

JENIFFER KELLY CORTES AMARO

SELEÇÃO DE FUNGOS E OTIMIZAÇÃO DE MEIO DE CULTURA PARA A
PRODUÇÃO DE ÁCIDO OXÁLICO VISANDO À SOLUBILIZAÇÃO DE ROCHA
FOSFÁTICA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-
graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração
em Solos, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Gilberto de Oliveira Mendes

Coorientador

Prof. Dr. Bruno Sérgio Vieira

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2020

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

A485 2020	<p>Amaro, Jeniffer Kelly Cortes, 1994- Seleção de fungos e otimização de meio de cultura para a produção de ácido oxálico visando à solubilização de rocha fosfática [recurso eletrônico] / Jeniffer Kelly Cortes Amaro. - 2020.</p> <p>Orientador: Gilberto de Oliveira Mendes. Coorientador: Bruno Sérgio Vieira. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Agronomia. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.841 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Agronomia. I. Mendes, Gilberto de Oliveira, 1983-, (Orient.). II. Vieira, Bruno Sérgio, 1978-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Agronomia. IV. Título.</p> <p>CDU: 631</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

JENIFFER KELLY CORTES AMARO

SELEÇÃO DE FUNGOS E OTIMIZAÇÃO DE MEIO DE CULTURA PARA A
PRODUÇÃO DE ÁCIDO OXÁLICO VISANDO À SOLUBILIZAÇÃO DE ROCHA
FOSFÁTICA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-
graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração
em solos, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 15 de dezembro de 2020.

Dr. Bruno Sérgio Vieira
(coorientador)

UFU

Dr. Wedisson Oliveira Santos

UFU

Dr. Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz

UFV

Dr. Gilberto de Oliveira Mendes
ICIAG-UFU
(Orientador)

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agronomia
 Rodovia BR 050, Km 78, Bloco 1CCG, Sala 206 - Bairro Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 2512-6715/6716 - www.ppga.iciag.ufu.br - posagro@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Agronomia				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 016/2020 - PPGAGRO				
Data:	Quinze de dezembro de dois mil e vinte	Hora de início:	08:25	Hora de encerramento:	12:50
Matrícula do Discente:	11812AGR012				
Nome do Discente:	Jeniffer Kelly Cortes Amaro				
Título do Trabalho:	Seleção de fungos e otimização de meio de cultura para a produção de ácido oxálico visando à solubilização de rocha fosfática				
Área de concentração:	Solos				
Linha de pesquisa:	Uso e Recuperação de Solos e Resíduos na Agricultura				

Reuniu-se por videoconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Agronomia, assim composta: Professores Doutores: Wedisson Oliveira Santos- UFU; Bruno Sérgio Vieira - UFU; Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz - UFV; Gilberto de Oliveira Mendes - UFU orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr. Gilberto de Oliveira Mendes, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Gilberto de Oliveira Mendes, Presidente**, em 15/12/2020, às 13:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Bruno Sergio Vieira, Professor(a) do Magistério Superior**, em



15/12/2020, às 15:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz, Usuário Externo**, em 15/12/2020, às 17:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Wedisson Oliveira Santos, Professor(a) do Magistério Superior**, em 15/12/2020, às 21:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2389921** e o código CRC **2500BCBB**.

À minha família

À minha filha

Ao meu marido

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me dar forças e companhia em todos os momentos de minha vida.

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

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao professor Gilberto de Oliveira Mendes, pela orientação, paciência, pelas conversas inspiradoras, pela dedicação ao meu trabalho, pela confiança depositada em mim principalmente quando fiz estágio na docência, pelo incentivo, e por todo suporte e apoio dado quando descobri minha gravidez.

Ao professor Bruno Sérgio Vieira, pela coorientação, por estar me acompanhando desde a graduação, e por ter aceito o convite de participar da banca de defesa.

À graduanda Laura Xavier, pela disposição, pelo inestimável apoio na execução dos experimentos e análises, pela excelente convivência e pela amizade.

À doutoranda Michelle Miranda, pela disposição em realizar as análises de ácido oxálico, e pela amizade formada.

Ao técnico de laboratório Thúlio Matos, pela amizade formada nesse período, e pelas nossas conversas para descontrair.

À minha amada avó Márcia, pelos incentivos, pela força, por nunca deixar eu desistir e principalmente, por todo suporte que me deu depois que tive minha filha, pelo amor e por ser meu “porto seguro”: — Tudo que sou hoje, devo inteiramente à senhora.

À minha mãe Cláudia, pelo apoio em tudo que preciso, por sempre mostrar que a minha conquista seria um orgulho para todos.

Ao meu amado e querido bisavô Mauro Cortes (*in memorian*): —Vovô, é com lágrimas que te escrevo esse agradecimento, sei que onde o senhor estiver, está muito feliz e orgulhoso de mim, jamais irei me esquecer das nossas conversas, do quanto o senhor me incentivava a ir além, e do quanto sentia orgulho de mim.

Ao meu esposo Douglas, pelo companheirismo, por estar presente junto a mim, em todas as situações da minha vida.

À minha Duda, por me mostrar que eu posso chegar aonde eu quiser, por ser minha inspiração e a minha dose diária de força e amor.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Microrganismos	11
3.2. Meios de cultura e condições de cultivo	11
3.3. Seleção de fungos e meios de cultura para produção de ácido oxálico	11
3.4. Otimização da produção de ácido oxálico pelo fungo <i>Sclerotium rolfsii</i>	12
3.4.1. Triagem de fatores que controlam a biossíntese de oxalato	12
3.4.2. Metodologia da subida mais íngreme (Steepest ascent methodology)	13
3.4.3. Superfície de resposta:	15
3.5. Solubilização de rocha fosfática com ácido oxálico de origem microbiana	15
3.6. Métodos Analíticos	16
4. RESULTADOS	17
4.1. Seleção de fungos e meios de cultura para produção de ácido oxálico	17
4.2. Otimização da produção de ácido oxálico pelo fungo <i>Sclerotium rolfsii</i>	19
4.2.1. Triagem de fatores que controlam a biossíntese de oxalato	19
4.2.2. Metodologia da subida mais íngreme (Steepest ascent methodology)	19
4.2.3. Superfície de resposta	19
4.3. Solubilização de rocha fosfática com ácido oxálico de origem microbiana	22
5. DISCUSSÃO	23
6. CONCLUSÕES.....	26
REFERÊNCIAS	27

RESUMO

AMARO, JENIFFER KELLY CORTES. **Seleção de fungos e otimização de meio de cultura para a produção de ácido oxálico visando à solubilização de rocha fosfática**. 2020. 43 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Solos) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020.¹

Uma estratégia biotecnológica para a produção e aplicação de ácido oxálico na solubilização de rocha fosfática (RF) é descrita neste trabalho. Seis espécies fúngicas e três meios de cultura foram avaliados visando maximizar a produção de ácido oxálico. O isolado fúngico e o meio de cultura que mais se destacaram para a produção de ácido oxálico foram, respectivamente, *Sclerotium rolfsii* e o meio de cultura Tsao. As condições do meio de cultura Tsao foram otimizadas pela metodologia de superfície de resposta após triagem inicial de fatores com efeito significativo na solubilização de RF. Os níveis otimizados dos fatores foram 1 g L⁻¹ de NaNO₃; 100 g L⁻¹ de glicose; 2 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 4,5 g L⁻¹ de extrato de levedura, 25 mg L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 20 dias de incubação. Nessa configuração, 75 mmol L⁻¹ de ácido oxálico foram obtidos, caracterizando aumento de três vezes na condição não otimizada (25 mmol L⁻¹). Além disso, foi constatado que para *S. rolfsii* a adição de Mn e o tamponamento do pH não têm efeito na produção de ácido oxálico. Uma solubilização de 100% do P contido na RF de baixa solubilidade foi atingida utilizando ácido oxálico produzido por *S. rolfsii*. Assim, a utilização do fungo *S. rolfsii* para produção de ácido oxálico surge como alternativa promissora para o processo de solubilização de RF.

Palavras-chave: fósforo; microrganismos; oxalato; rocha fosfática.

¹Orientador: Gilberto de Oliveira Mendes – UFU

ABSTRACT

AMARO, JENIFFER KELLY CORTES. **Screening of fungi and optimization of culture media for producing oxalic acid for the solubilization of rock phosphate.** 2020. 43 f. Dissertation (Master Program Agronomy/Soil) Federal University of Uberlândia, Uberlândia.¹

A biotechnological strategy for the production and application of oxalic acid aiming to solubilize phosphorus from rock phosphate (RF) is described in this work. Six fungal species and three culture media were evaluated to maximize oxalic acid production. The fungal isolate and the culture medium that stood out for oxalic acid production were *Sclerotium rolfsii* and Tsao medium. The conditions of Tsao medium were optimized following response surface methodology after an initial screening of factors with significant effect on RF solubilization. The optimized levels of factors were 1 g L⁻¹ NaNO₃; 100 g L⁻¹ glucose; 2 g L⁻¹ KH₂PO₄, 4.5 g L⁻¹ yeast extract, 25 mg L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 20 days of incubation. With this combination, 75 mmol L⁻¹ oxalic acid was obtained, increasing by 3 times the production in non-optimized condition (25 mmol L⁻¹). In addition, it was found that for *S. rolfsii* the addition of Mn and pH buffering had no effect on oxalic acid production. A solubilization of 100% of the P contained in the low solubility RF was achieved using oxalic acid produced by *S. rolfsii*. Thus, the use of *S. rolfsii* to produce oxalic acid appears as a promising alternative for phosphorus solubilization from RF.

Keywords: phosphorus; microorganisms; oxalate; phosphate rock.

¹ Adviser: Gilberto de Oliveira Mendes – UFU.

1. INTRODUÇÃO

O suprimento apropriado de fósforo (P) é de fundamental importância em todas as fases do desenvolvimento das plantas (GRANT et al., 2001). Contudo, na maioria dos solos há deficiência de formas de P prontamente absorvíveis pelas plantas em função da fixação deste elemento às partículas do solo (FONTES; WEED, 1996). Isso se agrava nos solos tropicais, onde o fosfato é adsorvido quimicamente a oxi-hidróxidos de Al e Fe (FONTES; WEED, 1996). Essas e outras características fazem com que esses solos se comportem como dreno de P, competindo por este elemento com a planta. Uma das principais maneiras de superar essa escassez de P no solo, é por meio do uso de fertilizantes fosfatados solúveis. No entanto, a aplicação de fertilizantes fosfatados solúveis nos solos tropicais é realizada em dosagens superiores às que as culturas exigem, tendo em vista que grande parte do fosfato aplicado será fixado por componentes do solo. Esse excedente de fósforo aplicado é necessário, mesmo depois de três décadas de aplicações de altas doses desse nutriente em solos com alta retenção de fósforo (ROY et al., 2016).

A principal fonte de P para a produção de fertilizantes são as rochas fosfáticas (RFs), que compõem um recurso natural, não renovável. Dessa forma o uso racional e sustentável do P é essencial (CORDELL; DRANGERT; WHITE, 2009). O Brasil possui reservas de fosfato da ordem de aproximadamente 315 Mt de P_2O_5 (LIMA; NEVES, 2016). Embora o custo de produção seja menor, a utilização direta dessas RFs na adubação é ineficaz, pois apresentam solubilidade muito baixa, o que diminui sua eficiência como fertilizante.

A disponibilidade do P no solo é alterada de acordo com a ocorrência de vários processos biogeoquímicos. Dentre esses processos, ressalta-se a solubilização de fosfatos. Vários microrganismos do solo, envolvendo bactérias e fungos, apresentam a capacidade para solubilizar fosfatos através de distintos mecanismos, principalmente pela produção de ácidos orgânicos (WHITELAW, 1999). Alguns dos ácidos orgânicos produzidos por esses microrganismos que ganham destaque são os ácidos oxálico, cítrico, glicônico, itacônico e málico (DE OLIVEIRA MENDES et al., 2014; PLASSARD et al., 2011). Esses ácidos orgânicos produzidos vão atuar no material fosfático dissolvendo-o, ou atuando como quelante de cátions que acompanham o ânion fosfato, liberando este para as plantas. A eficiência desses ácidos depende de uma série de fatores como suas características químicas, a quantidade e a posição dos grupos

carboxila e hidroxila, da constante de estabilidade do complexo organometálico, da concentração do ácido, da concentração e o tipo de metais em solução e do pH da solução (KUCEY; JANZEN; LEGGETT, 1989).

Os microrganismos solubilizadores de fosfato (MSFs) podem ser aplicados no solo juntamente com fontes de P a fim de aumentar a eficiência de disponibilização de fosfato para as plantas, ou empregados em processos de biossolubilização de RF visando à produção de fertilizantes de alta solubilidade. A última alternativa possibilita o controle das variáveis que regulam a solubilização microbiológica, o que é um tanto complicado de ser obtido no solo (MENDES et al., 2015).

No decorrer da solubilização microbiana de rochas fosfáticas, juntamente com o P, são liberados vários elementos químicos devido à composição química heterogênea da RF, como o flúor por exemplo. O fluoreto (F^-) diminui o crescimento fúngico, a acidificação do meio e, portanto, limita a solubilização de P (MENDES et al., 2013). Dessa forma, foram propostas técnicas para mitigar os efeitos tóxicos do F^- na solubilização de P aumentam o rendimento do processo, tais como o uso de mutantes tolerantes a F^- (SILVA et al., 2014) ou por meio da adição de adsorventes como o biocarvão ativado, que retira F^- do meio (MENDES et al., 2014b). GOLDSTEIN; ROGERS; MEAD, (1993) sugeriram um sistema em que se fizesse uma separação espacial do MSF e da RF. Nesse sistema, são colocados em contato com a RF somente os metabólitos microbianos (ácido glicônico), e não o microrganismo. No entanto, o ácido glicônico possui baixa eficácia como solubilizador de fosfato (MENDES et al., 2020). Assim, é provável que uma modificação nesse processo com o intuito de se obter ácidos orgânicos mais efetivos, como o ácido oxálico, possa aumentar o rendimento da solubilização (MENDES et al., 2020). Para a implantação desse sistema, é preciso definir parâmetros operacionais e condições de cultivo para produção de ácido oxálico por fungos visando alto rendimento, inclusive podendo utilizar a técnica de separação espacial do MSF e da RF, com o objetivo de mitigar os efeitos de elementos liberados da RF durante a solubilização microbiana.

Nesse sentido, essa pesquisa objetivou selecionar fungos e meios de cultura para a produção de ácido oxálico visando à solubilização de apatitas (Ca-P). Especificamente, objetivou-se selecionar isolados fúngicos produtores de ácido oxálico; selecionar meios de cultura que maximizem a produção de ácido oxálico; otimizar a produção de ácido oxálico por fungos; e testar o isolado fúngico selecionado e o ácido

oxálico produzido quanto à capacidade de solubilizar rocha fosfática em diferentes sistemas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

O fósforo (P) tem função importante na fotossíntese, respiração, armazenamento e transferência de energia, divisão e crescimento celular e vários outros processos nas plantas. O P disponível para as plantas encontra-se no solo na forma de ortofosfatos, predominantemente H_2PO_4^- e HPO_4^{2-} (ARCAND; SCHNEIDER, 2006). Entretanto, na maioria dos solos há deficiência destas formas de P prontamente absorvíveis pelas plantas em função da fixação do fosfato às partículas do solo. Em muitos solos tropicais, o fosfato é adsorvido a óxidos de Fe, Al e caulinita (FONTES; WEED, 1996).

O aumento do uso de fertilizantes para se obter produtividades agrícolas satisfatórias é um considerável fator econômico e ambiental, quando se pensa em expansão da agricultura brasileira como forma de atender à crescente necessidade global por alimentos nas próximas décadas (WITHERS et al., 2018). Como grande parte dos solos brasileiros são extremamente fixadores de P, por serem solos altamente intemperizados, ricos em óxidos de Fe, Al e caulinita uma superdosagem de fertilizante fosfatado é frequentemente aplicada a fim de exceder a rápida imobilização do P inorgânico pelo solo (CUNHA; CASARIN; PROCHNOW, 2011).

Na produção de fertilizantes fosfatados, as rochas fosfáticas (RFs) são submetidas a tratamentos químicos utilizando ácidos inorgânicos fortes, especialmente o ácido sulfúrico (H_2SO_4), para solubilização do P (NAHAS; BANZATTO; ASSIS, 1990). Nos últimos anos, cerca de metade da matéria-prima utilizada na produção dos fertilizantes fosfatados aplicados no Brasil foi oriunda de importação (www.anda.org.br). Fatores como acessibilidade global à RF e a inconstância dos preços, podem aumentar consideravelmente os custos da produção de alimentos no Brasil. Por ser um país que exige grande quantidade de fertilizantes fosfatados e a forte dependência de importações, a agricultura brasileira se torna muito vulnerável a flutuações na oferta e preço da RF (WITHERS et al., 2018). Da mesma forma é bastante reconhecido que as reservas globais de RF são um recurso natural finito. Assim, caminhos estratégicos de gestão para diminuir a dependência do P importado, e utilizar o P de forma mais eficiente, se tornarão gradativamente mais importantes

para que os sistemas agrícolas brasileiros sejam sustentáveis no futuro (WITHERS et al., 2018).

Um dos caminhos para a diminuição da dependência de P importado e otimizar a utilização de fontes de fósforo nacionais tem sido através do uso dos fosfatos naturais (FN). Os FN são obtidos através da moagem da RF, passando ou não por processos físicos e físico-químicos de concentração. Em consequência da origem e do grau de substituições isomórficas, a solubilidade desses fertilizantes varia, sendo em geral baixa (FONTOURA et al., 2010). Rochas de origem sedimentar têm se mostrado promissoras como fonte de P para as plantas. Porém, devido à baixa reatividade no solo, logo uma lenta liberação de P para as plantas, não é viável a sua aplicação direta em culturas de ciclo curto (NOVAIS; SMYTH, 1999; VASSILEV et al., 2001).

No Brasil predomina o uso de fertilizantes fosfatados acidulados, que passam por tratamento químico para a obtenção do fosfato. Quando comparado com o FN, os fosfatos acidulados liberam os íons fosfato ao solo de maneira mais rápida e intensa, resultando em maior produtividade das culturas (GRANT et al., 2001). No entanto, eventualmente, ao longo de vários anos o efeito do FN pode ser semelhante ou até mesmo superior ao dos fosfatos acidulados (GRANT et al., 2001).

Para aumentar a eficiência agronômica dos FN de maneira sustentável e de baixo custo tem sido proposto o uso de microrganismos produtores de ácidos orgânicos para sua solubilização (GYANESHWAR et al., 2002), desempenhando importante papel na disponibilização de formas inorgânicas de fosfatos. Alguns estudos demonstraram que o produto obtido do tratamento de RF com microrganismos solubilizadores de fósforo (MSF) aumenta o crescimento e o acúmulo de P pelas plantas (MENDES et al., 2017). MENDES et al., (2015) constataram que o pré-tratamento de RF em fermentação em estado sólido utilizando o fungo *Aspergillus niger* aumentou significativamente o crescimento e absorção de P do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) quando comparado com a RF não tratada.

A principal forma de solubilização de P por microrganismos é a liberação de ácidos orgânicos, que atuam dissolvendo diretamente o material fosfático, ou quelando os cátions que acompanham o ânion fosfato (KUCEY; JANZEN; LEGGETT, 1989) resultando no aumento do teor de P disponível na solução do solo.

A solubilização de RF por microrganismos é um método promissor para alcançar novos produtos químicos por meio de fontes renováveis de carbono e substratos de baixo custo (JONES, 1998). Nesse tipo de sistema biotecnológico, as condições do

cultivo podem ser modificadas para potencializar na síntese de ácidos orgânicos pelo microrganismo, os quais podem ser empregados na solubilização dos minerais fosfatados. Os ácidos orgânicos produzidos por microrganismos que mais se destacam são os ácidos oxálico, cítrico, glicônico, itacônico e málico (MENDES et al., 2014; MENDES et al., 2014a; PLASSARD et al., 2011). Algumas características químicas desses ácidos irão influenciar na eficiência dos mesmos, como a constante de estabilidade do complexo ácido orgânico-metal, a concentração do ácido, a concentração e o tipo de metais em solução, o pH da solução, a quantidade e a posição dos grupos carboxila e hidroxila (KUCEY; JANZEN; LEGGETT, 1989; MENDES et al., 2014b). Geralmente, ácidos monocarboxílicos apresentam pequena capacidade de complexação (KAMINSKI; PERUZZO, 1997) e, conseqüentemente, solubilizam minerais principalmente por meio de acidólise. Em contrapartida, ácidos dicarboxílicos e tricarboxílicos conseguem solubilizar minerais tanto por acidólise quanto por complexação, o que lhes tornam eficientes até mesmo em situações que o pH é mais elevado. O ácido oxálico em comparação com os demais ácidos se mostra mais eficiente na solubilização de fosfatos devido à acidificação do meio e ao alto potencial de complexação resultante da proximidade de seus grupos carboxila (KPOMBLEKOU - A; TABATABAI, 1994). O ácido oxálico a uma concentração de 1 mmol L⁻¹ foi mais eficaz do que H₂SO₄ em liberar fósforo de duas amostras de RF, Kodjari e North Florida, além disso o acréscimo da concentração dos ácidos orgânicos de 1 para 10 mmol L⁻¹ resultou em aumento de aproximadamente 10 vezes na liberação de fósforo a partir dos FR (KPOMBLEKOU - A; TABATABAI, 1994). Esse fato também foi observado por Mendes et. al. (2020), quando testaram seis ácidos orgânicos nas concentrações de 0 a 250 mmol L⁻¹ para solubilização de oito RFs. Nesse estudo, o ácido oxálico foi o mais eficaz em todos os tratamentos. Ainda, o ácido oxálico foi melhor que o ácido sulfúrico, liberando mais P por mmol de ácido.

O ácido oxálico é produzido por vários fungos, incluindo fungos formadores de ectomicorrizas, basidiomicetos degradadores de madeira, saprófitas e fitopatógenos (DUTTON et al., 1993). Alguns dos fungos produtores de ácido oxálico estão apresentados na Tabela 1. Com inúmeras diferenças ecológicas e fisiológicas, e com numerosas hipóteses sobre a sua função no metabolismo fúngico, o ácido oxálico pode desempenhar funções na patogênese, competição, controle de nutrientes ambientais e toxinas (DUTTON; EVANS, 1996). Em alguns fungos fitopatogênicos, por exemplo, a fase inicial da infecção na planta envolve a produção e o acúmulo de grande quantidade

de ácido oxálico, que parece ser um dos maiores determinantes na patogenicidade (MAXWELL, 1970). Assim, fungos que causam doenças em culturas de importância econômica, que podem levar a perdas consideráveis de produção, podem ser utilizados alternativamente para estudos de produção de ácido oxálico, tornando-os, de alguma forma, úteis para a aplicação agrônômica.

Tabela 1. Fungos produtores de ácido oxálico

Fungo	Meio de cultura	Quantidade de Ácido oxálico produzido	Referências
<i>Aspergillus niger</i>	100 g sacarose; 1,5 g NaNO ₃ ; 0,5 g KH ₂ PO ₄ ; 0,025 g MgSO ₄ .7H ₂ O; 0,025 g KCl; 1,6 g extrato de levedura; 1 L água destilada, pH 6.	38,4 mg/mL	(STRASSER; BURGSTALLER; SCHINNER, 1994)
<i>Botryodiplodia theobromae</i>	Caldo batata dextrose (BD)	0,0737 mg/mL	(SWAIN; RAY, 2009)
<i>Botrytis cinerea</i>	20 g glicose; 2 g NaNO ₃ ; 1,5 g KH ₂ PO ₄ ; 1 g MgSO ₄ 7H ₂ O; 1 L água destilada; pH 6.	0,68 mg/mL	(GENTILE, 1954)
<i>Cristulariella pyramidalis</i>	Meio líquido	2,1 mg/mL	(KURIAN; STELZIG, 1979)
<i>Cryphonectria (Endothia) parasítica</i>	Batata dextrose e ágar (BDA) + 100 mg metionina; 1 mg biotina; 1 litro de água destilada; pH 5,6	65 g/g de micélio	(HAVIR; ANAGNOSTAKIS, 1983)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Caldo BD	0,103 mg/mL	(SWAIN; RAY, 2009)
<i>Leucostoma cincta</i>	BDA + 10mM CaCl ₂	0,005 mg/mL	(TRAQUAIR, 1988)
<i>Leucostoma personii</i>	BDA + 10mM CaCl ₂	0,005 mg/mL	(TRAQUAIR, 1988)
<i>Mycena citricolor</i>	BDA+ 2% de extrato de levedura	14,75 g/g de micélio	(RAO; TEWARI, 1987)
<i>Penicillium bilaai</i>	10 g sacarose; 3g NaNO ₃ ; 5 g KH ₂ PO ₄ ; 1 g MgSO ₄ 7H ₂ O por ml e elementos traços; 1 L água destilada; pH 6	1,0 mg/mL	(CUNNINGHAM; KUIACK, 1992)
<i>Penicillium islandicum</i>	100 g de sacarose; 1,5 g de NaNO ₃ ; 0,5 g de KH ₂ PO ₄ ; 0,025 g de MgSO ₄ .7H ₂ O; 0,025 g de KCl; 1,6 g de extrato de levedura; 1 L água destilada; pH 6	19,73 mg/mL	(MURTA, 2017)
<i>Penicillium oxalicum</i>	Meio definido (Bauer et al. 1977) com 0.5% de pectina cítrica polipectato de sódio ou carboximetil Celulose + uma solução concentrada de CaCl ₂	0,5 mg/mL	(IKOTUN, 1984)
<i>Postia placenta MAD-698</i>	Meio mínimo de Bailey (BMM; pH 4.0 to 4.4)	3,52 mg/mL	(GREEN et al., 1995)

	(Highley 1973)		
<i>Postia placenta</i> ME-20	Meio mínimo de Bailey (BMM; pH 4.0 to 4.4) (Highley 1973)	1,08 mg/mL	(GREEN et al., 1995)
<i>Gloeophyllum</i> <i>trabeum</i>	Meio mínimo de Bailey (BMM; pH 4.0 to 4.4) (Highley 1973)	3,52 mg/mL	(GREEN et al., 1995)
<i>Serpula</i> <i>incrassata</i>	Meio mínimo de Bailey (BMM; pH 4.0 to 4.4) (Highley 1973)	4,33 mg/mL	(GREEN et al., 1995)
<i>Pleurotus</i> <i>ostreatus</i>	40 g glicose; 2 g NaNO ₃ ; 1,5 g KH ₂ PO ₄ ; 1 g MgSO ₄ 7H ₂ O; 2 g extrato de levedura; 0,84 mol/L CaCO ₃ ; 1 L água destilada; pH 7	21 mg/mL	(TSAO, 1963)
<i>Rhizoctonia</i> <i>bataticola</i>	Meio definido (Bauer et al. 1977) ou BDA	26,6 mg/mL	(AMADIOHA, 1993)
<i>Rhizoctonia</i> <i>carotae</i>	Meio líquido de sais basais: 0,7 g K ₂ HPO ₄ ; 0,15g KCl; 0,4 g MgSO ₄ 7H ₂ O; 0,012 g ZnSO ₄ 7H ₂ O; 0,014 g MnSO ₄ 7H ₂ O; 0,014 g FeCl ₃ H ₂ O; 0,001 g thiamine – HCl + mistura de 10 g glicose, 10 g pectina como fonte de carbono; 1 g NH ₄ H ₂ PO ₄ , 4,12 g NH ₄ NO ₃ ou 3,5 g DL- asparagina como fonte de nitrogênio usados para fornecer uma concentração de 12,5 mM de nitrogênio; 1 L água destilada; pH 6.	12,1 mg/mL	(PUNJA, 1987)
<i>Rhizopus oryzae</i>	80 g glicose; para o estudo da relação carbono-nitrogênio, foram utilizadas as seguintes concentrações de ureia 0,1g 0,2 g 0,4 g 1 g e 2 g; 50g CaCO ₃ ; 1 L água destilada e pH 5,5.	2,02 mg/mL	(DING et al., 2011)
<i>Rhizoctonia</i> <i>solani</i>	BDA+CaCl ₂	0,041 mg/mL	(YANG; TEWARI; VERMN, 1993)
<i>Sclerotium</i> <i>cepivorum</i>	Meio polipeptato de sódio (NaPP)+ 7,5 g policpectato, 0,25 g extrato de levedura; solução de sais basais contendo 1000 mg NH ₄ NO ₃ ; 1 L água destilada; pH 6,5.	3,3 g/g de micélio	(STONE et al., 2014)
<i>Sclerotium</i> <i>glucanicum</i>	30 g sacarose; 1 g (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 1 g KH ₂ PO ₄ 7H ₂ O; 0,5 g KCl; 1 g extrato de levedura; 0,01 g FeSO ₄ ; 1 L água destilada; pH 5,5.	7,5 mg/mL	(WANG; MCNEIL, 1995)
<i>Sclerotium rolfsii</i>	Meio líquido de sais basais +	4,7 mg/mL	(PUNJA; JENKINS,

	fonte de nitrogênio 4,12 g NH ₄ H ₂ PO ₄ ; fonte de carbono (mistura) 8 g dextrose; 6 g CMC, 6 f Succinato de Na; 1,7 K ₂ HPO ₄ ; 1 L água destilada; pH 6.		1984)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	180 mg MgSO ₄ , 149 mg KCl, 1 g de NH ₄ NO ₃ ; 680 mg KH ₂ PO ₄ ; 11,3 mg ZnSO ₄ 7 H ₂ O; 13,9 mg MnSO ₄ H ₂ O; 4,0 mg CuSO ₄ e 0,5 g de extrato fermentado + fonte de carbono 73,7 mmol de D- glicose + 56 mmol de succinato de sódio; 1 L água destilada; pH 4,6	110 g/g de micélio	(DURMAN; MENENDEZ; GODEAS, 2005)
<i>Sclerotinia trifoliorum</i>	BDA + 56 mmol de succinato	0,05 mg/mL	(PIERSON; RHODES, 2016)

Para que ocorra biossíntese satisfatória de ácido oxálico, as condições do meio de cultura têm papel importante, principalmente pH e disponibilidade de nitrogênio e carbono (KUBICEK et al., 1988). A produção de ácido oxálico pelo fungo *A. niger*, por exemplo, é em decorrência da ação da enzima oxaloacetase, que catalisa a hidrólise de oxaloacetato a oxalato e acetato (BAHALOO-HOREH; MOUSAVI, 2016). O processo de biossíntese acontece inteiramente no citoplasma e não envolve o ciclo do ácido tricarboxílico (KUBICEK et al., 1988). A enzima é localizada no citoplasma e sua expressão é induzida somente em valores de pH maiores que 4, com ponto ótimo de pH 7. Já no fungo *Penicillium bilaii* a biossíntese de ácido oxálico acontece apenas durante a fase estacionária e é elevada sob condições de limitação de carbono. Porém, a limitação de N não é desejável para a acumulação desse ácido (CUNNINGHAM; KUIACK, 1992). Os principais fatores que influenciam a produção de ácido oxálico por fungos são:

Fonte de carbono: a fonte de carbono é um dos pontos críticos para a produção de ácido oxálico por fungos. Dentre as fontes de carbono que são mais utilizadas para a produção de ácido oxálico destacam-se a glicose e a sacarose, pois proporcionam maiores rendimentos de ácido oxálico do que as demais fontes de carbono (DUTTON; EVANS, 1996). O uso dessas fontes vai depender do gênero do fungo, alguns produzem mais oxalato com a sacarose como fonte de carbono, já outros produzem mais oxalato com a fonte sendo glicose. Shimazono (1955) sugeriu que um dos diferenciais entre os fungos causadores da podridão marrom e branca era a habilidade de o primeiro, em produzir ácido oxálico em meio de cultura líquido

contendo glicose como fonte de carbono. Já STRASSER et. al (1994) constataram que o fungo *A. niger* teve rendimento de 38,4 mg/mL de ácido oxálico, tendo sacarose como fonte de carbono. Alguns estudos também mostraram que alguns polissacarídeos (amido, inulina) também podem ser utilizados como fonte de carbono para a produção de oxalato por fungos (DUTTON; EVANS, 1996). CHAKRABARTI; SAMAJPATI (1983,1980) verificaram que uma cepa mutante do fungo *Sclerotium rolfsii* diferiu do tipo selvagem em usar inulina em vez de sacarose como a fonte de carbono preferida. Além disso, a biossíntese de ácido oxálico pode ser promovida em condições limitadas de carbono. CUNNINGHAM; KUIACK (1992) constataram que a produção de ácido oxálico pelo fungo *P. billai* foi promovida sob condições limitadas de carbono, produzindo aproximadamente 1,5 mg/mL de ácido oxálico.

Nitrogênio: a limitação de nitrogênio é indesejada para a acumulação do ácido oxálico (CUNNINGHAM; KUIACK, 1992), sendo a presença de alguma fonte de nitrogênio essencial para maior acúmulo desse ácido. O nitrogênio é fundamental para manter a atividade celular e prevenir a formação de conídios durante a fermentação (IKRAM-UL-HAQ et al., 2005). Em geral, o nitrato é a fonte de nitrogênio preferida dos fungos, favorecendo maior produção e, conseqüentemente, acúmulo de ácido oxálico (DUTTON; EVANS, 1996). PEDERSEN et. al (2000) observaram que a expressão do gene *oah* que codifica a oxaloacetato hidrolase é induzida quando o nitrato é usado como fonte de nitrogênio em pH 8. Lapeyrie et al. (1987) notaram que a produção de ácido oxálico do fungo micorrízico *Paxillus involutus* foi maior em micélios cultivados no meio de cultura com nitrato do que em meios com amônio.

Fósforo: assim como o nitrogênio, o P não é desejado em níveis limitantes para produção ótima de ácido oxálico (KUBICEK et al., 1988). KUBICEK et al., (1988) constataram que a adição de P e nitrogênio no meio atingiu 2,2 g/L de ácido oxálico. Além disso, o aumento da concentração de P no meio acarreta aumento da produção de biomassa fúngica, ocasionando também boa quantidade de ácido oxálico produzida. CAMESELLE et al., (1998) verificaram que durante os dois primeiros dias de incubação, o fungo *A. niger* cresceu lentamente atingindo concentração de 1 kg/m³ de ácido oxálico. Quando o meio de cultura foi suplementado com NH₄NO₃ e KH₂PO₄ depois de 10 dias a biomassa do fungo atingiu um valor de 5,8 kg / m³, alcançando produção de até 37 g/L de ácido oxálico.

Manganês: Em *A. niger* a síntese de ácido oxálico é resultado da ação da enzima oxaloacetase, que catalisa a hidrólise de oxaloacetato a oxalato e acetato. Essa enzima requer a presença de Mn^{2+} para funcionamento (PEDERSEN et. al., (2000). RUIJTER et. al., (1999) obtiveram atividade máxima da oxaloacetase à concentração de 0,2 mM de $MnCl_2$.

pH: A produção de oxalato tem sido relatado como ótimo na faixa de pH de 5 a 8 (RUIJTER et. al. 1999). Maior acúmulo de oxalato ocorre em torno de pH 6 (KUBICEK et al., 1988). Em $pH \leq 2$ a produção dos ácidos glucônico e oxálico é inibida (PAPAGIANNI, 2007). RUIJTER et. al. (1999) usaram a estirpe goxC NW131 do fungo *A. niger* e observaram que a produção de ácido oxálico foi semelhante entre pH 4 e 6 (aproximadamente 190 mM de oxalato para 110 mM de glicose), abaixo do pH 4 a produção do ácido oxálico diminuiu e quando atingiu pH de 1,5 a produção foi muito pequena (< 1 mM). Eles observaram também que a atividade da enzima oxaloacetase não foi detectada a pH 1,5.

Agitação: em geral, maior acúmulo de ácido oxálico se dá em culturas agitadas do que em culturas estacionárias (TAKAO, 1965). O regime de agitação em *shaker* está diretamente relacionado com a morfologia do fungo e isso, por sua vez, influencia a produção de ácido oxálico (DUTTON; EVANS, 1996). A velocidade de agitação para a produção de ácido oxálico pode ser alterada de acordo com o gênero do fungo. Nos fungos citados na Tabela 1 as velocidades de agitação variaram de 200 a 300 rpm. a produção de ácido oxálico é afetada pela disponibilidade de oxigênio. CUNNINGHAM; KUIACK, (1992) avaliaram a produção de ácido oxálico sob três condições de oxigênio no meio e constataram que a produção do oxalato foi promovida pela alta e média oxigenação disponível, correspondendo a 0,123 e 0,073 mmol de O_2 por litro a cada minuto, respectivamente. As concentrações de ácido oxálico produzidas foram de 2 e 1 g L^{-1} para alta e média oxigenação do meio. Já quando a disponibilidade de O_2 foi pequena (0,025 mmol $L^{-1} min^{-1}$) não houve nenhuma produção do ácido oxálico.

Temperatura de incubação: de acordo com a Tabela 1 a produção ótima de ácido oxálico para os diferentes fungos ocorre entre 25-30 °C.

Vários fatores podem estimular a produção de ácido oxálico e a solubilização de minerais fosfatados pelos microrganismos. Por isso, é de fundamental importância um estudo mais detalhado tendo em vista a otimização dos processos de solubilização de P de diferentes RFs baseado na produção de ácido oxálico por isolados fúngicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismos

Com base em levantamento bibliográfico, foram selecionados seis gêneros de fungos que têm produção expressiva de ácido oxálico: *Rhizoctonia solani* Kühn (YANG; TEWARI; VERMN, 1993); *Sclerotium rolfsii* Sacc. (PUNJA; JENKINS, 1984); *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary (DURMAN; MENENDEZ; GODEAS, 2005); *Aspergillus niger* v. Tiegh. (STRASSER; BURGSTALLER; SCHINNER, 1994); *Penicillium islandicum* Sopp. (MURTA, 2017); e *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. (TSAO, 1963). Os fungos foram mantidos a 28 °C em placas de Petri contendo meio de cultura batata dextrose ágar (BDA).

3.2. Meios de cultura líquido e condições de cultivo

Foram selecionados três meios de cultura para avaliação da produção de ácido oxálico: a) Caldo batata dextrose (BD) (Acumedia, Lansing, MI, EUA), que apresentou condições adequadas de produção de ácido oxálico para diferentes fungos, principalmente dos gêneros *Rhizoctonia* (YANG; TEWARI; VERMN, 1993) e *Sclerotinia* (DURMAN; MENENDEZ; GODEAS, 2005); b) Meio Tsao [2 g NaNO₃, 1,5 g KH₂PO₄, 1 g MgSO₄ 7H₂O, 40 g glicose, 2 g extrato de levedura, em 1 L água destilada], que demonstrou elevada produção de ácido oxálico pelo fungo do gênero *Pleurotus ostreatus* (TSAO, 1963); c) Meio Strasser [100 g sacarose, 1,5 g NaNO₃, 0,5 g KH₂PO₄, 0,025 g MgSO₄.7H₂O, 0,025 g KCl, 1,6 g extrato de levedura, 1 L água destilada], meio otimizado para produção de ácido oxálico por *A. niger* (STRASSER; BURGSTALLER; SCHINNER, 1994).

Nos experimentos de otimização (itens 3.4 e 3.5) utilizou-se o meio Tsao com modificações conforme indicado em cada experimento. Os frascos do tipo Erlenmeyer foram incubados em mesa orbital horizontal a 28 °C e velocidade de 240 rpm.

3.3. Seleção de fungos e meios de cultura para produção de ácido oxálico

Os fungos, previamente cultivados em meio de cultura BDA por 7 dias a 28 °C, foram repicados para frascos erlenmeyers de 125 mL contendo 30 mL de cada um dos três meios de cultura líquido (BD, Tsao e Strasser). Para tal, foram retirados e

transferidos para cada erlenmeyer, três quadrados de micélio fúngico (com aproximadamente 5 mm de lado) retirados das bordas de colônias. Os frascos contendo os fungos foram incubados por 15 dias em agitador orbital shaker horizontal a 240 rpm e 28 °C.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 6x3 com três repetições, sendo avaliados individualmente. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), seguida de teste de médias, com desdobramento de interações usando o teste Fisher LSD ($p < 0.05$).

3.4. Otimização da produção de ácido oxálico pelo fungo *Sclerotium rolfsii*

3.4.1. Triagem de fatores que controlam a biossíntese de oxalato

A partir dos resultados do item 3.3, o fungo *S. rolfsii* e meio Tsao foram selecionados por apresentarem maior potencial de biossíntese de ácido oxálico. Oito fatores com efeito potencial na produção de ácido oxálico por *S. rolfsii* (Tabela 2) foram analisados em um experimento fatorial fracionado de dois níveis (2^{8-4} , 1/16 fração, resolução IV) com 2 replicações do experimento completo, totalizando 32 ensaios. Cada fator foi avaliado em 2 níveis codificados como -1 (nível inferior) e +1 (nível superior) no delineamento experimental (Tabela 2). As combinações desses fatores (níveis codificados) no desenho experimental são mostradas na Tabela A1.

O experimento foi conduzido em frascos do tipo Erlenmeyer de 125 mL de volume, contendo 30 mL de cultura conforme combinações apresentadas na Tabela 2. Nas combinações com o fator pH tamponado, o meio foi preparado em tampão Tris-HCl 0,1 M, enquanto nas demais usou-se água destilada. Em ambos os casos, o pH inicial foi ajustado para 7,0. O meio foi autoclavado (121 °C, 20 min) e inoculado com três quadrados (~5 mm) de micélio do fungo *S. rolfsii* retirados das bordas de colônias crescidas em meio de cultura BDA durante 7 dias a 28 °C.

O delineamento experimental e a análise da significância (teste t, $p < 0,05$) do efeito de cada variável sobre a biossíntese de ácido oxálico foram realizados no software Minitab 18. O efeito principal de cada fator foi calculado de acordo com a equação 1 (DE ALMEIDA et al., 2014):

$$E_m = m_+ - m_- \quad (\text{Eq. 1})$$

onde E_m é o efeito principal, m_+ é a média de ácido oxálico produzido (OAp) pelo

fungo *S. rolfsii* para o nível superior de um fator, m_- é a média de OAp para o nível inferior de um fator. Os dados foram submetidos a ANOVA para verificar se eram diferentes de zero a 5% de probabilidade. Os fatores que se mostraram com efeito significativo sobre a biossíntese de oxalato foram selecionados para otimização.

Tabela 2. Avaliação de fatores controlando a biossíntese de ácido oxálico por *S. rolfsii* em meio líquido (Tsao).

Fator	Nível inferior (-1)	Nível superior (+1)	Efeito ^a
Glicose (g/L)	10	100	3,893*
NaNO ₃ (g/L)	1	3	-2,021
KH ₂ PO ₄ (g/L)	0,5	2	5,291*
Extrato de levedura (g/L)	1	3	6,208*
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	0,025	1	-3,754*
MnCl ₂ .4H ₂ O (g/L)	0	0,2	0,986
pH (7.0)	Não tamponado	Tamponado	1,815
Tempo de incubação (d)	10	20	10,268*

* Significativo pelo teste t ($p < 0,05$)

^aEfeito = $m_+ - m_-$ (m_+ e m_- representam a média de ácido oxálico produzido para o nível superior e inferior de cada fator, respectivamente)

3.4.2. Metodologia da subida mais íngreme (Steepest ascent methodology)

Após a obtenção dos fatores que se mostraram com efeitos significativos na biossíntese de oxalato por *S. rolfsii* (item 3.4.1), o cálculo do caminho na direção da biossíntese máxima esperada de ácido oxálico por *S. rolfsii* foi feito visando atingir região quase estacionária de produção (BOX; WILSON, 1951). As mudanças no nível dos fatores foram calculadas com base na mudança no nível do fator com o produto mais alto entre a unidade de variação e o coeficiente de regressão estimado com base nos dados obtidos no item 3.4.1 (Tabela 3).

Tabela 3. Metodologia da subida mais íngreme (*steepest ascent methodology*) usada para atingir região quase estacionária de biossíntese de ácido oxálico por *S. rolfsii*. Os dados usados para calcular a mudança nos níveis dos fatores foram baseados no experimento de triagem de fatores (ver Tabela 2).

	Glicose (g/L)	KH₂PO₄ (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	MgSO₄.7H₂O (g/L)	Tempo (d)
Nível base (0) ^a	55	1,25	2	0,5125	15
Unidade	45	1,5	1	0,4875	5
Coefficiente linear estimado (f_i) ^b	1,946	2,646	3,104	-1,877	5,134
Unidade x f_i	87,57	3,97	3,10	-0,92	25,67
Incremento (Δ) relativo a incremento em tempo ^c	17,1	0,77	0,60	-0,18	5,00
Caminho	55,0	1,3	2,0	0,5	15
Subida mais íngreme (<i>Steepest ascent</i>)	72,1	2	2,6	0,3	20
	89,1	2,8	3,2	0,2	25
	106,2	3,6	3,8	0	30

Os cálculos foram feitos de acordo com BOX; WILSON, (1951).

^a Relacionado ao experimento apresentado na Tabela 2, representando o valor médio entre os níveis -1 e +1.

^b Obtido no experimento apresentado na Tabela A1.

^c As mudanças no nível dos fatores foram calculadas com base na mudança no nível do fator com maior coeficiente de regressão (5,134) no experimento 3.4.1., i.e. tempo de incubação.

O experimento foi realizado em erlenmeyers de 125 mL contendo 30 mL de meio de cultura líquido de acordo com as combinações de fatores calculadas para o caminho da subida mais íngreme (Tabela 3). A variação da concentração do reagente NaNO₃ não teve efeito significativo no experimento de triagem inicial, assim foi fixado o valor no menor nível (1 g/L) neste experimento. O pH do meio foi ajustado para 7, mas sem tamponamento, visto que o tamponamento no último experimento não resultou em nenhum incremento de oxalato pelo fungo. O meio foi repicado com três quadrados (~5 mm) de micélio do fungo *S. rolfsii* retirados das bordas de colônias crescidas em meio de cultura BDA durante 7 dias a 28 °C.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos (Tabela 3) e quatro repetições por tratamento. Os dados foram submetidos a ANOVA e os tratamentos comparados por meio do teste de Tukey ($p <$

0.05), utilizando o software R com o Pacote Experimental Designs (ExpDes.pt) (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2014).

3.4.3. Superfície de resposta: para determinar o melhor ajuste do nível dos fatores na região quase estacionária foi realizado experimento para construção de superfície de resposta, no qual a combinação obtida na etapa de *steepest ascent* em que não se observou mais incremento significativo na produção de ácido oxálico foi utilizada como ponto central (codificado como 0) em um delineamento composto central (CCD) (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). Dois níveis acima do ponto central (codificado como 1 e 2) e dois níveis abaixo (codificados como -1 e -2) completaram o delineamento (Tabelas A2 e A3). Os dados da biossíntese de ácido oxálico por *S. rolfsii* obtidos foram utilizados para ajustar modelo polinomial quadrático por procedimento de regressão múltipla usando o método dos mínimos quadrados. O maior modelo adotado foi (DE ALMEIDA et al., 2014):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i x_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon_{ij} \quad (\text{Eq. 2})$$

onde Y é a concentração estimada de ácido oxálico produzido por *S. rolfsii*, i e j assumem um valor entre 1 e o número total de fatores (n), β_0 é o intercepto, β_i é o coeficiente linear, β_{ii} é o coeficiente do termo quadrático, β_{ij} é o coeficiente de interação, x_i e x_j são os níveis dos fatores e ε_{ij} é o erro experimental. Foi realizada ANOVA dos coeficientes ajustados e teste de falta de ajuste para a superfície de resposta ($p < 0,05$). Os coeficientes com p -valor maior ou igual a 0,1 foram removidos do modelo. O coeficiente de determinação (R^2) foi considerado para verificar a qualidade do ajuste do modelo. O delineamento experimental e todos os cálculos e análises foram feitos usando a opção DOE do Minitab 18.

3.5. Solubilização de rocha fosfática (RF) com ácido oxálico de origem fúngica

Para realização desse experimento foi utilizada a combinação de fatores que proporcionou maior produção de ácido oxálico (75 mmol/L de ácido oxálico) pelo fungo *Sclerotium rolfsii* no experimento de superfície de resposta: 1 g/L NaNO₃; 100 g/L de glicose; 2 g/L de KH₂PO₄, 4,5 g/L de extrato de levedura, 25 mg/L de MgSO₄.7H₂O. O experimento foi realizado em erlenmeyers de 125 mL contendo 30 mL

de meio de cultura líquido com pH ajustado para 7, mas sem tamponar. O meio de cultura foi repicado com três quadrados (~5 mm) de micélio do fungo *S. rolfii* retirados das bordas de colônias crescidas em meio de cultura batata dextrose e ágar (BDA) durante 7 dias a 28 °C. Os erlenmeyers foram incubados em agitador orbital shaker horizontal em durante 30 dias com velocidade de agitação fixada em 240 rpm. A RF foi adicionada ao meio à concentração de 10 g L⁻¹ em diferentes momentos:

- a) Uma etapa: inoculação do fungo no meio líquido junto com a RF. O meio recebeu a RF e foi autoclavado a 121 °C por 15 min. Em seguida, o meio foi inoculado com o fungo e incubado em agitador orbital shaker horizontal à temperatura de 28 °C e 240 rpm por 30 dias.
- b) Duas etapas: o fungo foi cultivado primeiro no meio líquido na ausência de RF. O cultivo foi realizado em agitador orbital shaker horizontal à temperatura de 28 °C e 240 rpm durante 20 dias. Em seguida, a RF previamente esterilizada foi adicionada à cultura e a incubação foi mantida até o 30º dia.

Frascos erlenmeyers contendo mistura estéril de RF e meio líquido não inoculados com *A. niger* foram incubados como controle. A RF foi gentilmente cedida pela Morro Verde Mineração, Pratápolis, MG, e continha 10,5 % P, com partículas < 63 µm. O experimento foi realizado com cinco repetições por tratamento. Os dados foram submetidos a ANOVA e os tratamentos comparados por meio do teste de Tukey ($p < 0.05$), utilizando o software R com o Pacote Experimental Designs (ExpDes.pt) (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2014).

3.6. Métodos Analíticos

Nos experimentos de produção de ácido oxálico, ao final do período de incubação, todas as amostras foram filtradas através de membrana de 0,2 µm a fim de garantir solução livre de partículas sólidas para análise. A biomassa fúngica retida no filtro foi transferida para cadinho e seca em estufa a 80 °C até peso constante. O filtrado foi analisado para quantificação do ácido oxálico produzido e aferição do pH. Somente no experimento de seleção de fungos e meios de cultura para biossíntese de oxalato é que foi realizada a avaliação de biomassa e pH; para os demais experimentos avaliou-se apenas a quantidade de ácido oxálico produzido pelo fungo.

A quantificação do ácido oxálico foi realizada por meio de eletroforese capilar (CE). Os eletroferogramas foram obtidos em equipamento CE com dois detectores de condutividade sem contato, compactos e de alta resolução capacitivamente acoplados (C

⁴ D) (ALVES BRITO-NETO et al., 2005), que foram posicionados em torno do capilar a 10 cm de cada extremidade. O capilar de sílica fundida utilizado em todos os experimentos foi de 50 cm de comprimento e 50 μm id \times 375 μm od (Agilent, Folsom, CA, EUA). Os comprimentos efetivos foram 10 e 40 cm para o primeiro e segundo detectores, respectivamente. Antes da utilização, o capilar foi lavado com água deionizada durante 10 min, NaOH 0,1 mol L⁻¹ durante 10 min, novamente com água deionizada durante 10 min e finalmente com BGE (tampão de corrida) durante 10 min.

No experimento de solubilização de rocha fosfática, ao final do período de 30 dias todas as amostras foram filtradas através de papel de filtro quantitativo (tamanho de poros de 25 μm) a fim de garantir solução livre de partículas para análise de pH e fósforo. O fósforo solúvel foi determinado por espectrofotometria de absorção molecular pelo método do ácido ascórbico (BRAGA; DEFELIPO, 1974).

4. RESULTADOS

4.1. Seleção de fungos e meios de cultura para produção de ácido oxálico

Maiores produções de ácido oxálico foram alcançadas pelo fungo *Sclerotium rolfsii* no meio Tsao, atingindo biossíntese de 24 mmol L⁻¹ do ácido (Figura 1a). Concentrações semelhantes de ácido oxálico foram produzidas no meio BD por *A. niger* e *S. rolfsii*. Em geral, os fungos que produziram mais ácido oxálico induziram maior acidificação do meio (Figura 1b). O meio Strasser estimulou a produção de biomassa sem, contudo, aumentar a produção de ácido oxálico (Figura 1c).

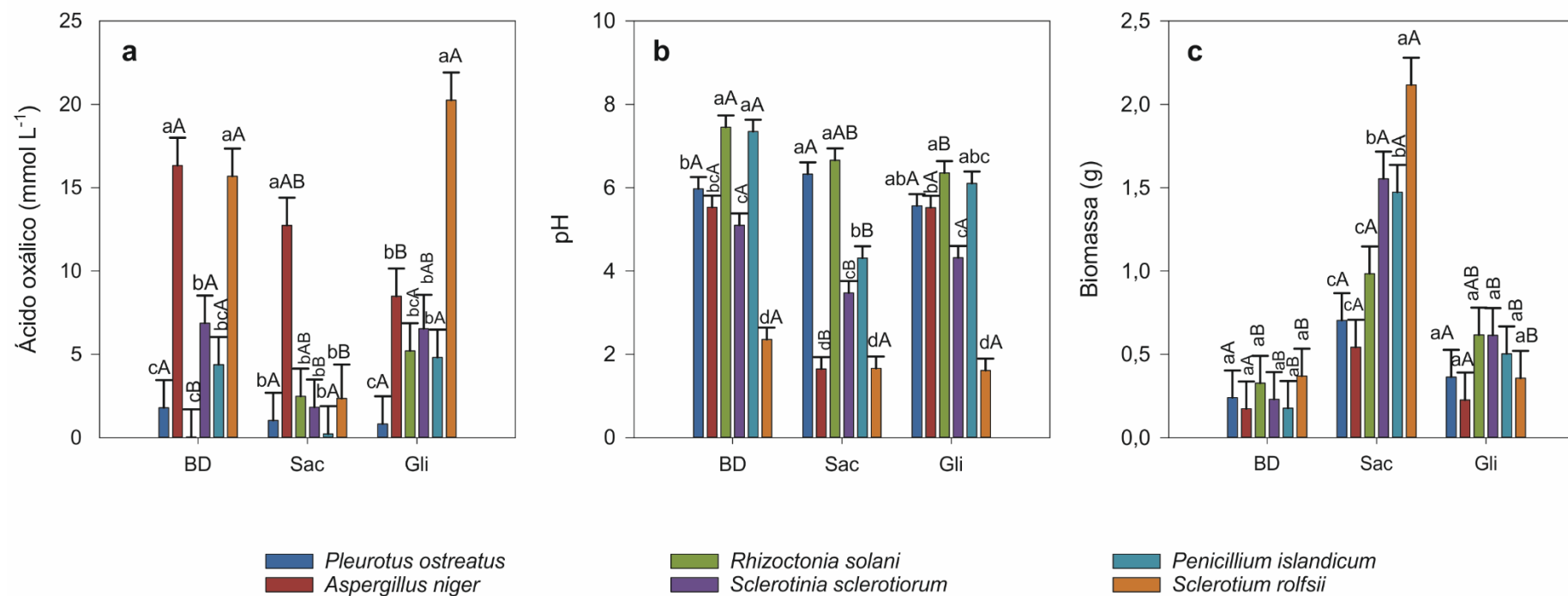


Figura 1. Biossíntese de oxalato (a), pH dos meios de cultura (b) e biomassa fúngica (c) produzidos por diferentes fungos em distintos meios de cultura. Letras minúsculas comparam diferentes fungos dentro de cada meio de cultura e letras maiúsculas comparam os meios de cultura para cada fungo (Teste Fisher LSD, $p < 0,05$).

4.2. Otimização da produção de ácido oxálico pelo fungo *Sclerotium rolfsii*

4.2.1. Triagem de fatores que controlam a biossíntese de ácido oxálico

Entre os oito fatores avaliados, somente cinco apresentaram efeito significativo sobre a produção de ácido oxálico por *S. rolfsii* (Tabela 2). Na faixa avaliada, aumentos nas doses de glicose, KH_2PO_4 , extrato de levedura e no tempo de incubação resultaram em efeito positivo na biossíntese de ácido oxálico pelo fungo *S. rolfsii*. Por outro lado, maior dose de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ diminuiu a produção de ácido oxálico. Os demais componentes (pH, NaNO_3 e $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) não apresentaram efeito significativo (Figura 2).

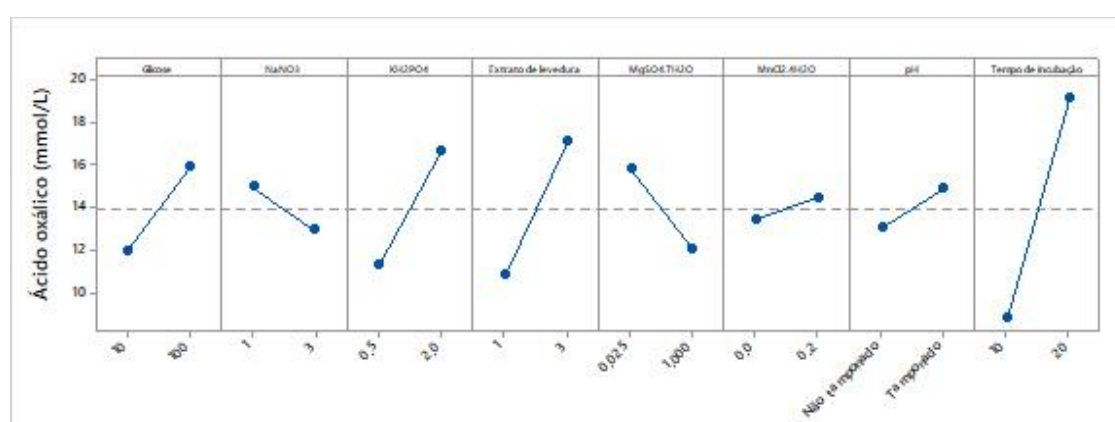


Figura 2. Ácido oxálico produzido pelo fungo *Sclerotium rolfsii* em função da dose de glicose, NaNO_3 , KH_2PO_4 , extrato de levedura, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, do tamponamento do pH e do tempo de incubação.

4.2.2. Metodologia da subida mais íngreme (*Steepest ascent methodology*)

Não houve diferença significativa entre os tratamentos no caminho calculado, o que indica que o aumento e/ou diminuição gradual dos componentes do meio de cultura e do tempo de incubação não estimularam a produção de ácido oxálico pelo fungo *S. rolfsii*, que foi em média de 25 mmol L^{-1} .

4.2.3. Superfície de resposta

Após atingir uma região quase estacionária de biossíntese de ácido oxálico por *S. rolfsii* na etapa de *steepest ascent*, um delineamento composto central (CCD) foi realizado para determinar uma faixa ótima do nível de cada fator (Tabela A2, exp. III). A análise de regressão revelou que o componente quadrático da superfície de resposta foi significativo para dois dos cinco fatores avaliados (Figura 3) sendo eles KH_2PO_4 e

tempo de incubação, possibilitando a definição de níveis ótimos desses fatores para atingir a máxima biossíntese de ácido oxálico por *S. rolfsii*. Para o fator KH_2PO_4 o nível indicado para otimizar a produção de ácido é em torno de $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de reagente (Figura 3). Para o fator tempo de incubação o ponto de máximo foi de 20 dias (Figura 3).

O componente linear se mostrou significativo para o fator extrato de levedura sugerindo que se o nível desse fator for aumentado a produção de ácido oxálico também aumenta (Figura 3). Já para o reagente $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ o modelo indicou que há biossíntese satisfatória de ácido oxálico por *S. rolfsii* quando a quantidade deste reagente foi zero, sugerindo que esse reagente interferiu de forma negativa na biossíntese de ácido por *S. rolfsii*. Além disso, houve interação com coeficiente negativo entre os fatores $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e glicose, indicando que quando a dose de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ era aumentada, o incremento na biossíntese de ácido oxálico decorrente do aumento da dose de glicose era inibido. Logo, o reagente $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ se mostrou como inibidor na interação com o reagente glicose, impedindo-o de expressar seu verdadeiro potencial na biossíntese de ácido oxálico por *S. rolfsii*. Apesar do fator glicose não ter se apresentado significativo tanto no componente linear quanto no quadrático, isso pode ser devido ao efeito negativo do $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

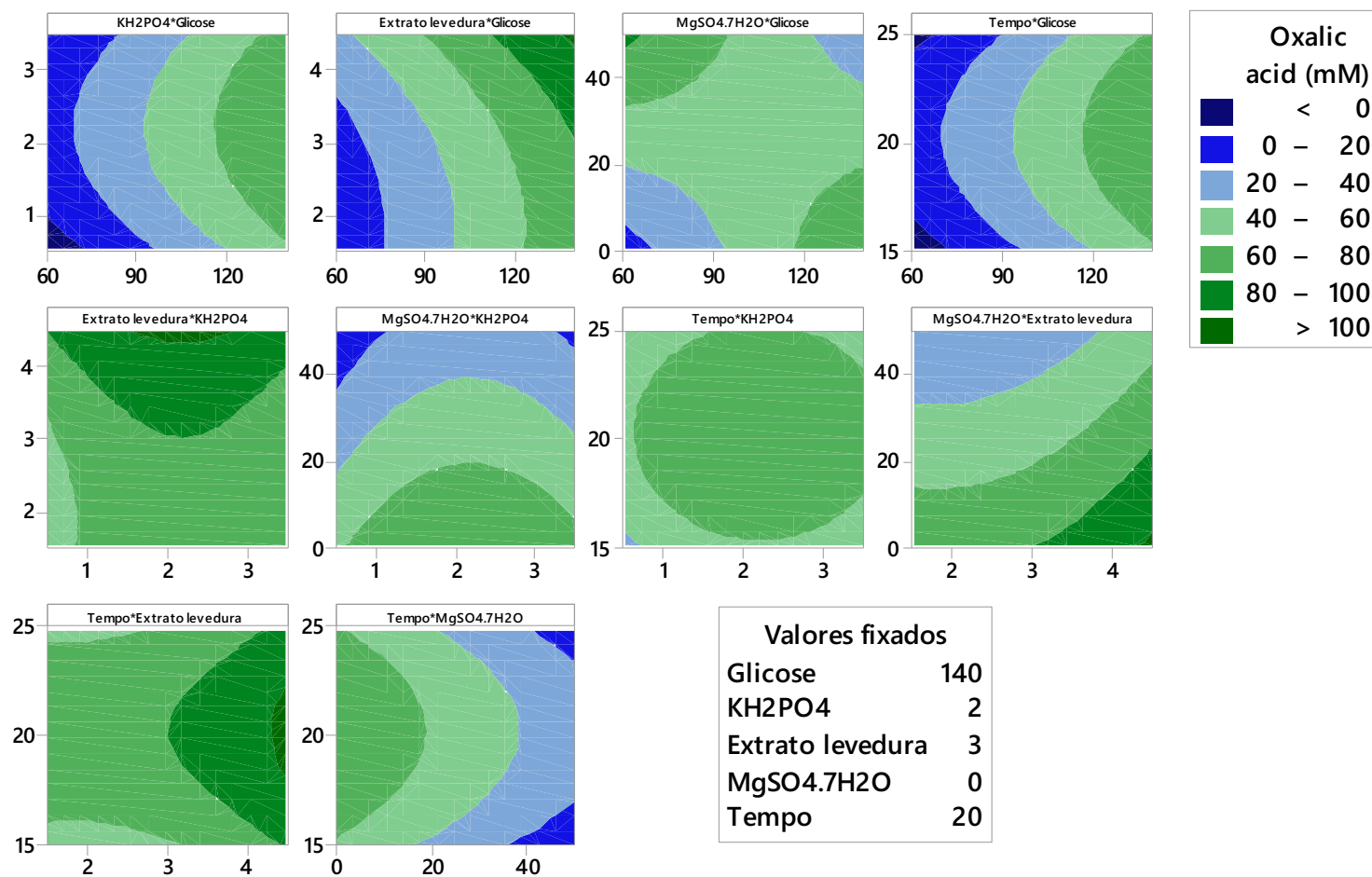


Figura 3. Níveis de ácido oxálico produzido por *Sclerotium rolfsii* em meio de cultura líquido em resposta a diferentes combinações de glicose, extrato de levedura, KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O e tempo de incubação. Em cada painel, as variáveis não apresentadas foram fixadas conforme indicado na caixa. Calculado com a equação de regressão ajustada: $\hat{Y} = -398,7 + 0,847x_1 + 34,96x_2 - 14,6x_3 + 3,320x_4 + 32,36x_5 - 7,90x_2x_2 + 4,05x_3x_3 - 0,797x_5x_5 - 0,03102x_1x_4$ (Y: ácido oxálico produzido, x_1 : nível de glicose, x_2 : nível de KH₂PO₄, x_3 : nível de extrato de levedura, x_4 : nível de MgSO₄.7H₂O, x_5 : nível de tempo de incubação).

4.3. Solubilização de rocha fosfática com ácido oxálico de origem fúngica

Os processos de solubilização da RF em uma ou duas etapas não diferiram significativamente ($p > 0,05$), alcançando valores médios de P solúvel de 1832 mg/L P (Figura 4). A linha tracejada expressa na Figura 4 aponta um valor de 455,2 mg/L P, indicando a quantidade de fósforo solúvel que já existia no meio de cultura devido à adição de KH_2PO_4 , que é um dos componentes do meio Tsao. Assim, o que está acima dessa linha indica a quantidade de P solubilizado por *S. rolfii* a partir da RF (em média, 1395 mg/L P). A quantidade de RF adicionada fornece 1050 mg/L P, indicando que o fungo conseguiu solubilizar 100% do P presente na RF.

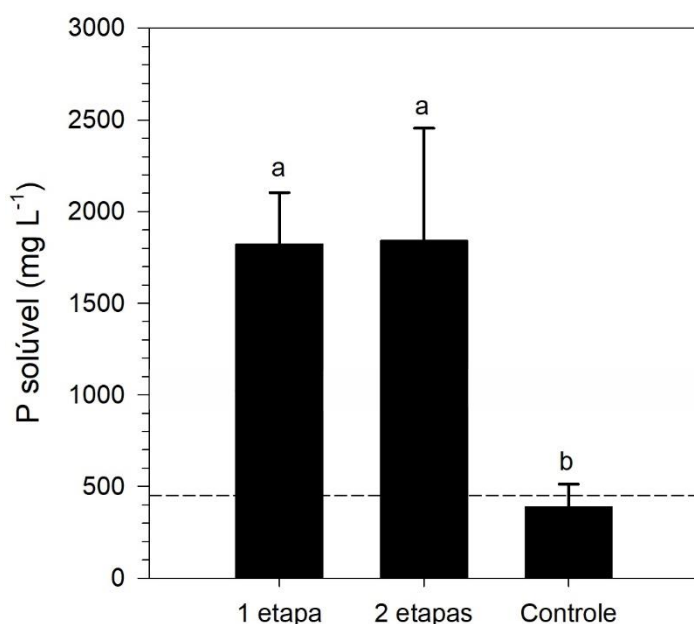


Figura 4. P solúvel em meio de cultura após 30 dias de incubação com *Sclerotium rolfii*. No tratamento em 1 etapa a rocha fosfática (RF) foi adicionada no início do período de incubação, enquanto no tratamento em 2 etapas a RF foi adicionada no 20º dia de incubação. O controle representa meio com RF não inoculado. A linha tracejada representa a dose de P solúvel adicionado como componente do meio de cultura para biossíntese de ácido oxálico. Barras de erros representam o desvio padrão ($n = 5$).

Os valores de pH do meio de cultura diferiram em cada um dos tratamentos ao final do período de incubação (Tabela 4). Para o tratamento de duas etapas o pH foi 3,4, no qual o fungo *Sclerotium rolfii* foi inicialmente cultivado na ausência de RF durante 20 dias sem o contato com a rocha fosfática. No tratamento do fungo junto com a RF (uma etapa), o menor valor foi observado (2,4). No tratamento controle sem a presença do fungo apresentou maior pH (5,3).

Tabela 4. Valores de pH ao final do período de incubação de 30 dias para solubilização de rocha fosfática por *Sclerotium rolfsii*

Tratamentos	pH
Controle	5,3 a ⁽¹⁾
Duas Etapas	3,4 b
Uma etapa	2,4 c

⁽¹⁾Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5. DISCUSSÃO

Foi atingida uma solubilização de 100% do P contido na RF de baixa solubilidade utilizando ácido oxálico produzido por *S. rolfsii*. Uma triagem inicial mostrou que a produção de ácido oxálico por *S. rolfsii* é influenciada pelos níveis de glicose, KH_2PO_4 , extrato de levedura, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e tempo de incubação. Aplicando a metodologia sequencial proposta por Box e Wilson (1951), foi possível triplicar a produção de ácido oxálico por *S. rolfsii*, aumentando a produção de 24 mmol L^{-1} para 75 mmol L^{-1} de ácido oxálico. Essa maior produção de ácido oxálico foi obtida com a combinação de 1 g L^{-1} de NaNO_3 ; 100 g L^{-1} de glicose; 2 g L^{-1} de KH_2PO_4 , $4,5 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de levedura, 25 mg L^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 20 dias de incubação (Tabela 3).

O ácido oxálico se destacou entre vários ácidos orgânicos para a solubilização de RF de diferentes origens e reatividades (MENDES et al., 2020). Utilizando ácido oxálico de origem abiótica (produzido por rota química), Mendes et al. (2020) demonstraram que os ácidos oxálico e sulfúrico, que é o reagente tradicional utilizado na solubilização de RF para a produção de fertilizantes, solubilizaram 100% do P contido em diferentes RFs. Entretanto, o ácido oxálico foi superior ao ácido sulfúrico, liberando mais P por mmol de ácido aplicado. Em média, cada mmol de ácido oxálico liberou 21 mg de P, enquanto o ácido sulfúrico solubilizou $14 \text{ mg P mmol L}^{-1}$. Esses resultados corroboraram os resultados obtidos neste trabalho, em que foi possível solubilizar 100% da RF utilizando ácido oxálico de origem biológica produzido pelo fungo *S. rolfsii* (Figura 4). Curiosamente, os dados do experimento de solubilização apresentam uma quantidade de P superior à adicionada via KH_2PO_4 e RF (Figura 4). É provável que esse excedente de P seja decorrente da mineralização de P orgânico contido no extrato de levedura que compõe o meio de cultura (HIDAYAT; ERIKSEN; WIEBE, 2006; THOMPSON; SUMMERS; COOK, 2017).

A acidificação do meio é um dos mecanismos de solubilização da apatita que está contida na RF, bem como a capacidade do oxalato de formar um complexo com o cálcio (CaC_2O_4) (MENDES et al., 2020). Todos esses fatores culminam na eficiência de solubilização do ácido oxálico, como evidenciado pelos dados desse trabalho. O valor inicial do pH do meio era 7, caindo para 2,4 após 30 dias de incubação no método de uma etapa e para 3,4 no método de 2 etapas. A diminuição do pH em ambos métodos foi devido ao crescimento do fungo e secreção de ácido oxálico. Para efeito de comparação, em condições de uma e duas etapas as tendências de mudança de pH foram semelhantes no final do período de incubação de 30 dias. Esses resultados foram semelhantes com os resultados obtidos por Vakilchap et. al. (2016), em que houve redução de pH nos métodos de uma e duas etapas.

Empregando técnicas de otimização foi possível triplicar a produção de ácido oxálico por *S. rolfsii*, alcançando concentração de 75 mmol L^{-1} . Os fatores controladores da produção de ácido oxálico foram NaNO_3 , KH_2PO_4 , glicose, extrato de levedura, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e tempo de incubação. O NaNO_3 é descrito como indutor da expressão do gene *oah* que codifica a oxaloacetato hidrolase (PEDERSEN; HJORT; NIELSEN, 2000). Entretanto, nesse trabalho o aumento da concentração de NaNO_3 acima de 1 g L^{-1} não resultou em maior produção de ácido oxálico por *S. rolfsii*. Assim, níveis de NaNO_3 inferiores àqueles do meio Tsao foram suficientes para suprir a necessidade de nitrogênio de *S. rolfsii*. Para a fonte de fósforo (KH_2PO_4) houve incremento da produção de ácido oxálico quando a dose foi aumentada para $2,0 \text{ g L}^{-1}$ (Figura 3). Assim como o nitrogênio, a fonte de fósforo não é desejada a níveis limitantes para a produção de ácido oxálico (KUBICEK et al., 1988). Esse comportamento é semelhante ao do fungo *A. niger*, em que o acúmulo de ácido oxálico se dá na presença de fonte de fósforo ($2,5 \text{ g L}^{-1}$ de KH_2PO_4) (KUBICEK et al., 1988). O $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foi utilizado como fonte de magnésio e está relacionado à ativação de enzimas fúngicas, ou seja, como cofator enzimático (ALVES, 2012). Nesse trabalho, para o fungo *S. rolfsii* a quantidade de Mg requerida foi muito pequena ou mesmo desnecessária para a biossíntese de ácido oxálico. A glicose e o extrato de levedura foram usados como fonte de carbono, que é um dos pontos críticos para a produção de ácido oxálico por fungos (DUTTON; EVANS, 1996). Além disso, extrato de levedura é uma importante fonte de aminoácidos, vitaminas, nitrogênio, carbono além de fornecer energia para o metabolismo fúngico.

Em geral, a produção ótima de ácido oxálico para diferentes fungos ocorre entre 10 a 15 dias de incubação (AMADIOHA, 1993; TSAO, 1963). Esses resultados são semelhantes ao que obtivemos nesse trabalho, em que a faixa ótima do tempo de incubação para produção de ácido oxálico por *S. rolfsii* foi em torno de 20 dias (Figura 2). Assim, a variável tempo de incubação é determinante na produção de ácido oxálico por *S. rolfsii*. Além disso, foi observado que o meio de cultura com o fungo adquire consistência de gel após 20 dias devido à produção de escleroglucanos (BAJAJ et al., 2007; CASTILLO; VALDEZ; FARIÑA, 2015; FARIÑA et al., 1998), o que é uma característica indesejável para a posterior aplicação do meio rico em ácido oxálico para solubilização da RF devido à dificuldade de misturar a RF com ácido oxálico de forma homogênea.

Apesar do Mn ser relatado como estimulante da atividade da oxaloacetase em *A. niger* (PEDERSEN; HJORT; NIELSEN, 2000), sua adição ao meio não alterou a produção de ácido oxálico por *S. rolfsii* no presente trabalho. Esse resultado difere daquele obtido para a cepa NW 131 do fungo *A. niger*, em que foi observada produção de 34 g L⁻¹ de ácido oxálico à concentração de 0,2 mmol L⁻¹ de MnCl₂ (RUIJTER; VAN DE VONDERVOORT; VISSER, 1999). Isso pode estar ligado ao fato de que no fungo *S. rolfsii*, o ácido oxálico é um produto da via do glioxilato do ciclo tricarboxílico (CHAURASIA et al., 2014) e a enzima responsável pela produção de ácido oxálico é a glioxilato desidrogenase (CHAKRABARTI; SAMAJPATI, 1983).

Os resultados dos valores de pH (Figura 2) indicam que o tamponamento do pH não influenciou a produção de ácido oxálico por *S. rolfsii*. Ao contrário do que tem sido observado para *A. niger* (STRASSER; BURGSTALLER; SCHINNER, 1994), o tamponamento do pH próximo da neutralidade não resultou em incremento na produção de ácido oxálico por *S. rolfsii*. O meio foi inicialmente tamponado para evitar o abaixamento brusco do pH, podendo afetar a produção de ácido oxálico. Apesar de estudos apontarem que a faixa ótima de produção de oxalato é entre valores de pH de 5 a 8 (RUIJTER; VAN DE VONDERVOORT; VISSER, 1999), sendo que o maior acúmulo de oxalato ocorre em torno de pH 6 (KUBICEK et al., 1988), isso não ocorreu neste trabalho.

Nossas descobertas indicam que o ácido oxálico pode ser uma opção biotecnológica efetiva para solubilizar P de RF, com potencial de substituição do ácido sulfúrico (MENDES et al., 2020). O valor de ácido oxálico necessário para atingir 100% de solubilização de RF (75 mmol L⁻¹) foi produzido pelo fungo *S. rolfsii* em meio

de cultura empregando fontes renováveis de carboidratos como glicose e extrato de levedura (AMADIOHA, 1993; STRASSER; BURGSTALLER; SCHINNER, 1994; TSAO, 1963; VAKILCHAP; MOUSAVI; SHOJAOSADATI, 2016). Atualmente, grande parte da produção industrial de ácido oxálico é baseada na oxidação de carboidratos utilizando os ácidos sulfúrico e nítrico (RIEMENSCHNEIDER; TANIFUJI, 2011). Logo, além de não ser economicamente viável, um método para solubilizar RF utilizando ácido oxálico produzido por esta via química ainda necessitaria do ácido sulfúrico. Em contrapartida, um sistema biotecnológico otimizado para a produção de ácido oxálico para solubilização de RF como o mostrado nesse trabalho pode fazer o processo se tornar viável quando comparado com o ácido sulfúrico, que é o ácido utilizado industrialmente para solubilizar o P presente na RF (MENDES et al., 2020). Nessas condições, o ácido oxálico se mostra eficaz como uma alternativa renovável e ecológica para solubilizar RF.

6. CONCLUSÕES

Isolados de *S. rolfsii* crescidos em meio Tsao se destacaram como tratamento na produção otimizada de ácido oxálico.

A produção de ácido oxálico por *S. rolfsii* é afetada pela dose de glicose, KH_2PO_4 , extrato de levedura, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e pelo tempo de incubação. A maior produção (75 mmol/L) de ácido oxálico por *S. rolfsii* é obtida com a combinação de 1 g/L NaNO_3 ; 100 g/L de glicose; 2 g/L de KH_2PO_4 , 4,5 g/L de extrato de levedura, 25 mg/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 20 dias de incubação;

Para o fungo *S. rolfsii* a adição de Mn e o tamponamento do pH não têm efeito na produção de ácido oxálico;

O isolado *S. rolfsii* se mostrou eficiente em produzir ácido oxálico bem como solubilizar RF, atingindo solubilização de 100% do P contido na RF de baixa solubilidade. Logo, a utilização do fungo *S. rolfsii* para produção de ácido oxálico surge como alternativa promissora para a solubilização de RF.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. N. et al. Optimization of endoglucanase and xylanase activities from *Fusarium verticillioides* for simultaneous saccharification and fermentation of sugarcane bagasse. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 172, n. 3, p. 1332-1346, 2014. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1002/elan.200503237>
- ALVES BRITO NETO, J. G. et al. Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 1. Fundamentals. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 17, n. 13, p. 1198-1206, 2005. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1002/elan.200503237>
- ALVES, G. F. Solubilização do fosfato de rocha por *Aspergillus niger*. [s. l.], dissertação de mestrado. **Universidade Federal de Uberlândia**, 2012.
- AMADIOHA, A. C. A synergism between oxalic acid and polygalacturonases in the depolymerization of potato tuber tissue. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, OX, Reino Unido, v. 9, n. 5, p. 599-600, 1993. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00386304>
- 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**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 791-807, 2006. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0001-37652006000400013>
- BAHALOO-HOREH, N.; MOUSAVI, S. M. Enhanced recovery of valuable metals from spent lithium-ion batteries through optimization of organic acids produced by *Aspergillus niger*. **Waste Management**, New York, v. 60 n. 1, p. 666-679 2017. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.10.034>
- BAJAJ, I. B. et al. Gellan gum: Fermentative production, downstream processing and applications. **Food Technology and Biotechnology**, [s. l.] v. 45, n. 4, p. 341–354, 2007.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 4. ed. **Campinas: Bookman**, 2010.
- BOX, G. E. P.; WILSON, K. B. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, [s. l.], v. 13, p. 1-45, 1951. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1951.tb00067.x>
- CAMESELLE, C. et al. Oxalic acid production by *Aspergillus niger*. **Bioprocess**

Engineering, [s. l.], v. 19, n. 247-252, 1998. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1007/PL00009017>

CASTILLO, N. A.; VALDEZ, A. L.; FARIÑA, J. I. Microbial production of scleroglucan and downstream processing. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, n. OCT, p. 1-19, 2015. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01106>

CHAKRABARTI, K.; SAMAJPATI, N. Effect of temperature and pH on the yield of oxalic acid by *Sclerotium rolfii*. **Folia Microbiologica**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 502-504, 1983. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02879690>

CHAURASIA, S. et al. Effect of Different Factors on Organic Acid Production by *Sclerotium rolfii*. **International Journal of Pure & Applied Bioscience**, [s. l.], v. 2, n. 6, p. 146-153, 2014.

CORDELL, D.; DRANGERT, J. O.; WHITE, S. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. **Global Environmental Change**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 292-305, 2009. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009>

CUNHA, J. F.; CASARIN, V.; PROCHNOW, L. I. Balanço de Nutrientes na Agricultura Brasileira no Período de 1988 a 2010. **Informações Agronômicas** no 135 - **International Plant Nutrition Institute (IPNI)**, [s. l.] n. 19, p. 1-7, 2011.

CUNNINGHAM, J. E.; KUIACK, C. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 5, p. 1451-1458, 1992. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.58.5.1451-1458.1992>

DING, Y. et al. Production of fumaric acid by *Rhizopus oryzae*: Role of carbon-nitrogen ratio. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 164, n. 8, p. 1461-1467, 2011. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9226-y>

DURMAN, S. B.; MENENDEZ, A. B.; GODEAS, A. M. Variation in oxalic acid production and mycelial compatibility within field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Soil Biology & Biochemistry**, [s. l.], v. 37, p. 2180-2184, 2005. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.03.017>

DUTTON, M. V. et al. Oxalate production by Basidiomycetes, including the white-rot species *Coriolus versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 5-10, 1993. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00166839>

DUTTON, M. V.; EVANS, C. S. Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. **Canadian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 42, n. 9, p. 881-895, 1996. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1139/m96-114>

FARIÑA, J. I. et al. High scleroglucan production by *Sclerotium rolfii*: Influence of

medium composition. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 20, n. 9, p. 825-831, 1998. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1005351123156>

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. ExpDes: An R Package for ANOVA and Experimental Designs. **Applied Mathematics**, [s. l.], v. 5, n. 19, p. 2952-2958, 2014. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.4236/am.2014.519280>

FONTES, M. P. F.; WEED, S. B. Phosphate adsorption by clays from Brazilian Oxisols: Relationships with specific surface area and mineralogy. **Geoderma**, [s. l.], v. 72, n. 1-2, p. 37-51, 1996. DOI: Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0016-7061\(96\)00010-9](https://doi.org/10.1016/0016-7061(96)00010-9)

FONTOURA, S. M. V. et al. Eficiência técnica de fertilizantes fosfatados em latossolo sob plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, n. 6, p. 1907-1914, 2010. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832010000600015>

GENTILE, A. C. Carbohydrate Metabolism and Oxalic Acid synthesis by *Botrytis Cinerea*. **Plant physiology**, Lancaster, v. 166, n. 4, p. 257-261, 1954. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.29.3.257>

GOLDSTEIN, A. H.; ROGERS, R. D.; MEAD, G. Mining by microbe. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 1250-1254, 1993. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt1193-1250>

GRANT, C. A. et al. The importance of early season phosphorus nutrition. **Canadian Journal of Plant Science**, [s. l.], v. 81, p. 211-224, 2001. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.4141/P00-093>

GREEN, F. et al. Induction of polygalacturonase and the formation of oxalic acid by pectin in brown-rot fungi. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 11, n. 5, p. 519-524, 1995. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00286366>

GYANESHWAR, P. et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, [s. l.] v. 245, n. 1, p. 83-93, 2002.

HAVIR, E. A.; ANAGNOSTAKIS, S. L. Oxalate production by virulent but not by hypovirulent strains of *Endothia parasitica*. **Physiological Plant Pathology**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 369-376, 1983. DOI: Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(83\)90021-8](https://doi.org/10.1016/0048-4059(83)90021-8)

HIDAYAT, B. J.; ERIKSEN, N. T.; WIEBE, M. G. Acid phosphatase production by *Aspergillus niger* N402A in continuous flow culture. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 254, n. 2, p. 324-331, 2006. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00045.x>

IKOTUN, T. Production of oxalic acid by *Penicillium oxalicum* in culture and in infected yam tissue and interaction with macerating enzyme. **Mycopathologia**, [s. l.],

v. 88, n. 1, p. 9-14, 1984. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00439288>

IKRAM-UL-HAQ et al. Optimization of nitrogen for enhanced citric acid productivity by a 2-deoxy D-glucose resistant culture of *Aspergillus niger* NG d-280. **Bioresource Technology**, New York, v. 96, n. 5, p. 645-648, 2005. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.010>

JONES, D. L. Organic acids in the rhizosphere: a critical review. **Plant and Soil**, [s. l.], v. 205, p. 25-44, 1998. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1004356007312>

KAMINSKI, J.; PERUZZO, G. Eficácia de fosfatos naturais reativos em sistemas de cultivo. Boletim Técnico nº 3, **Núcleo Regional Sul da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, v. 10, n. 3, p. 1-10, 1997.

KPOMBLEKOU, A. K.; TABATABAI, M. A. Effect of organic acid on release of phosphorus from phosphate rocks. **Soil Science**, U.S.A, v. 158, n. 6, p. 442-453, 1994. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00010694-199415860-00006>

KUBICEK, C. P. et al. Evidence for a cytoplasmic pathway of oxalate biosynthesis in *Aspergillus niger*. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 54, n. 3, p. 633-637, 1988. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.54.3.633-637.1988>

KUCEY, R. M. N.; JANZEN, H. H.; LEGGETT, M. E. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. **Advances in Agronomy**, [s. l.], v. 42, p. 199- 228, 1989. DOI: Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60525-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60525-8)

KURIAN, P.; STELZIG, D. A. Growth of and Oxalic Acid Production by *Cristulariella pyramidales* on Selected Culture Media. **Phytopathology**, [s. l.], v. 69, n. 7, p. 712-714, 1979. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1094/Phyto-69-712>

LAPEYRIE, CHILVERS, BHEM - 1987 - Oxalic acid synthesis by the mycorrhizal fungus *Paxillus involutus* (Batsch. ex Fr.) Fr. **New Phytologist**, [s. l.], v. 106, n. 1, p.139-146, 1987. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1987.tb04797.x>

LIMA, T. M.; NEVES, C. A. R. Sumário Mineral 2016. **Departamento Nacional de Produção Mineral**, v. 36, p. 141, 2016.

MAXWELL, D. P. Oxalic Acid Production by *Sclerotinia sclerotiorum* in Infected Bean and in Culture. **Phytopathology**, [s. l.], v. 60, n. 9, p. 1395- 1398, 1970. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1094/Phyto-60-1395>

MENDES, G. O. et al. Inhibition of *Aspergillus niger* phosphate solubilization by fluoride released from rock phosphate. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 79, n. 16, p. 4906-4913, 2013. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.01487-13>

MENDES, G. O. et al. Optimization of *Aspergillus niger* rock phosphate solubilization in solid-state fermentation and use of the resulting product as a P fertilizer. *Microbial Biotechnology*, Oxford, v. 8, n. 6, p. 930-939, 2015. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12289>

MENDES, G. O. et al. Fermentation liquid containing microbially solubilized P significantly improved plant growth and P uptake in both soil and soilless experiments. *Applied Soil Ecology*, [s. l.], v. 117-118, n. April, p. 208-211, 2017. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.05.008>

MENDES, G. O. et al. Oxalic acid is more efficient than sulfuric acid for rock phosphate solubilization. *Minerals Engineering*, [s. l.], v. 155, n. May, p. 106458, 2020. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2020.106458>

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, 2014a. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0656-3>

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*, Washington, v. 80, n. 10, p. 3081-3085, 2014b. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.00241-14>

MURTA, H. M. Solubilização de fosfato natural por fungos produtores de ácido oxálico. [s. l.]: **Universidade Federal de Viçosa**, 2017.

NAHAS, E.; BANZATTO, D. A.; ASSIS, L. C. Fluorapatite solubilization by *Aspergillus niger* in vinasse medium. *Soil Biology and Biochemistry*, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 1097-1101, 1990. DOI: Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(90\)90035-X](https://doi.org/10.1016/0038-0717(90)90035-X)

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J. Fósforo em solo e planta em condições tropicais. *Informações Agrônomicas*, v. 87, p. 10-11, 1999.

PAPAGIANNI, M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances*, New York, v. 25, n. 3, p. 244-263, 2007. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.01.002>

PEDERSEN, H.; HJORT, C.; NIELSEN, J. Cloning and characterization of oah, the gene encoding oxaloacetate hydrolase in *Aspergillus niger*. *Molecular and General Genetics*, Berlim, v. 263, n. 2, p. 281-286, 2000. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s004380051169>

PIERSON, P. E.; RHODES, L. H. Effect of Culture Medium on the Production of

- Oxalic Acid by *Sclerotinia trifoliorum*. **Mycological Society of America**, [s. l.], v. 84, n. 3, p. 467-469, 2016. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00275514.1992.12026161>
- PLASSARD, C. et al. Diversity in phosphorus mobilisation and uptake in ectomycorrhizal fungi. **Annals of Forest Science**, [s. l.], v. 68, n. 1, p. 33-43, 2011. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13595-010-0005-7>
- PUNJA, Z. K. Mycelial growth and pathogenesis by *R. carotae* on carrot. **Canadian Journal Plant Pathology**, [s. l.], v. 5, n. March, p. 24-31, 1987. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07060668709501907>
- PUNJA, Z. K.; JENKINS, S. F. Influence of medium composition on mycelial growth and oxalic acid production in *Sclerotium rolsfii*. **Mycological Society of America**, v. 76, n. 5, p. 947-950, 1984. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00275514.1984.12023935>
- RAO, D. V.; TEWARI, J. P. Production of Oxalic Acid by *Mycena citricolor*, Causal Agent of the American Leaf Spot of Coffee. **Phytopathology**, [s. l.], v. 77, n. 6, p. 780-785, 1987. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1094/Phyto-77-780>
- RIEMENSCHNEIDER, W.; TANIFUJI, M. Oxalic Acid. **Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, v. 25, p. 543-599, 2011. DOI: Disponível em: https://doi.org/10.1002/14356007.a18_247.pub2
- ROY, E. D. et al. The phosphorus cost of agricultural intensification in the tropics. **Nature Plants**, Londres, v. 2, n. 5, p. 2-7, 2016. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.43>
- RUIJTER, G. J. G.; VAN DE VONDERVOORT, P. J. I.; VISSER, J. Oxalic acid production by *Aspergillus niger*: An oxalate-non-producing mutant produces citric acid at pH 5 and in the presence of manganese. **Microbiology**, Londres, v. 145, n. 9, p. 2569-2576, 1999. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00221287-145-9-2569>
- SHIMAZONO, H. Oxalic acid decarboxylase, a new enzyme from the mycelium of wood destroying fungi. **The Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 321-340, 1955. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a126533>
- SILVA, U. DE C. et al. Fluoride-tolerant mutants of *Aspergillus niger* show enhanced phosphate solubilization capacity. **PLoS ONE**, São Francisco, [s. l.], v. 9, n. 10, p. e110246, 2014. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110246>
- STONE, A. H. E. et al. Production of Oxalic Acid by *Sclerotium cepivorum* during Infection of Onion. **Mycologia**, [s. l.], v. 77, n. 4, p. 526-530, 2014. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00275514.1985.12025137>
- STRASSER, H.; BURGSTALLER, W.; SCHINNER, F. High-yield production of

oxalic acid for metal leaching processes by *Aspergillus niger*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 119, n. 3, p. 365-370, 1994. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06914.x>

SWAIN, M. R.; RAY, R. C. Oxalic acid production by *Fusarium oxysporum* and *Botryodiplodia theobromae*, post-harvest fungal pathogens of yams (*Dioscorea rotundata* L.) and detoxification by *Bacillus subtilis* CM1 isolated from culturable cowdung microflora. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, [s. l.], v. 42, n. 7, p. 666-675, 2009. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03235400701288444>

TAKAO, S. Organic acid production by Basidiomycetes. I. Screening of acid-producing strains. **Applied microbiology**, Washington, v. 13, n. 5, p. 732-737, 1965. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.13.5.732-737.1965>

THOMPSON, K. A.; SUMMERS, R. S.; COOK, S. M. Development and experimental validation of the composition and treatability of a new synthetic bathroom greywater (SynGrey). **Environmental Science: Water Research and Technology**, [s. l.], v. 3, n. 6, p. 1120-1131, 2017. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C7EW00304H>

TRAQUAIR, J. A. Oxalic acid and calcium oxalate produced by *Leucostoma cincta* and *L. persoonii* in culture and in peach bark tissues. **Canadian-Journal-of-Botany**, [s. l.], v. 65, n. 9, p. 1952-1956, 1988. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1139/b87-267>

TSAO, G. T. N. Production of Oxalic Acid by a Wood-Rotting Fungus. **Applied Microbiology**, Washington, v. 11, n. 3, p. 255-255, 1963. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.11.3.255-255.1963>

VAKILCHAP, F.; MOUSAVI, S. M.; SHOJAOSADATI, S. A. Role of *Aspergillus niger* in recovery enhancement of valuable metals from produced red mud in Bayer process. **Bioresource Technology**, New York, v. 218, p. 991-998, 2016. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.059>

VASSILEV, N. et al. Immobilized cell technology applied in solubilization of insoluble inorganic (rock) phosphates and P plant acquisition. **Bioresource Technology**, New York, v. 79, n. 3, p. 263-271, 2001. DOI: Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00017-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00017-7)

WANG, Y.; MCNEIL, B. pH effects on exopolysaccharide and oxalic acid production in culture of *Sclerotium glucanicum*. **Enzyme Microbiol Technol**, [s. l.], v. 0229, n. 94, p. 124-130, 1995. DOI: Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00053-T](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00053-T)

WHITELAW, M. A. Growth Promotion of Plants Inoculated with Phosphate-Solubilizing Fungi. **Advances in Agronomy**, [s. l.], v. 69, n. C, p. 99-151, 1999. DOI: Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60948-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60948-7)

WITHERS, P. J. A. et al. Transitions to sustainable management of phosphorus in Brazilian agriculture. **Scientific Reports**, Londres, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20887-z>

YANG, J.; TEWARI, J. P.; VERMN, P. R. Calcium oxalate crystal formation in *Rhizoctonia solani* AG 2-1 culture and infected crucifer tissue: relationship between host calcium and resistance. **Mycological Research**, [s. l.], v. 97, n. 12, p. 1516-1522, 1993. DOI: Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80227-X](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80227-X)

APÊNDICE

Tabela A1. Combinações de fatores em um fatorial fracionário^a de dois níveis (2^{8-4}) com duas replicações. Cada fator foi avaliado em dois níveis codificados como -1 (nível inferior) e +1 (nível superior) no delineamento experimental (ver Tabela 2).

Ensaio	Glicose	NaNO3	KH2PO4	Extrato de levedura	MgSO4.7H2O	MnCl2.4H2O	pH	Tempo de incubação
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	+	+	+
3	-	+	-	-	+	-	+	+
4	+	+	-	-	+	+	-	-
5	-	-	+	-	+	+	+	-
6	+	-	+	-	+	-	-	+
7	-	+	+	-	-	+	-	+
8	+	+	+	-	-	-	+	-
9	-	-	-	+	+	+	-	+
10	+	-	-	+	+	-	+	-
11	-	+	-	+	-	+	+	-
12	+	+	-	+	-	-	-	+
13	-	-	+	+	-	-	+	+
14	+	-	+	+	-	+	-	-
15	-	+	+	+	+	-	-	-
16	+	+	+	+	+	+	+	+
17	-	-	-	-	-	-	-	-
18	+	-	-	-	-	+	+	+
19	-	+	-	-	+	-	+	+
20	+	+	-	-	+	+	-	-
21	-	-	+	-	+	+	+	-
22	+	-	+	-	+	-	-	+
23	-	+	+	-	-	+	-	+
24	+	+	+	-	-	-	+	-
25	-	-	-	+	+	+	-	+

26	+	-	-	+	+	-	+	-
27	-	+	-	+	-	+	+	-
28	+	+	-	+	-	-	-	+
29	-	-	+	+	-	-	+	+
30	+	-	+	+	-	+	-	-
31	-	+	+	+	+	-	-	-
32	+	+	+	+	+	+	+	+

^a Experimento I.

Tabela A2. Combinações de fatores em um delineamento composto central (CCD). Dois níveis acima do ponto central (codificado como 1 e 2) e dois níveis abaixo (codificados como -1 e -2) completaram o delineamento.

Experimento	#	Glicose (g/L) ^a	KH ₂ PO ₄ (g/L)	Extrato levedura (g/L)	MgSO ₄ .7H ₂ O (mg/L)	Tempo de incubação (d)	Ácido oxálico (mM) observado	Ácido oxálico (mM) estimado
III	1	80 (-1) ^b	1,25 (-1)	2,25 (-1)	12,5 (-1)	22,5 (1)	25,50	23,40
	2	120 (1)	1,25	2,25	12,5	17,5 (-1)	35,92	39,32
	3	80	2,75 (1)	2,25	12,5	17,5	29,36	25,99
	4	120	2,75	2,25	12,5	22,5	50,03	46,82
	5	80	1,25	3,75 (1)	12,5	17,5	28,78	35,57
	6	120	1,25	3,75	12,5	22,5	60,48	56,41
	7	80	2,75	3,75	12,5	22,5	-	43,08

8	120	2,75	3,75	12,5	17,5	68,85	59,00
9	80	1,25	2,25	37,5 (1)	17,5	38,88	41,90
10	120	1,25	2,25	37,5	22,5	34,34	31,72
11	80	2,75	2,25	37,5	22,5	40,76	49,41
12	120	2,75	2,25	37,5	17,5	33,62	34,31
13	80	1,25	3,75	37,5	22,5	-	58,99
14	120	1,25	3,75	37,5	17,5	43,16	43,89
15	80	2,75	3,75	37,5	17,5	61,74	61,58
16	120	2,75	3,75	37,5	22,5	53,75	51,40
17	60 (-2)	2 (0)	3 (0)	25 (0)	20 (0)	54,85	48,20
18	140 (2)	2	3	25	20	45,53	53,93
19	100 (0)	0,5 (-2)	3	25	20	31,38	28,25
20	100	3,5 (2)	3	25	20	34,09	38,34
21	100	2	1,5 (-2)	25	20	48,33	45,55
22	100	2	4,5 (2)	25	20	70,92	74,82
23	100	2	3	0 (-2)	20	37,50	45,61
24	100	2	3	50 (2)	20	58,58	56,52

25	100	2	3	25	15 (-2)	29,87	28,69
26	100	2	3	25	25 (2)	31,30	33,60
27	100	2	3	25	20	56,24	51,07
28	100	2	3	25	20	55,81	51,07
29	100	2	3	25	20	60,90	51,07
30	100	2	3	25	20	55,44	51,07
31	100	2	3	25	20	46,93	51,07
32	100	2	3	25	20	37,75	51,07

^a Os valores são expressos em gramas de cada reagente em um litro de água destilada.

^b Os valores entre parênteses são os níveis codificados.