poderiam aumentar a eficiência global de solubilização da RF. Uma estratégia utilizada para remover o F^- de soluções é a adição de materiais com capacidade de adsorvê-lo, como o biocarvão (MENDES et al., 2014a).

O biocarvão é o produto oriundo da pirólise de biomassa. Seu uso tem sido sugerido para inúmeras finalidades, tais como condicionador de solo e fonte de nutrientes para as plantas, e como um método para reduzir a emissão de gases do efeito estufa. Entre as várias matérias-primas utilizadas para a produção de biocarvão, o lodo de esgoto apresenta um grande potencial, devido às suas características físicas, químicas e biológicas, para aumentar de forma sustentável a produtividade de culturas agrícolas com ganhos ambientais e sociais (SOUSA; FIGUEIREDO, 2016).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Efeito de diferentes biocarvões na solubilização de fontes de P

Os ensaios de solubilização foram realizados em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio NBRIP [10 g de glicose, 5 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,25 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2 g de KCl e 0,1 g de $(NH_4)_2SO_4$] (NAUTIYAL, 1999). A fonte de P do meio original foi substituída por $AlPO_4$, $Ca_3(PO_4)_2$, $FePO_4 \cdot 2H_2O$, Fosfato Natural Araxá (13,97% P, partículas < 75 μm) e Fosfato Natural Bayóvar (14,6% P, partículas < 75 μm), todas à concentração de 3 g L^{-1} . Os biocarvões (partículas < 2 mm) foram aplicados à dose de 3 g L^{-1} , sendo obtidos de diferentes materiais orgânicos: palha de café, serragem, lodo de esgoto pirolisado a 300 °C e lodo de esgoto pirolisado a 500 °C. A caracterização dos biocarvões está descrita na Tabela 1.

As fontes de P e os biocarvões foram pesados individualmente para cada erlenmeyer. O pH do meio foi ajustado para 7, com auxílio de um pHmetro antes da adição das fontes de P e biocarvões. Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 30 min e, em seguida, inoculados com 1 mL de suspensão de conídios de *A. niger* ($\sim 10^7$ conídios mL^{-1}), preparada em Tween 80 0,1% (v/v). Após a inoculação, os erlenmeyers foram incubados durante 7 dias em *shaker* a 30 °C sob agitação de 165 rpm.

Após o período de incubação, as amostras foram filtradas em papel filtro quantitativo (poros 4-12 μm) e analisadas quanto à concentração de P solúvel (BRAGA; DEFELIPO, 1974) e pH.

O experimento foi montado em delineamento em blocos casualizados (DBC) sob esquema fatorial 6x5, correspondendo a 5 fontes de P + testemunha e 4 tipos de biocarvão + testemunha. Para a análise de variância, os dados foram transformados por raiz quadrada e, em seguida, os tratamentos foram comparados pelo teste Fisher LSD ($p < 0,05$).

Para verificar se havia liberação de P durante o processo de autoclavagem, foi determinada a concentração de P nos materiais utilizados com ou sem autoclavagem a 121 °C durante 30 minutos. Essa determinação foi realizada em erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de água destilada com adição das diferentes fontes de P e biocarvões utilizados. As amostras autoclavadas e não autoclavadas foram agitadas por 10 minutos em *shaker* a 30 °C

sob agitação de 165 rpm. Em seguida, as amostras foram filtradas em papel filtro quantitativo e analisadas quanto à concentração de P solúvel (BRAGA; DEFELIPO, 1974) e pH (Tabela 1).

Tabela 1: Caracterização dos biocarvões e fontes de fósforo.

Material	P total (g kg ⁻¹)	P _{H₂O} ^a sem autoclavagem (g kg ⁻¹)	P _{H₂O} após autoclavagem (g kg ⁻¹)	pH sem autoclavagem	pH após autoclavagem	Temperatura de pirólise (°C)
Biocarvões						
Lodo de esgoto	41,1	0,02	0,02	5,8	7,32	300
Lodo de esgoto	61,3	0,04	0,02	6,5	7,03	500
Palha de café	1,5	0,48	0,38	7,58	8,25	600
Serragem	0,4	0,06	0,15	7,15	8,23	600
Fontes de P						
AlPO ₄	254	0,59	1,82	6,86	6,87	-
Ca ₃ (PO ₄) ₂	200	0,13	0,08	6,36	7,16	-
FePO ₂ ·2H ₂ O	166	0,39	0,33	6,74	6,63	-
FN Araxá	140	0,39	0,27	6,88	7,05	-
FN Bayóvar	146	0,02	0,05	6,78	7,02	-

^a P solúvel em água

4.2 Potencial de liberação de P de biocarvão de lodo de esgoto em contato com solo

O solo utilizado pertence à ordem dos Latossolos e apresenta as seguintes características: pH em água 5,1; P_{meh} 4,6 mg dm⁻³; P total 47 mg dm⁻³; textura argilosa (51% argila e 36,5% areia). O solo foi seco ao ar e passado em peneira de 2 mm para obtenção da terra fina seca ao ar (TFSA). O fertilizante fosfatado utilizado foi o superfosfato triplo (ST, 18,97% P). Para montagem do experimento, os grânulos do fertilizante foram triturados em almofariz e passados através de peneira de 75 µm.

O ensaio experimental foi realizado em erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio NBRIP (NAUTIYAL, 1999), sem a fonte de P original, suplementado com 10 g L⁻¹ de solo. O pH do meio foi ajustado para 7 antes da adição do solo e das fontes de P e biocarvão. Os tratamentos consistiram em: fungo + biocarvão + ST, fungo + biocarvão, fungo + ST,

fungo, biocarvão + ST, biocarvão, ST e controle negativo (ausência dos fatores fungo, biocarvão e ST). O ST foi adicionado à dose de 25 mg P L⁻¹. O biocarvão utilizado foi o de lodo de esgoto pirolisado a 500 °C, sendo aplicada a dose de 3 g L⁻¹. As quantidades de ST e biocarvão foram pesadas e adicionadas individualmente aos erlenmeyers.

Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 30 minutos e, em seguida, os tratamentos que deveriam receber o fungo foram inoculados com 1 mL de suspensão de conídios de *A. niger* preparada em Tween 80 0,1% (v/v). Em seguida, os erlenmeyers foram incubados em *shaker* a 30 °C sob agitação de 165 rpm por 7 dias.

Ao final de período de incubação, as amostras foram filtradas em papel de filtro quantitativo e analisadas quanto à concentração de P solúvel (BRAGA; DEFELIPO, 1974) e pH.

O experimento foi montado em esquema fatorial 2³, correspondendo a 2 níveis (presença e ausência) dos fatores fungo, biocarvão e ST. Os resultados foram transformados por raiz quadrada para a análise de variância e comparados segundo o teste de Tukey (p < 0,05).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os biocarvões avaliados, apenas os biocarvões de lodo de esgoto pirolisado a 300 °C e lodo de esgoto pirolisado a 500 °C aumentaram a concentração de P solúvel no meio (Figura 1A). O efeito foi significativo para AlPO₄ e FN Araxá, com incremento relativo ao controle sem biocarvão de 55% e 234%, respectivamente. A adição de biocarvão ao meio de cultura aumenta a produção de ácidos orgânicos por *A. niger*, o que favorece a solubilização de fosfatos (MENDES et al., 2014a). Além disso, o incremento em solubilização pode ser resultado da remoção, por meio de adsorção ao biocarvão, de compostos inibitórios liberados das fontes de P. Para as fontes AlPO₄ e FN Araxá a capacidade de adsorção de Al³⁺ (QIAN; CHEN; HU, 2013) e F⁻ (MENDES et al., 2014a) pelo biocarvão provavelmente é um dos fatores responsáveis pelo incremento na solubilização, haja vista o efeito inibitório desses compostos sobre micro-organismos.

Entre as fontes de P avaliadas, a porcentagem de solubilização para as fontes AlPO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, FN Araxá e FN Bayóvar representou 53, 96, 78, 33 e 41% do total do P adicionado aos meios, respectivamente (Tabela 2). Quando houve adição de biocarvão, para a fonte AlPO_4 , essa quantidade passou para 79 e 85% para os biocarvões de lodo de esgoto 300 °C e lodo de esgoto 500 °C, respectivamente. Para o FN Araxá, a adição de biocarvão de lodo de esgoto 300 °C e lodo de esgoto 500 °C elevou a solubilização para 128 e 81% do P contido na rocha, respectivamente. Parte desse incremento deve-se à liberação de P do biocarvão pela ação do fungo (Figura 1A), o que explica o valor acima de 100% observado para o FN Araxá. Entretanto, é possível verificar que o aumento observado é superior aos valores de P liberados do biocarvão quando não há adição de outra fonte de P. Dessa forma, os dados evidenciam que há aumento na solubilização de P, que provavelmente resultam dos benefícios do biocarvão à solubilização de P por *A. niger* já discutidos.

O pH ao final do período de incubação variou entre 2 e 4 (Figura 1B), não sendo possível estabelecer correlações significativas com os valores de P solubilizado. De forma geral, observa-se diminuição do pH do meio de solubilização como resultado da produção de ácidos pelo MSF (ARCAND; SCHNEIDER, 2006; MENDES et al., 2014b). Como os biocarvões apresentam característica neutra a alcalina (Tabela 1), é provável que parte da acidez produzida pelo MSF tenha sido neutralizada pelo biocarvão.

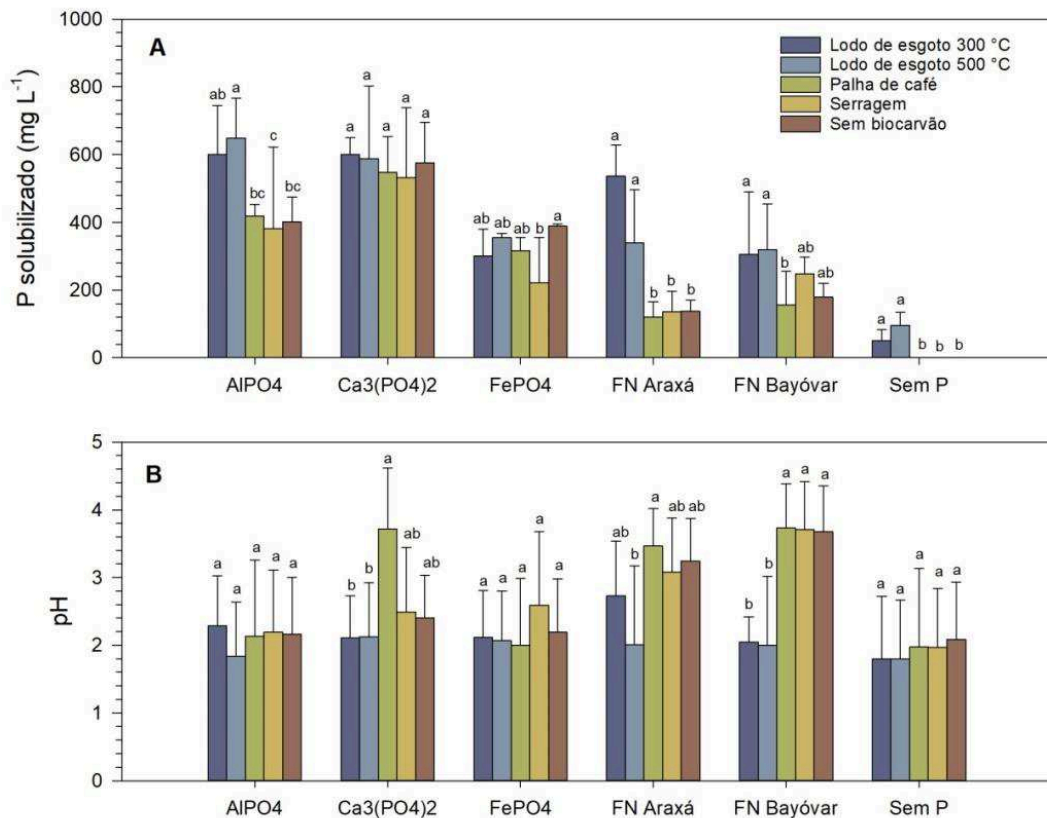


Figura 1. P solúvel (A) e pH (B) após sete dias de incubação de *Aspergillus niger* em fermentação líquida com fontes de P insolúveis e biocarvões. Colunas com letras iguais não diferem entre si pelo teste Fisher LSD ($p < 0,05$). Barras de erros representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

Tabela 2. Porcentagem de P solubilizado a partir de fosfatos de baixa solubilidade pela ação de *Aspergillus niger* incubado por sete dias em fermentação líquida suplementada com biocarvões produzidos de distintas matérias-primas.

Fonte P	Biocarvão				
	Lodo de esgoto	Lodo de esgoto	Palha de café	Serragem	Sem biocarvão
	300 °C	500 °C			
AlPO ₄	79	85	55	50	53
Ca ₃ (PO ₄) ₂	100	98	91	89	96
FePO ₄ ·2H ₂ O	61	71	64	45	78
FN Araxá	128	81	29	33	33
FN Bayóvar	70	73	36	56	41

Nos meios onde não foi adicionada nenhuma fonte de P foi detectado P solúvel nos tratamentos com biocarvão de lodo de esgoto (Figura 1A). É comum a presença de altas concentrações de P nesse tipo de biocarvão (RAYMOND; JENSEN; MÜLLER STÖVER, 2018; SOUSA; FIGUEIREDO, 2016). Os biocarvões de lodo de esgoto utilizados no presente trabalho possuem 41,1 e 61,3 g P kg⁻¹ (Tabela 1) para as temperaturas de pirólise de 300 e 500 °C, respectivamente. A pirólise do material orgânico leva à perda de C, H e O por volatilização, resultando no aumento, em proporção, da concentração de P no biocarvão (SOUSA; FIGUEIREDO, 2016). No entanto, a maior parte do P contido no biocarvão, bem como nas fontes de P avaliadas, é insolúvel em água (Tabela 1). As concentrações de P solúvel observadas nos tratamentos com biocarvão de lodo de esgoto pirolizado a 300 e 500 °C (Figura 1A) representam solubilização de 41 e 52%, respectivamente, do P presente nestes.

A liberação de P a partir do biocarvão de lodo de esgoto abre a perspectiva de utilização do fungo *A. niger* para aumentar a disponibilização de P do biocarvão e, assim, viabilizar seu uso como fonte alternativa de P, conforme vem sendo proposto (EFTHYMIU et al., 2018; RAYMOND; JENSEN; MÜLLER STÖVER, 2018). Para avaliar esse potencial, foi realizado um experimento *in vitro* para simular o potencial de liberação de P na presença de solo, do fungo *A. niger*, do biocarvão e de um fertilizante fosfatado solúvel, o ST.

A inoculação com *A. niger* combinada com a adição de biocarvão de lodo de esgoto resultou nas maiores concentrações de P solúvel (Figura 2). Quando se observa que no tratamento que recebeu apenas biocarvão não há disponibilização de P, fica nítido o potencial de utilização do fungo para melhorar o desempenho do biocarvão por meio da solubilização de P. Quando aplicado ao solo, o biocarvão de lodo de esgoto aumentou a concentração de P extraível (P-Mehlich) em até 257 vezes (SOUSA; FIGUEIREDO, 2016). Contudo, as doses de biocarvão aplicadas foram altas (10-50 g kg⁻¹ de solo) e menos de 5% do P contido no biocarvão foi convertido em P extraível. Os dados obtidos no presente trabalho sugerem que esse rendimento poderia ser melhorado e, assim, benefícios iguais ou superiores poderiam ser obtidos com menores doses do biocarvão.

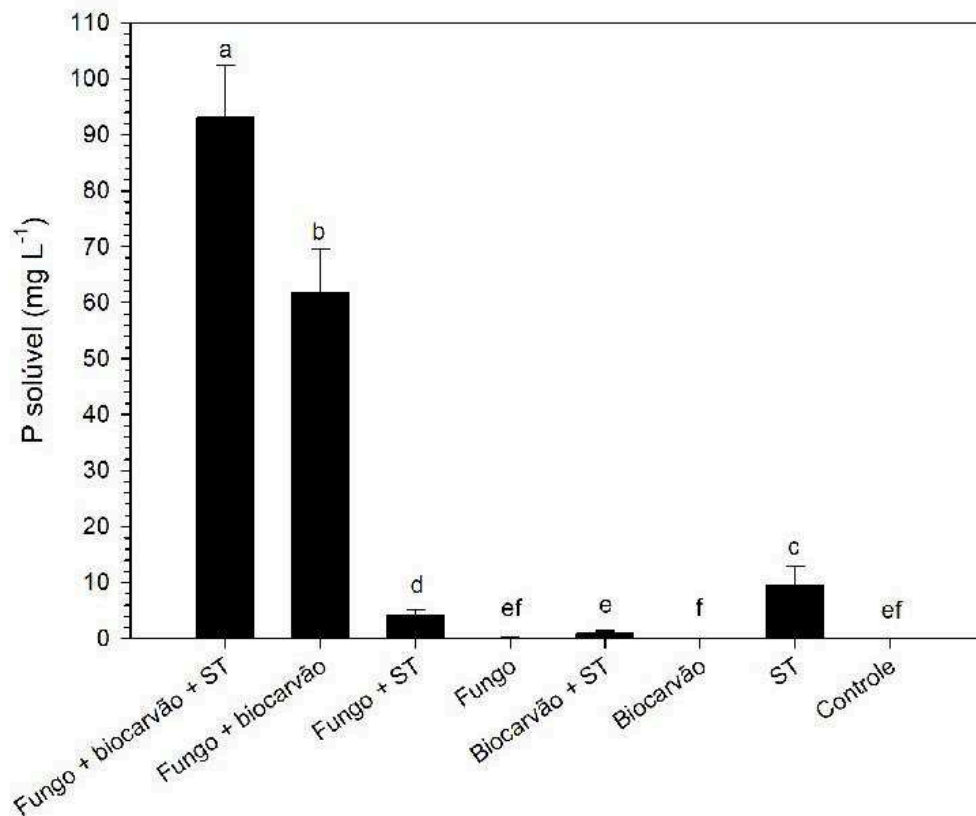


Figura 2. P solúvel após sete dias de incubação de meio de cultura contendo solo (10 g L⁻¹) sob adição ou não de *Aspergillus niger*, biocarvão de lodo de esgoto (500 °C) e superfosfato triplo (ST). Tratamentos com pelo menos uma letra igual não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras de erros representam o desvio padrão da média ($n = 4$).

A aplicação combinada de *A. niger* e biocarvão de lodo de esgoto também potencializou a disponibilização de P a partir de ST. A diferença entre as concentrações de P solúvel entre os tratamentos “fungo + biocarvão + ST” e “fungo + biocarvão” representa, conforme se espera, a quantidade de P adicionada via ST (Figura 2). Contudo, no tratamento que recebeu apenas ST, mais de 60% do P adicionado foi retido pelo solo. Latossolos apresentam alta capacidade de fixação de P, podendo reter quantidades superiores a 2 mg P g⁻¹ de solo (KER et al., 1996). Dessa forma, os resultados obtidos demonstram que a aplicação de *A. niger* e biocarvão pode aumentar a eficiência do ST, garantindo que a totalidade do P contido neste fique disponível em solução.

Por outro lado, quando o ST foi combinado com o *A. niger* ou com o biocarvão de lodo de esgoto isoladamente, observou-se diminuição na concentração de P solúvel (Figura

2). Como o ST era a única fonte de P no meio, é provável que o fungo tenha imobilizado parte do P em sua biomassa, deixando-o, assim, indisponível. No caso do biocarvão, essa diminuição na quantidade de P solúvel é provavelmente decorrente de adsorção pelo biocarvão (MENDES et al., 2014a; ZHAO et al., 2017).

Os tratamentos inoculados com *A. niger* apresentaram pH inferior quando comparados aos demais tratamentos (Figura 3). A produção de ácidos pelo fungo é o fator responsável pelos maiores níveis de P solúvel observado nesses tratamentos, uma vez que a acidificação da solução é condição que favorece a solubilização de P (BANIK; DEY, 1982; CHATLI; BERI; SIDHU, 2008). Os tratamentos onde houve adição de biocarvão apresentaram valores de pH ligeiramente superiores, provavelmente pelo consumo de prótons pelo biocarvão.

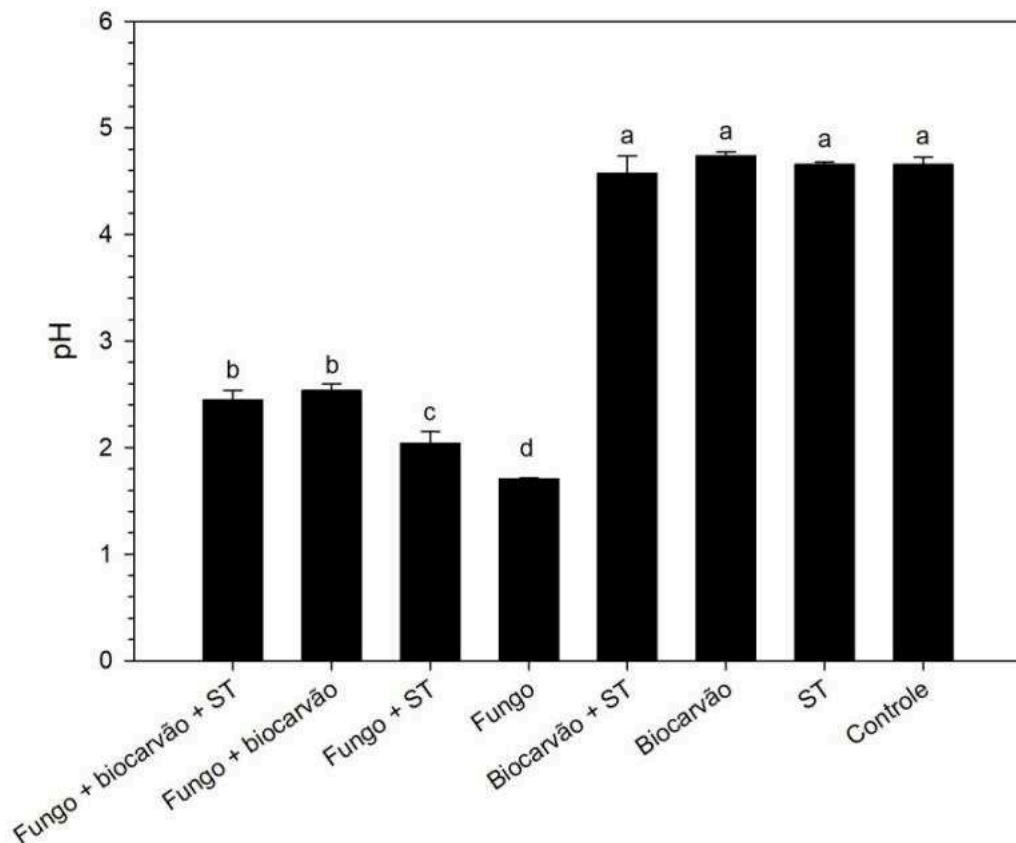


Figura 3. pH de equilíbrio após sete dias de incubação de meio de cultura contendo solo (10 g L⁻¹) sob adição ou não de *Aspergillus niger*, biocarvão de lodo de esgoto (500 °C) e superfosfato triplo (ST). Tratamentos com pelo menos uma letra igual não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras de erros representam o desvio padrão da média ($n = 4$).

A maior acidificação do meio ocorreu no tratamento onde se aplicou apenas o fungo *A. niger* (Figura 3). Isso pode estar relacionado com o estresse do fungo pela limitação de P, proporcionando maior produção de ácidos orgânicos (PAPAGIANNI, 2007).

5 CONCLUSÃO

Biocarvão de lodo de esgoto aumenta a quantidade de P solubilizado das fontes $AlPO_4$ e FN Araxá por *A. niger*. Além disso, o fungo é capaz de solubilizar P do próprio biocarvão de lodo de esgoto.

A adição de biocarvão de lodo de esgoto associada à inoculação com *A. niger* propicia liberação de P do biocarvão para solução contendo solo com alta capacidade de retenção de P. A mistura também potencializa o efeito do fertilizante ST, propiciando completa disponibilização do P contido neste. Esses dados sugerem que o fungo apresenta potencial de uso como inoculante juntamente com o biocarvão visando aumentar o aproveitamento pelas plantas do P contido no biocarvão e fertilizantes fosfatados.

6 REFERÊNCIAS

ARCAND, M. M.; SCHNEIDER, K. D. Plant- and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 4, p. 791–807, dez. 2006.

BANIK, S.; DEY, B. Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing micro-organisms. **Plant and Soil**, v. 69, n. 3, p. 353–364, 1982.

BINI, D.; LOPÉZ, M. V. Transformações microbianas do fósforo. In: CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. (Eds.). **Microbiologia do solo**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ, 2016. p. 149–167.

BRAGA, J. M.; DEFELIPO, B. V. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solo e material vegetal. **Revista Ceres**, v. 21, p. 73–85, 1974.

- CHATLI, A. S.; BERI, V.; SIDHU, B. S. Isolation and characterisation of phosphate solubilising microorganisms from the cold desert habitat of *Salix alba* Linn. in trans Himalayan region of Himachal Pradesh. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 267–273, 2008.
- CORDELL, D.; WHITE, S. Peak phosphorus: clarifying the key issues of a vigorous debate about long-term phosphorus security. **Sustainability**, v. 3, p. 2027–2049, 24 out. 2011.
- DOUMER, M. E. et al. Slow pyrolysis of different Brazilian waste biomasses as sources of soil conditioners and energy, and for environmental protection. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 113, p. 434–443, 2015.
- EFTHYMIIOU, A. et al. Augmentation of the phosphorus fertilizer value of biochar by inoculation of wheat with selected *Penicillium* strains. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 116, p. 139–147, jan. 2018.
- FAO. **FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/RFN/visualize>>. Acesso em: 31 out. 2018.
- GOLDSTEIN, A. H.; ROGERS, R. D.; MEAD, G. Mining by Microbe. **Nature Biotechnology**, v. 11, n. 11, p. 1250–1254, nov. 1993.
- HINSINGER, P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as effected by root-induced chemical changes A review.pdf. **Plant and Soil**, v. 237, p. 173–195, 2001.
- KER, J. C. et al. Adsorção de fósforo em alguns solos latossólicos: relação entre mineralogia e efeito de calagem. **Revista Ceres**, v. 43, n. 246, p. 216–226, 1996.
- KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; WANI, P. A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture — A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 27, n. 1, p. 29–43, mar. 2007.
- LEHMANN, J.; JOSEPH, S. Biochar for Environmental Management: an introduction. In: LEHMANN, J.; JOSEPH, S. (Eds.). **Biochar for Environmental Management: Science, Technology and Implementation**. 1. ed. Londres: Earthscan, 2009. p. 1–12.
- MAHDI, S. S.; HASSAN, G. I. Phosphorus availability issue- its fixation and role of phosphate. **Research Journal of Agricultural Sciences**, v. 2, n. 1, p. 174–179, 2011.
- MENDES, G. O. et al. Inhibition of *Aspergillus niger* phosphate solubilization by fluoride released from rock phosphate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 16, p. 4906–4913, 2013.
- MENDES, G. O. et al. Biochar enhances *Aspergillus niger* rock phosphate solubilization by increasing organic acid production and alleviating fluoride toxicity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 10, p. 3081–3085, 2014a.
- MENDES, G. O. et al. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 239–249, 2014b.
- NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 265–270, jan. 1999.

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 1999.

PAPAGIANNI, M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 244–263, maio 2007.

QIAN, L.; CHEN, B.; HU, D. Effective alleviation of aluminum phytotoxicity by manure-derived biochar. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 6, p. 2737–2745, 2013.

RAGHOTHAMA, K. G. Phosphate acquisition. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, n. 1, p. 665–693, jun. 1999.

RAYMOND, N. S.; JENSEN, L. S.; MÜLLER STÖVER, D. Enhancing the phosphorus bioavailability of thermally converted sewage sludge by phosphate-solubilising fungi. **Ecological Engineering**, v. 120, p. 44–53, set. 2018.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 4–5, p. 319–339, 1 out. 1999.

SCHNEIDER, K. D. et al. Comparing phosphorus mobilization strategies using *Aspergillus niger* for the mineral dissolution of three phosphate rocks. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 1, p. 366–374, jan. 2010.

SOUSA, A. A. T. C.; FIGUEIREDO, C. C. Sewage sludge biochar: effects on soil fertility and growth of radish. **Biological Agriculture & Horticulture**, v. 32, n. 2, p. 127–138, 2016.

VACCARI, D. A.; STRIGUL, N. Extrapolating phosphorus production to estimate resource reserves. **Chemosphere**, v. 84, n. 6, p. 792–797, 1 ago. 2011.

WHITELAW, M. A. A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. **Advances in Agronomy**, v. 69, p. 99–151, 1999.

ZHAO, S. et al. Adsorption of phosphorus by different biochars. **Spectroscopy Letters**, v. 50, n. 2, p. 73–80, 7 fev. 2017.