



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



**Biossolubilização de fósforo proveniente de
concentrado de rocha fosfática por
Trichoderma harzianum em diferentes
biorreatores**

Bruna Vieira Cabral

UBERLÂNDIA – MG
AGOSTO DE 2016



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



Biossolubilização de fósforo proveniente de concentrado de rocha fosfática por *Trichoderma harzianum* em diferentes biorreatores

Bruna Vieira Cabral

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vicelma Luiz Cardoso (UFU)
Coorientador: Prof^º. Dr^º Elóizio Júlio Ribeiro (UFU)

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

UBERLÂNDIA – MG
AGOSTO DE 2016

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

C117b Cabral, Bruna Vieira, 1986-
2016 Biossolubilização de fósforo proveniente de concentrado de rocha
fosfática por *Trichoderma harzianum* em diferentes biorreatores /
Bruna Vieira Cabral. - 2016.
f. : il.

Orientadora: Vicelma Luiz Cardoso.
Coorientador: Elóizio Júlio Ribeiro.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Engenharia Química.
Inclui bibliografia.

1. Engenharia química - Teses. 2. Fósforo - Teses. 3. Solubilização
- Teses. 4. Fungos - Biotecnologia - Teses. I. Cardoso, Vicelma Luiz.
II. Ribeiro, Elóizio Júlio. III. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

CDU: 66.0

TESE DE DOUTORADO DE BRUNA VIEIRA CABRAL SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 22/08/2016.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Vicelma Luiz Cardoso
(Orientadora - PPGEQ/UFU)



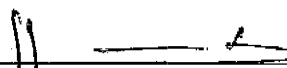
Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro
(Co-orientador – PPGEQ/UFU)



Prof. Dr. Miriam Maria de Resende
(PPGEQ/UFU)



Prof. Dr. Claudia Maria Tomás Melo
(IFTM – Câmpus Uberlândia)



Prof. Dr. Jonas Contiero
(IB/UNESP – Câmpus Rio Claro)



Prof. Dr. Juliana de Souza Ferreira
(PPGEQ/UFU)

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus amados e admiráveis pais, pelos exemplos constantes de dedicação, perseverança e crença.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Solange e Joselias, que se dedicaram constantemente a minha formação educacional e pessoal. Pais que me inspiram e incentivam diariamente a almejar o crescimento pessoal e bem estar alheio. Exemplos de esforço, dedicação e caráter aos quais sou e serei extremamente grata pelo amor, carinho e criação recebidos de maneira tão singular. Ao meu irmão, por ter se tornado uma inspiração em todas as decisões tomadas. A Mônica, pelo carinho e atenção tão discretos e singelos que fizeram toda a diferença. A toda minha família que através de simples gestos me apoiaram e acreditaram no meu esforço.

À Professora Vicelma Luiz Cardoso pela orientação, dedicação e acompanhamento em cada etapa. Obrigada pela disposição incessante e admirável, pelo auxílio e apoio diários. Obrigada por cada dia de trabalho, pela confiança, pelo esforço e por cada gesto, os levarei por toda vida.

À Professora Miriam Maria de Resende um agradecimento especial, pelos valiosos ensinamentos e ajuda no fechamento deste trabalho. Ao professor Eloízio Júlio Ribeiro pelo carinho inigualável e presença desde o início de minha vida acadêmica.

À banca examinadora por ter aceito o convite.

A todos os professores da FEQ que contribuíram direta ou indiretamente em minha formação, contribuindo com informações valiosas para a realização deste estudo. Aos amigos do NUCBIO, Larissa, Taciana, Felipe Moreira, Larissa Sousa, Janaina, Magno, Verônica, Camila, Taís, Grasielle, Marília, Letícia, Thamirys, Natália, Petrus que compartilharam de anseios, dificuldades, alegrias e conquistas durante esses anos que deixarão saudades eternas em minha vida. Aos meus amigos Daniel Pereira e Ana Carolina pelo carinho e paciência, que contribuíram imensamente para o meu bem estar.

Aos funcionários da FEQUI: Ione, Roberta, Ulysses, Silvino e Cecília pela colaboração.

À Vale Fertilizantes pela doação do concentrado de rocha fosfática e permissão da coleta de amostras do microrganismo na unidade Complexo de Mineração carbonatítico de Araxá. À Universidade Federal do Triângulo Mineiro em especial ao Departamento de Engenharia Ambiental pela concessão do afastamento para conclusão deste trabalho. Ao programa de pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade concedida.

Sumário

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO 1.....	15
INTRODUÇÃO	15
CAPÍTULO 2.....	19
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Nutrição Vegetal	19
2.2 Fósforo.....	20
2.2.1 Cenário brasileiro	21
2.3 Fertilizantes.....	24
2.3.1 Características e cenário do fertilizante químico no Brasil	24
2.3.2 Biofertilizante	25
2.4 Interações entre microrganismos e plantas.....	25
2.5.1 Microrganismos solubilizadores de fósforo	27
2.5.2 Mecanismos de solubilização	29
2.5.3 Fungos solubilizadores	31
2.6 Configurações de Biorreatores.....	32
2.6.1 Biorreatores do tipo Air-lift.....	32
2.6.2 Biorreatores do tipo Tambor Rotativo.....	33
CAPÍTULO 3.....	35
MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Material	35
3.1.1 Rocha fosfática	35
3.1.2 Biomassa	36
3.2 Métodos	36
3.2 Testes preliminares.....	39
3.2.1 Isolamento e repicagem	39
3.2.2 Avaliação preliminar da capacidade de biossolubilização	40
3.3 Testes em reatores cônicos de bancada	42
3.3.1 Avaliação da concentração de concentrado de rocha fosfática em meio reacional líquido.....	42
3.3.2 Avaliação da concentração celular e de substrato em meio reacional líquido	42
3.3.3 Avaliação da concentração celular e de concentrado de rocha fosfática em meio reacional líquido	42
3.4 Biorreator do tipo air-lift.....	43
3.4.1 Influência da vazão de ar por unidade de volume (Q/V) na solubilização de fósforo em biorreator do tipo air-lift	45
3.4.2 Influência da temperatura na solubilização de fósforo em reator do tipo air-lift	45
3.4.3 Influência de reciclo do meio reacional em reator air-lift	46
3.4.3.1 Influência da concentração celular no processo de biossolubilização empregando reciclo do meio reacional.....	46
3.4.4 Estudo da biossolubilização de fósforo diante da reposição de glicose em reator air-lift com reciclo de meio reacional	46
3.4.4.1 Influência conjunta da concentração de glicose e concentrado de rocha fosfática na biossolubilização de fósforo em reator do tipo air-lift com reposição de substrato	47
3.5 Combinação entre reator do tipo air-lift e reatores cônicos de bancada	47

3.5.1 Biossolubilização sequencial em reator do tipo air-lift e reatores cônicos de bancada	47
3.5.1.1 Influência da concentração celular e concentrado de rocha fosfática na biossolubilização de fósforo em reatores cônicos de bancada	47
3.5.1.2 Influência do tempo reacional em reator do tipo air-lift, da concentração de glicose e de concentrado de rocha fosfática na biossolubilização de fósforo em reatores cônicos de bancada	48
3.5.2 Produção de ácidos orgânicos em reator do tipo air-lift e biossolubilização de fósforo em reatores cônicos de bancada	48
3.5.2.1 Influência da concentração de glicose no meio reacional produzido em biorreator do tipo air-lift	48
3.5.2.2 Avaliação da adição de novo inóculo ao meio reacional produzido em biorreator do tipo air-lift no segundo dia de processo	48
3.5.2.3 Influência da concentração de glicose e de concentrado de rocha fosfática na biossolubilização de fósforo em meio reacional produzido no segundo dia de processo do biorreator do tipo air-lift	49
3.5.3.4 Influência da concentração de glicose na biossolubilização de fósforo em meio reacional produzido no terceiro e primeiro dias de processo do biorreator do tipo air-lift	49
3.6 Reatores do tipo tambor rotativo	49
3.6.1 Influência da relação massa de biomassa/volume de meio sintético líquido no processo de biossolubilização de fósforo em reatores do tipo tambor rotativo	49
3.6.2 Influência do nível da aeração úmida no processo de biossolubilização de fósforo em reatores rotativos	51
3.7 Metodologia analítica	51
3.7.1 Determinação de fósforo solúvel	51
3.7.1.2 Fósforo Solúvel	51
3.7.1.3 Método colorimétrico	52
3.7.2 Determinação de concentração celular	52
3.7.3 Determinação da concentração de metabólitos	53
CAPÍTULO 4	54
RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1 Isolamento e repicagem	54
4.2 Avaliação preliminar da capacidade de biossolubilização	54
4.3 Testes em reatores cônicos de bancada	56
4.3.1 Avaliação da concentração de concentrado de rocha fosfática em meio reacional líquido	56
4.3.2 Avaliação da concentração celular e de substrato em meio reacional líquido	57
4.3.3 Avaliação da concentração celular e de concentrado de rocha fosfática em meio reacional líquido	59
4.4 Biorreator do tipo air-lift	62
4.4.1 Influência da vazão de ar por unidade de volume (Q/V) na solubilização de fósforo em reator air-lift	62
4.4.2 Influência da temperatura na solubilização de fósforo em reator air-lift	65
4.4.3 Influência de reciclo do meio reacional em reator air-lift	69
4.4.3.1 Influência da concentração celular no processo de biossolubilização empregando reciclo do meio reacional	73
4.4.4 Estudo da biossolubilização de fósforo diante da reposição de glicose em reator air-lift com reciclo de meio reacional	76

4.4.4.1 Influência conjunta da concentração e reposição de glicose e concentrado de rocha fosfática na biossolubilização de fósforo em reator do tipo air-lift.....	76
4.5 Combinação entre reator do tipo air-lift e reatores cônicos de bancada.....	83
4.5.1 Biossolubilização contínua em reator do tipo air-lift e reatores cônicos de bancada..	83
4.5.1.1 Influência da concentração celular e concentrado de rocha fosfática na biossolubilização de fósforo em reatores cônicos de bancada	83
4.5.1.2 Influência do tempo reacional em reator do tipo air-lift, da concentração de glicose e de concentrado de rocha fosfática na biossolubilização de fósforo em reatores cônicos de bancada.....	89
4.5.2 Produção de ácidos orgânicos em reator air-lift e biossolubilização de fósforo em reatores cônicos de bancada	99
4.5.2.1 Influência da concentração de glicose no meio reacional produzido em biorreator do tipo air-lift.....	100
4.5.2.2 Avaliação da adição extra de novo inóculo ao meio reacional produzido em biorreator do tipo air-lift no segundo dia de processo	103
4.5.2.3 Influência da concentração de glicose e de concentrado de rocha fosfática na biossolubilização de fósforo em meio reacional produzido no segundo dia de processo do biorreator do tipo air-lift.....	105
4.5.3.4 Influência da concentração de glicose na biossolubilização de fósforo em meio reacional produzido no terceiro e primeiro dias de processo do biorreator do tipo air-lift	111
4.6 Reatores do tipo tambor rotativo.....	115
4.6.1 Influência da relação massa de biomassa/volume de meio sintético líquido no processo de biossolubilização de fósforo em reatores do tipo tambor rotativo.....	115
4.6.2 Influência do nível aeração úmida no processo de biossolubilização de fósforo em reatores rotativos.....	122
CAPÍTULO 5.....	130
CONCLUSÕES.....	130
CAPÍTULO 6.....	132
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	132
CAPÍTULO 7.....	133
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
APÊNDICE	147

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Meio sintético-seletivo sólido (PIKOVSKAYA, 1948).....	40
Tabela 3.2 - Meio sintético seletivo modificado líquido (SAMPAIO <i>et al.</i> 2003).	41
Tabela 4.1 – Resultados da avaliação preliminar da capacidade de biossolubilização para os 16 Isolados Fúngicos empregando meio seletivo modificado líquido.....	55
Tabela 4.2 – Consolidação dos resultados obtidos neste trabalho empregando diferentes configurações de biorreatores	128

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1- Concentrado de rocha fosfática.....	36
Figura 3.2 – Fluxograma dos ensaios de coleta, isolamento e avaliação preliminar da capacidade de biossolubilização de isolados fúngicos.....	36
Figura 3.3 – Fluxograma dos ensaios realizados em biorreator air-lift	37
Figura 3.4 – Fluxograma dos ensaios realizados com combinação entre biorreator air-lift e reatores cônicos de bancada.....	38
Figura 3.5 – Fluxograma dos ensaios realizados em biorretor rotativo.....	39
Figura 3.6- Avaliação preliminar da capacidade de biossolubilização dos 16 isolados fúngicos em meio sintético seletivo modificado líquido em reatores cônicos de bancadas a $27 \pm 3^{\circ}\text{C}$ após 12 dias.	41
Figura 3.7- Esquema do reator air-lift 1 – Reciclo do meio reacional; 2 e 5 – Serpentina. 3 – Saída de gás; 4 – Amostrador; 6 – Cilindro interno; 7 – Placa de porosa (aeração ascendente).....	44
Figura 3.8 – Unidade do biorreator air-lift	44
Figura 3.9 - Reator do tipo tambor rotativo	50
Figura 4.1- Isolado fúngico 8 – um dos fungos previamente selecionados para este estudo...	54
Figura 4.1- Avaliação da influência concentração de concentrado de rocha fosfática em meio reacional líquido em reatores cônicos de bancada.	57
Figura 4.2- Avaliação da concentração celular em meio reacional líquido em reatores cônicos de bancada. Concentração de glicose: 10 g/L.....	58
Figura 4.3- Avaliação da concentração celular em meio reacional líquido. Concentração de glicose: 20 g/L.	58
Figura 4.4- Avaliação da influência da concentração celular em meio reacional líquido em reatores cônicos de bancada. Concentração de glicose: 5g/L; concentrado de rocha fosfática: 5 g/L.	60
Figura 4.5- Avaliação da influência da concentração celular em meio reacional líquido em reatores cônicos de bancada. Concentração de glicose: 5g/L; concentrado de rocha fosfática: 10 g/L.	60
Figura 4.6 – Concentração celular ($\circ$) e consumo de glicose ($\square$) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM)	62

- Figura 4.7 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM) 63
- Figura 4.8 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 1,0 VVM) 64
- Figura 4.9 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 1,0 VVM) 64
- Figura 4.10 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator tipo air-lift a $36 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM) 66
- Figura 4.11 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator tipo air-lift a $36 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, Concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM) 66
- Figura 4.12 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator tipo air-lift a $40 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, Concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM). 67
- Figura 4.13 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator tipo air-lift a $40 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, Concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM) 67
- Figura 4.14 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, Concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM, Concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, reciclo do meio reacional: 200 mL/min) 70
- Figura 4.15 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, reciclo do meio reacional: 200 mL/min) 70
- Figura 4.16 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM, Reciclo do meio reacional: 400 mL/min) 71
- Figura 4.17 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração

- celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM, Reciclo do meio reacional: 400 mL/min) 72
- Figura 4.18 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, Concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM, Concentração celular inicial: 2,2 g/L, reciclo do meio reacional: 200 mL/min) 73
- Figura 4.19 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, Concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM, Concentração celular inicial: 2,2 g/L, reciclo do meio reacional: 200 mL/min) 74
- Figura 4.20 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, Concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM, Concentração celular inicial: 0,5 g/L, reciclo do meio reacional: 200 mL/min) 75
- Figura 4.21 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, Concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM, Concentração celular inicial: 0,5 g/L, reciclo do meio reacional: 200 mL/min) 75
- Figura 4.22 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM, reciclo do meio reacional: 200 mL/min, reposição de Glicose)..... 76
- Figura 4.23 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM, reciclo do meio reacional: 200 mL/min, reposição de Glicose) 77
- Figura 4.24 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM, reciclo do meio reacional: 200 mL/min, reposição de Glicose)..... 77
- Figura 4.25 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, Concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM, reciclo do meio reacional: 200 mL/min, reposição de Glicose) 78
- Figura 4.26 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 15 g/L, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L,

- concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM, reciclo do meio reacional: 200 mL/min, reposição de Glicose)..... 78
- Figura 4.27 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (Concentração de glicose: 15 g/L, Cconcentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM, reciclo do meio reacional: 200 mL/min, reposição de Glicose) 79
- Figura 4.28 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 10 g/L, 0,5 VVM, reciclo do meio reacional: 200 mL/min, reposição de Glicose) 81
- Figura 4.29 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 10 g/L, 0,5 VVM, reciclo do meio reacional: 200 mL/min, reposição de Glicose) 81
- Figura 4.30 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 10 g/L, 0,5 VVM, reciclo do meio reacional: 200 mL/min, reposição de Glicose) 82
- Figura 4.31 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 10 g/L, 0,5 VVM, reciclo do meio reacional: 200 mL/min, reposição de Glicose) 82
- Figura 4.32 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos de bancada **sem adição extra de inóculo e concentrado de rocha fosfática** (Concentração de glicose: 5g/L) empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L) 84
- Figura 4.33 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos de bancada **sem adição extra de inóculo e concentrado de rocha fosfática** (Concentração de glicose: 5g/L) empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L)..... 85
- Figura 4.34 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos de bancada **sem adição extra de inóculo** (Concentração de glicose: 5g/L, concentrado de

- rocha fosfática: 5g/L) empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, Concentrado de rocha fosfática: 5 g/L) 86
- Figura 4.35 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos de bancada **sem adição extra de inóculo** (Concentração de glicose: 5g/L, concentrado de rocha fosfática: 5g/L) empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L) 86
- Figura 4.36 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos de bancada **sem adição de concentrado de rocha fosfática** (Concentração de glicose: 5g/L, concentração celular inicial: $3,1 \pm 0,5$ g/L) empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L)..... 87
- Figura 4.37 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos de bancada **sem adição de concentrado de rocha fosfática** (Concentração de glicose: 5g/L, concentração celular inicial: $3,1 \pm 0,5$ g/L) empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L) 88
- Figura 4.38 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos de bancada com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no quarto dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L)..... 89
- Figura 4.39 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos de bancada com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no quarto dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L) 90
- Figura 4.40 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos de bancada com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no quarto dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L)..... 91
- Figura 4.41 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos de bancada com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no quarto dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$

- (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L) 91
- Figura 4.42 – Concentração celular ($\circ$) e consumo de glicose ($\square$) em reatores cônicos de bancada com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no quarto dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 10 g/L)..... 92
- Figura 4.43 – Concentração de fósforo ($\blacksquare$) e ácidos orgânicos (ácido láctico: $\bullet$, ácido acético: $\blacktriangle$) em reatores cônicos de bancada com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no quarto dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 10 g/L) 93
- Figura 4.44 – Concentração celular ($\circ$) e consumo de glicose ($\square$) em reatores cônicos de bancada com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no quarto dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 10 g/L)..... 94
- Figura 4.45 – Concentração de fósforo ($\blacksquare$) e ácidos orgânicos (ácido láctico: $\bullet$, ácido acético: $\blacktriangle$) em reatores cônicos de bancada com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no quarto dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 10 g/L) 94
- Figura 4.46 – Concentração celular ($\circ$) e consumo de glicose ($\square$) em reatores cônicos de bancada com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no terceiro dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,0 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L)..... 96
- Figura 4.47 – Concentração de fósforo ($\blacksquare$) e ácidos orgânicos (ácido láctico: $\bullet$, ácido acético: $\blacktriangle$) em reatores cônicos de bancada com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no terceiro dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,0 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L) 97
- Figura 4.48 – Concentração celular ($\circ$) e consumo de glicose ($\square$) em reatores cônicos de bancada com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no terceiro dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, Concentrado de rocha fosfática: 5 g/L)..... 97

- Figura 4.49 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos de bancada com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no terceiro dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, Concentrado de rocha fosfática: 5 g/L)..... 98
- Figura 4.50 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,5 \pm 0,5$ g/L, 0,5 VVM, reciclo: 200 mL/min, reposição de glicose)..... 100
- Figura 4.51 – Concentração de ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,5 \pm 0,5$ g/L 0,5 VVM, reciclo: 200 mL/min, reposição de glicose)..... 101
- Figura 4.52 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,5 \pm 0,5$ g/L, 0,5 VVM, reciclo: 200 mL/min, reposição de glicose)..... 101
- Figura 4.53 – Concentração de ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,5 \pm 0,5$ g/L, 0,5 VVM, reciclo: 200 mL/min, reposição de glicose)..... 102
- Figura 4.54 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos de bancada sem adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no segundo dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $1,5 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5g/L)..... 103
- Figura 4.55 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos de bancada sem adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no segundo dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $1,5 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5g/L) 104
- Figura 4.56 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos de com troca de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no segundo dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5g/L)..... 104
- Figura 4.57 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos de com troca de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no segundo dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5g/L) 105

- Figura 4.58 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no segundo dia de processo a $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5g/L)..... 106
- Figura 4.59 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no segundo dia de processo a $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5g/L)..... 106
- Figura 4.60 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no segundo dia de processo a $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5g/L)..... 107
- Figura 4.61 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no segundo dia de processo a $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5g/L)..... 107
- Figura 4.62 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no segundo dia de processo a $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (Concentração de glicose: 15 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5g/L)..... 108
- Figura 4.63 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no segundo dia de processo a $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (Concentração de glicose: 15 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5g/L)..... 108
- Figura 4.64 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no segundo dia de processo a $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 10 g/L)..... 109
- Figura 4.65 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no segundo dia de processo a $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (Concentração de

- glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 10 g/L)..... 110
- Figura 4.66 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no terceiro dia de processo a $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L)..... 112
- Figura 4.67 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no terceiro dia de processo a $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L)..... 112
- Figura 4.68 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no terceiro dia de processo a $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L)..... 113
- Figura 4.69 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no terceiro dia de processo a $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L)..... 113
- Figura 4.70 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator do rotativo a $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa: 39,53 g; volume de meio líquido: 100 mL; rotação: 1RPM)..... 115
- Figura 4.71 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em tambor rotativo a $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa: 39,53 g; volume de meio líquido: 100 mL; rotação: 1RPM)..... 116
- Figura 4.72 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator do rotativo a $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa: 28,52 g; volume de meio líquido: 100 mL; rotação: 1RPM)..... 117
- Figura 4.73 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em tambor rotativo a $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular

- inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa: 28,52 g; volume de meio líquido: 100 mL; rotação: 1RPM)..... 117
- Figura 4.74 – Concentração celular ($\circ$) e consumo de glicose ($\square$) em reator do rotativo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa: 39,53 g; volume de meio líquido: 80 mL; rotação: 1 RPM)..... 118
- Figura 4.75 – Concentração de fósforo ($\blacksquare$) e ácidos orgânicos (ácido láctico: $\bullet$, ácido acético: $\blacktriangle$) em tambor rotativo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa: 39,53 g; volume de meio líquido: 80 mL; rotação: 1 RPM)..... 119
- Figura 4.76 – Concentração celular ($\circ$) e consumo de glicose ($\square$) em reator do rotativo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa: 39,53 g; volume de meio líquido: 50 mL; rotação: 1 RPM)..... 120
- Figura 4.77 – Concentração de fósforo ($\blacksquare$) e ácidos orgânicos (ácido láctico: $\bullet$, ácido acético: $\blacktriangle$) em tambor rotativo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa: 39,53 g; volume de meio líquido: 50 mL; rotação: 1 RPM)..... 120
- Figura 4.78 – Concentração celular ($\circ$) e consumo de glicose ($\square$) em reator do rotativo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L; concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa: 39,53 g; volume de meio líquido: 20 mL; rotação: 1 RPM)..... 121
- Figura 4.79 – Concentração de fósforo ($\blacksquare$) e ácidos orgânicos (ácido láctico: $\bullet$, ácido acético: $\blacktriangle$) em tambor rotativo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L; concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa: 39,53 g; volume de meio líquido: 20 mL; rotação: 1 RPM)..... 122
- Figura 4.80 – Concentração celular ($\circ$) e consumo de glicose ($\square$) em reator do rotativo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L; concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; Massa de biomassa: 39,53 g; volume de meio líquido: 50 mL; rotação: 1 RPM; aeração úmida: 2,88 VVM)..... 123
- Figura 4.81 – Concentração de fósforo ($\blacksquare$) e ácidos orgânicos (ácido láctico: $\bullet$, ácido acético: $\blacktriangle$) em reator do rotativo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L; concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa:

39,53 g; volume de meio líquido: 50 mL; rotação: 1 RPM; aeração úmida: 2,88 VVM)	123
.....	123
Figura 4.82 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator do rotativo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L; concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa: 39,53 g; volume de meio líquido: 50 mL; rotação: 1 RPM; aeração úmida: 8,06 VVM).....	124
Figura 4.83 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator do rotativo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L; concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa: 39,53 g; volume de meio líquido: 50 mL; rotação: 1RPM; aeração úmida: 8,06 VVM).....	124
Figura 4.84 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator do rotativo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L; concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa: 39,53 g; volume de meio líquido: 50 mL; rotação: 1 RPM; aeração úmida: 11,52 VVM).....	125
Figura 4.85 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ● ácido acético: ▲) em reator do rotativo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L; concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa: 39,53 g; volume de meio líquido: 50 mL; rotação: 1RPM; aeração úmida: 11,52 VVM).....	125

RESUMO

A disponibilidade de nutrientes para as plantas é um fator determinante para o seu desenvolvimento e crescimento. O fósforo é um dos nutrientes mais importantes para a cultura agrícola sendo um fator limitante ao crescimento vegetal por influenciar o fornecimento de energia necessária para os processos metabólicos. Um dos principais problemas relativos à absorção deste nutriente pelas plantas se deve ao fato de uma grande porção de fosfato inorgânico solúvel, aplicado ao solo como adubo químico, ser rapidamente imobilizado nas formas de fosfato insolúvel. Uma das alternativas para amenizar esse problema é a utilização de microrganismos, especialmente algumas espécies de fungos, eficazes na liberação de fósforo por meio de produção de ácidos, mineralização ou produção de fosfatase. Assim, este trabalho teve como objetivo estudar a biossolubilização de fósforo proveniente de concentrado de rocha fosfática por *Trichoderma harzianum* diante de diferentes configurações de reatores. Através da classificação quantitativa avaliou-se a capacidade de solubilização de 16 isolados fúngicos previamente coletados e posterior influência da concentração de glicose, concentrado de rocha fosfática e inóculo em meio sintético seletivo líquido em reatores cônicos de bancada. Estudou-se ainda o processo de biossolubilização em reator air-lift contendo concentrado de rocha fosfática continuando o processo em reatores cônicos de bancada. O processo também foi estudado em série, em que ácidos orgânicos foram produzidos em reator air-lift e solubilização ocorreu em reatores cônicos de bancada. Variáveis como vazão volumétrica de ar, temperatura, reciclo do meio reacional, concentração de inóculo, glicose e concentrado de rocha fosfática foram otimizadas em reator air-lift. Estudou-se ainda reator tipo rotativo empregando bagaço de cana de açúcar como suporte para o crescimento do *Trichoderma harzianum* avaliando-se a relação massa de biomassa/volume de meio sintético líquido e aeração úmida. Em reator air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$, com aeração igual a 0,5 VVM, reciclo do meio reacional a 200 mL/min, concentração celular inicial igual a 3,7 g/L, Concentrado de rocha fosfática a 5 g/L e glicose sendo reposta a 10 g/L, obteve-se no quarto dia de operação uma solubilização de fósforo igual a 40,47%. O processo contínuo de solubilização de fósforo em reatores cônicos de bancada solubilizou 43,43% do fósforo total ao adicionar inóculo com concentração inicial de 3,1 g/L, glicose e Concentrado de rocha fosfática a 5 g/L ao meio reacional produzido no quarto dia de operação do reator air-lift contendo concentrado fosfático. No processo em série constituído pela produção de ácidos orgânicos em reator air-lift seguido pelo processo de solubilização de fósforo em reatores cônicos de bancada, 34,88% do fósforo total foi disponibilizado no terceiro dia de processo ao empregar glicose e concentrado de rocha fosfática a 10 e 5 g/L, respectivamente. Finalmente em reatores rotativos obtiveram-se valores máximos de solubilização e produção de ácidos orgânicos iguais a 37,83% e 8,59 $\mu\text{mol/mL}$, respectivamente, para a relação de 39,53 g de bagaço de cana de açúcar/50 mL de meio reacional líquido (glicose e concentrado de rocha fosfática a 5g/L). Ao empregar aeração úmida no processo de biossolubilização em reatores rotativos por *Trichoderma harzianum* a máxima solubilização igual a 48,16% foi encontrada empregando a vazão volumétrica de ar comprimido igual a 8,06 VVM, mantendo-se a umidade em $14,58 \% \pm 0,3$. Ao analisar o tempo de processo e a máxima percentagem de biossolubilização de fósforo atingida os melhores resultados foram alcançados em reator do tipo tambor rotativo.

Palavras-chave: Concentrado de rocha fosfática, Biossolubilização, *Trichoderma harzianum*.

ABSTRACT

The availability of nutrients for plants is a decisive factor for their development and growth. Phosphorus is one of the most important nutrients for the agricultural crops being a limiting factor for plant growth by influencing the supply of energy needed for metabolic processes. One of the main problems related to nutrient absorption by the plants is due to the fact that a large portion soluble inorganic phosphate applied to the soil as compost, is rapidly immobilized in the forms of insoluble phosphate. One approach to minimizing this problem is the use of microorganisms, especially some species of fungus effective for phosphorus release by the production of acids, mineralization or phosphatase production. This work aimed to study the phosphorus biosolubilization from phosphate rock concentrate of *Trichoderma harzianum* on different configurations of reactors. Through quantitative classification evaluated the solubilization capacity of 16 fungal isolates previously collected and later the influence of the glucose concentration, rock phosphate concentrate and inoculum in liquid selective synthetic medium in conical bench reactors. It was also studied the biosolubilization process in air-lift reactor containing phosphate rock concentrate continuing the process in conical bench reactors. The process was also study in series, in which organic acids were produced in air-lift reactor and solubilization occurred in conical bench reactor. Variables such as volumetric air flow, temperature, recycle of the reaction medium, inoculum concentration, glucose and phosphate rock concentrate were optimized in air-lift reactor. It was studied further rotary reactor using sugarcane bagasse as support for *Trichoderma harzianum* growth evaluating the ratio mass of biomass/volume of liquid synthetic medium and wet aeration. In air-lift reactor at 28 ± 3 ° C with aeration of 0.5 VVM, recycle of the reaction medium to 200 ml/min, initial cell concentration of 3.7 g/L phosphate rock concentrate 5 g/L and glucose is restored to 10 g/L was obtained on fourth day of operation a phosphorus solubilization equal to 40.47%. The continuous process of phosphorus solubilization on conic bench reactors solubilized 43.43% of the total phosphorus adding inoculum with an initial concentration of 3.1 g/L glucose and phosphate rock concentrate at 5 g/L to the reaction medium produced in fourth day of air-lift reactor operation containing concentrate rock phosphate. In the batch process consisting of the production of organic acids in air-lift reactor followed by phosphorous solubilising process on conic bench reactors, 34.88% of the total phosphorus was provided on the third day the process employing glucose and phosphate rock oncentrate at 10 and 5 g/L, respectively. Finally in rotary reactors were obtained maximum values of solubilization and production of organic acids equal to 37.83% and 8.59 $\mu\text{mol/ml}$, respectively, for the relation of 39.53 g of cane bagasse/50 ml of liquid selective synthetic medium (glucose and phosphate rock concentrate at 5g/L). By employing wet aeration the biossolubilization process in rotating reactors by *Trichoderma harzianum* the maximum solubilization equal to 48.16% was found using volumetric flow of compressed air of 8.06 VVM, maintaining the humidity at $14.58\% \pm 0.3$. By analyzing the process time and the maximum percentage of phosphorus biossolubilization reached the best results were achieved in the reactor rotating drum type.

Keywords: Phosphate rock concentrate, Biosolubilization, *Trichoderma harzianum*.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O fósforo é um macronutriente mineral essencial à manutenção do crescimento e desenvolvimento da planta. Nas plantas, o fósforo encontra-se na forma de fosfato inorgânico, sendo um dos macronutrientes disponíveis em menor quantidade no solo e um elemento limitante sob condições específicas devido à sua elevada reatividade com metais juntamente com fatores como o pH e a composição do solo (PLAXTON e LAMBERS, 2015).

O bioma cerrado é um grande ecossistema brasileiro caracterizado por solos com baixo pH e baixa concentração de fósforo (P) (MARSCHNER, 1995; NOVAIS e SMYTH, 1999; HINSINGER, 2001; WAKELIN *et al.* 2004).

O fósforo insolúvel acumulado ocorre tanto em formas orgânicas ou inorgânicas, indisponível para plantas. Ânions de fosfato podem ser imobilizados por meio de precipitação com cátions como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} e Al^{3+} . Fósforo orgânico no solo, geralmente representa cerca de 50% do total do fósforo insolúvel presente em solos com alto teor de matéria orgânica (BAYER *et al.* 2001; GYANESHWAR *et al.* 2002). A disponibilidade desse e outros nutrientes influenciam diretamente o crescimento e o aumento da produção agrícola. A captura eficiente de nutrientes do solo pelas raízes é uma questão crítica para as plantas, já que muitos ambientes possuem baixa disponibilidade de nutrientes. Para suprir essa necessidade, a utilização de fertilizantes químicos é uma maneira rápida de fornecer os nutrientes para a planta. O aumento populacional e o uso acelerado da adubação química contribuíram para efeitos desfavoráveis como lixiviação e eutrofização dos ecossistemas aquáticos, agravando a poluição ambiental (ADESEMOYE e KLOEPPER, 2009a; ADESEMOYE, *et al.* 2009b; YANG, *et al.* 2009).

Além disso, a adubação química também pode modificar o pH e a estrutura do solo, além de influenciar as atividades enzimáticas dos microrganismos aí presentes (BÖHME e BÖHME, 2006). A estratégia de melhorar a baixa concentração de fósforo em solos ácidos com aplicações corretivas é limitada ambientalmente devido à alta quantidade requerida de fertilizante e a alta capacidade de fixação de P nestes solos (HINSINGER, 2001).

O Brasil situa-se na faixa intertropical, apresenta clima úmido, solos ácidos e mineralmente pobres em muitos nutrientes fundamentais para a agricultura. Essas características geológicas condicionam ao país a necessidade do emprego maciço de fertilizantes, para reposição das quantidades dos elementos vitais retirados do solo pelos

processos de intemperismos durante milhões e milhões de anos (Balanço Mineral Brasileiro (Fosfato), 2001). A produção de fertilizantes fosfatados gera muitos rejeitos, em todas as etapas, desde a lavra ao beneficiamento até a sua aplicação nos solos. Entre os rejeitos estão materiais ainda contendo fósforo, mas cujo aproveitamento não é possível pelos atuais métodos industriais, representando, assim, um bem mineral não utilizado e um problema ambiental, visto que grandes volumes são envolvidos (SILVEROL, 2006).

Um mecanismo alternativo para o aumento da produtividade de culturas diante da deficiência de fósforo no solo é o uso da biotecnologia, principalmente os processos biológicos que acontecem no sistema solo/planta realizados por microrganismos (AQUINO e CORREIA, 2005). A associação de plantas com microrganismos pode exercer funções importantes na nutrição e sobrevivência da cultura pelo aumento da absorção de nutrientes contidos no solo (SILVA *et al.* 2007).

Populações microbianas são os principais componentes do sistema solo-planta, estando imersos em inúmeras interações que afetam o desenvolvimento da planta (WAKELIN *et al.* 2004; BAREA *et al.* 2005; VASSILEV *et al.* 2006). Microrganismos solubilizadores de fósforo (MSF) podem solubilizar e mineralizar fósforo inorgânicos e orgânicos derivados do fósforo total do solo e ainda serem usados como inoculantes para aumentar a disponibilidade para as plantas (KUCEY *et al.*, 1989; RICHARDSON, 2001; ILLMER *et al.* 1995; WHITELAW *et al.* 1999). Estirpes dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium* estão entre as bactérias mais eficientes na solubilização de P (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999), enquanto nas populações fúngicas destacam-se os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (SILVA FILHO *et al.* 2002).

Barroti e Nahas (2000) verificaram incremento da população de fungos solubilizadores de fosfato quando se associa ao fosfato de Araxá. Carneiro *et al.* (2004) detectaram aumento das populações de bactérias e fungos solubilizadores em solo de cerrado cultivado com guandu. Microrganismos devem estar constantemente envolvidos em um ambiente adequado na tentativa de prover condições ótimas de crescimento.

Um biorreator é um exemplo de ambiente em que este processo natural é mantido e as condições adequadas como temperatura, pH, substrato, sais nutricionais, vitaminas e oxigênio (para organismos aeróbios) são providas, possibilitando que as células cresçam e produzam os metabólitos de interesse (CERRI *et al.* 2008). Diante dos diversos modelos existentes de biorreatores, os reatores do tipo “air-lift” e tambor rotativo são comumente empregados em cultivos de microrganismos e células (CERRI, 2005).

Em reatores tipo air-lift com circulação interna de cilindros concêntricos, a circulação de líquido é induzida pela injeção de ar no interior do tubo concêntrico (tubo interno). O fluido descendente encontra a corrente ascendente de gás, sendo novamente carregado ascendentemente por esta, o que confere ao meio reacional uma circulação interna contínua (MERCHUK e GLUZ, 1999). O reator do tipo tambor rotativo recebe destaque como biorreator por apresentar razoável transferência de calor com misturas suaves, além de ser empregado para o estado sólido de fermentação em que proporciona a difusão de oxigênio no interior do meio reacional e dissipação de gases oriundos do metabolismo microbológico, favorecendo assim o crescimento celular (MITCHELL *et al.* 2006). Com o intuito de diminuir o uso e aperfeiçoar o aproveitamento de fertilizantes fosfatados solúveis na agricultura, justificam-se estudos que envolvam o isolamento e quantificação da capacidade de solubilização de fosfatos insolúveis por microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) visando o seu uso futuro na forma de inoculantes (SOUCHIE *et al.* 2005a).

Baseando-se nas considerações expostas, o objetivo geral desse trabalho foi estudar a solubilização de fósforo proveniente de concentrado de rocha fosfática empregando diferentes isolados fúngicos em diversos processos fermentativos e configurações de biorreatores.

Como objetivos específicos dessa tese podem ser citados:

- Selecionar, dentre os isolados fúngicos, os microrganismos com maior capacidade de solubilização de fósforo;
- Avaliar as condições operacionais e composição do meio reacional no processo de biossolubilização de fósforo derivado de concentrado de rocha fosfática em meio sintético líquido em reatores cônicos de bancada;
- Examinar a influência da variação da temperatura, vazão volumétrica de reciclo do meio reacional e vazão volumétrica de ar por minuto na biossolubilização de fósforo em reator air-lift;
- Investigar a biossolubilização sequencial de fósforo em reator do tipo air-lift e reatores cônicos de bancada;
- Estudar produção de ácidos orgânicos em reator do tipo air-lift seguido pela biossolubilização de fósforo proveniente de concentrado de rocha fosfática em reatores cônicos de bancada;
- Analisar o processo de biossolubilização de fósforo em reatores do tipo rotativo pela avaliação da influência da relação volume de biomassa/volume de meio reacional líquido;

- Apreciar da influência da aeração úmida no processo de biossolubilização de fósforo proveniente de concentrado de rocha fosfática em reator do tipo rotativo.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O presente Capítulo apresenta os principais temas relacionados ao estudo, como o papel do fertilizante químico fosfatado e potássico no cenário agrícola brasileiro, destacando a importância do fósforo na nutrição de plantas. Posteriormente a definição de biofertilizante é contextualizada como um produto alternativo à utilização de fertilizantes químicos em defesa da mitigação da agressão à natureza. Como sequência busca-se o estudo da ação de microrganismos pelos seus mecanismos de ação em benefício aos vegetais, destacando-se o fungo *Trichoderma harzianum* pelo seu potencial biotecnológico.

2.1 Nutrição Vegetal

Desde o século XIX químicos e botânicos notaram que os vegetais necessitam de elementos químicos para o desenvolvimento e que na ausência dos mesmos, sintomas de deficiência nutricional, anomalias de crescimento e reprodução são observados (VAN DER PLOEG *et al.* 1999).

Loneragan, (1997) destacou que as plantas não requerem partículas sólidas do solo, matéria orgânica ou até mesmo bactérias, mas que apenas 7 elementos químicos seriam necessários ao desenvolvimento vegetal. Entre eles, tem-se os macronutrientes: nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), enxofre (S), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e micronutriente como o ferro (Fe), variando a quantidade de acordo com a requerida pelas plantas. Essas informações retratam resumidamente a teoria da nutrição de plantas que fazem parte de livros publicados pelo químico alemão Justus von Liebig (1803-1873). Os estudos deste químico originaram profundas conclusões, por exemplo, a de que alimentos poderiam ser produzidos em maior quantidade e com maior valor nutritivo se fossem adicionados ao solo elementos químicos em concentrações adequadas, originando assim significativas transformações na agricultura. Liebig chegou, assim, à famosa fórmula NPK e deu início à era dos fertilizantes químicos (PINHEIRO, 2003; MAAR, 2006).

Com o legado de Liebig iniciou-se uma época de descobertas marcantes nas áreas de química e microbiologia do solo, principalmente a descoberta dos nutrientes essenciais, do sistema de simbiose em legumes para fixação de N atmosférico. Descobertas que permitiram avanços substanciais nas diferentes áreas da ciência do solo e possibilitaram um aumento significativo na produção de alimentos (LONERAGAN, 1997).

Ao encontrar-se disponível no solo em contato com a superfície ativa do sistema radicular os nutrientes poderão ser absorvidos pela planta. Assim justificam-se os inúmeros estudos realizados em torno do modo como os diferentes nutrientes encontram-se disponíveis, já que são limitantes ao desenvolvimento dos vegetais. Os processos dinâmicos entre fases sólidas e líquidas do solo, a absorção de nutrientes pelas raízes e o transporte para a parte aérea da planta torna a composição do solo variável (FURLANI, 2004; REICHARDT e TIMM, 2004).

Em países em desenvolvimento como o Brasil, a nutrição de plantas tem papel chave no desenvolvimento da agricultura, destacando a identificação da deficiência e da toxidez de nutrientes nas culturas, a correção dos solos inférteis com uma quantidade mínima de fertilizantes e o desenvolvimento de cultivares (espécies de plantas que foram melhoradas devido à alteração ou introdução, pelo homem, de uma característica que antes não possuíam ([Lei n.º 9.456/1997](#))) com alta eficiência de utilização de nutrientes e com uma alta tolerância aos elementos tóxicos naturais dos solos (SANCHES e SALINAS, 1981).

Uma das principais limitações à agricultura, em mais da metade das terras aráveis dos trópicos, reside na baixa fertilidade dos solos, que são, em sua maioria, ácidos e com deficiências generalizadas de nutrientes, principalmente fósforo (GOEDERT, 1983).

Em pesquisas sobre nutrição de plantas destaca-se o estudo do fósforo (P), que é um nutriente de grande importância nos solos tropicais, já que leva a grandes limitações nos rendimentos das culturas. A disponibilidade de P para microrganismos e raízes se constitui, normalmente, como um fator limitante para as transformações de outros nutrientes no ecossistema terrestre, como o carbono (C) e o nitrogênio (N) (GRANT; ROBERTSON, 1997), que são dependentes de P para serem fixados. O fósforo ainda é apontado como o macronutriente mais limitante nos solos brasileiros (RAIJ, 1991).

2.2 Fósforo

O fósforo é considerado um macronutriente mineral essencial ao desenvolvimento e manutenção do crescimento de plantas (PLAXTON e LAMBERS, 2015). Este mineral solúvel possui uma alta reatividade com cálcio, ferro e alumínio, levando à formação de complexos de alta insolubilidade conduzindo à precipitação do fósforo disponível (GYANESHWAR *et al.* 2002; REICHARDT e TIMM, 2004).

O P tem relevante papel como constituinte das membranas celulares e das moléculas de DNA e de RNA, regulador de diversas vias metabólicas e as células utilizam-no para armazenar e transportar a energia na forma de fosfato de adenosina (FURLANI, 2004).

Ao contrário do nitrogênio e do enxofre que penetram em moléculas orgânicas por vias bem definidas, o fósforo não altera o estado de oxidação. A via mais importante pela qual o fosfato inorgânico entra no metabolismo da planta é a fosforilação de ADP e ATP, seguida pela formação de outros metabólitos fosforilados e nucleotídeos posicionando o fósforo como centro no metabolismo energético entre carbonos. O fósforo desempenha um papel fundamental em muitos processos celular sendo um componente intermediário no metabolismo primário e componente de energia de moléculas de sinalização e de macromoléculas estruturais (PLAXTON e LAMBERS, 2016).

O fósforo é assimilado pelas plantas preferencialmente na forma iônica monovalente (H_2PO_4^-), que é absorvido pelas raízes e rapidamente incorporado aos açúcares.

Em solos básicos, a forma inorgânica predominante é o fosfato de cálcio, na forma de apatitas e em solos ácidos, como no Brasil, predominam os fosfatos de ferro ou alumínio (CLARK e PAUL, 1988). Já a forma orgânica do fósforo encontrado no solo é proveniente de restos vegetais e animais e está presente principalmente na forma de fitatos, nos fosfolípidios e nos ácidos nucléicos (ALEXANDER, 1980; TSAI e ROSSETTO, 1992). As enzimas fosfatases são as principais enzimas responsáveis pela mineralização do fósforo orgânico. Entre as principais enzimas responsáveis pela mineralização tem-se as fitases, as nucleases e as fosfolipases (NAHAS e ASSIS, 1992; GYANESHWAR *et al.* 2002).

A baixa solubilidade e a deficiência de fósforo no solo impulsionam a aplicação de fertilizantes químicos com o objetivo de aumentar a produtividade das culturas. Porém, estudos revelam que 75% a 90% do fertilizante adicionado se precipitam na forma de fosfato de ferro, alumínio e cálcio (VIG e DEV, 1984). A busca por um maior entendimento sobre a atuação da população microbiana na dinâmica do fósforo é justificada pela baixa disponibilidade deste macronutriente as culturas agrícolas. Uma alternativa viável ao uso da adubação convencional para o melhor aproveitamento do fósforo existente, ou do adicionado, no solo é representado pelo processo de solubilização realizado por diversos microrganismos (SILVA FILHO e VIDOR, 2001).

2.2.1 Cenário brasileiro

A rocha fosfática é usada principalmente como insumo na indústria de fertilizantes, sendo um recurso mineral pelo qual apenas três países são responsáveis por 73% da produção mundial (China, Estados Unidos e Marrocos, incluindo Saara Ocidental). Dados preliminares do United States Geological Survey (USGS) indicam pequena retração na produção mundial de rocha fosfática em 2014 quando comparada a 2013, fato esse relacionado à menor produção nos EUA e China, enquanto que a região do Marrocos e Saara Ocidental apresentaram um pequeno aumento (SUMÁRIO MINERAL, DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINEAL, 2016).

Os Estados Unidos, Marrocos e Rússia foram privilegiados pela natureza com grandes concentrações de rocha fosfática (60% do mundo), destacando-os como países tradicionais na produção e exportação dessa matéria-prima. No Brasil, a produção de rocha fosfática em 2014 foi inferior à de 2013, devido principalmente à exaustão da mina do Barreiro, em Minas Gerais (MG). Quanto às reservas, o Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM) tem mantido o patamar de 270 milhões de toneladas (Mt) (lavráveis), já que novas aprovações aconteceram nos últimos anos (SUMÁRIO MINERAL, DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINEAL, 2016).

As reservas de minério (rocha fosfática) oficialmente aprovadas no Brasil, em 2008, são de 4.769 Mt. Cerca de 2.510 Mt representam as reservas medidas, 1.107 Mt as indicadas, com 231 Mt e 106 Mt, respectivamente, em termos de P_2O_5 contido. As reservas brasileiras de fosfato somam 337 Mt de P_2O_5 contido (medida + indicada) o que representa cerca de 0,72% das reservas mundiais. Essas reservas estão concentradas, principalmente, nos estados de Minas Gerais com 67,9% desse total, seguido de Goiás com 13,8%, São Paulo com 6,1%, que juntos participam com 87,8% das reservas do País, e o restante nos Estados de Santa Catarina, Ceará, Pernambuco, Bahia, Paraíba e Tocantins. Ressalta-se que 91,5% do patrimônio nacional de rocha fosfática, em termos de P_2O_5 contido (reservas medidas + indicadas), estão concentradas em apenas nove municípios brasileiros de quatro Estados, onde o município de Tapira é o maior detentor de fosfato com 32,6%, Serra do Salitre com 13,5%, seguidos de Patos de Minas (11,9%) e Araxá (8,8%), todos no estado de Minas Gerais. No Estado de Goiás tem-se os municípios de Catalão com (7,1%) e Ouvidor (6,8%). O Estado de São Paulo representado pelos municípios de Cajati (3,4%) e Iperó (Registro) com (2,8%) e finalmente o Estado de Santa Catarina, onde o município Anitápolis detém 4,6% (BALANÇO MINERAL BRASILEIRO (FOSFATO), 2001).

No Brasil, cerca de 80% das jazidas fosfáticas naturais (fosfatos), são de origem ígnea com baixo teor (o conteúdo de fósforo de uma rocha ou concentrado), em geral expresso em

P₂O₅, enquanto que em termos mundiais esse percentual está em torno de 17%. A denominação de fosfato natural, rocha fosfatada ou mesmo concentrado de rocha fosfática é empregada caso seja passível de ser aproveitado diretamente como material fertilizante ou como insumo básico da indústria de fósforo ou de seus compostos, tal qual se encontram na natureza ou após os minérios sofrerem concentração por meios físicos nas usinas de beneficiamento (BALANÇO MINERAL BRASILEIRO (FOSFATO), 2001).

Dentre os minerais conhecidos existem 370 que detêm teores de fósforo superiores a 10%, e desta, 96 apresentam teores superiores aos da apatita (18,4% de P), porém na sua maioria tem apenas significado científico e mineralógico, sendo que apenas os mineirais da série da apatita constituem minerais-minérios (BALANÇO MINERAL BRASILEIRO (FOSFATO), 2001).

A apatita é um mineral-minério de fósforo (com teor variando de 5 a 15% de P₂O₅) que se encontra quase sempre presente nas rochas carbonatíticas sendo aplicada principalmente na fabricação de ácido fosfórico, como matéria-prima para fertilizantes. A maioria dos minérios de fósforo dessas rochas pertence ao grupo da apatita, representado pela fórmula: Ca₅(F, Cl, OH)(PO₄)₃ – que é um fosfato cristalino de cálcio com flúor, de cor variável, brilho vítreo, dureza cinco, densidade entre 3,1 a 3,2 g/cm³ (BALANÇO MINERAL BRASILEIRO (FOSFATO), 2001).

Os depósitos de apatita têm uma minerologia extremamente complexa, tendo impurezas contaminantes de influência expressiva na recuperação de fósforo nas usinas de beneficiamento desses minérios, resultando em altos custos de produção (BALANÇO MINERAL BRASILEIRO (FOSFATO), 2001).

A produção interna brasileira em 2014 foi oriunda de 13 minas, assim localizadas: no Estado de Minas Gerais, nos municípios de Tapira (que abriga a maior mina do país) e Araxá (Barreiro), no Estado de Goiás, nos municípios de Catalão e Ouidor. Somadas, as cinco minas citadas, foram responsáveis, em 2014, por 82% da produção nacional.

Todas essas operações movimentaram 40 Mt (milhões de toneladas) de minério bruto com cerca de 10% de P₂O₅, que, após beneficiadas em usinas das próprias empresas extratoras resultaram em 6,5 Mt com 35% de P₂O₅, que é a matéria-prima para a confecção de diversos produtos fertilizantes (SUMÁRIO MINERAL, DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINEAL, 2016).

Aproveitar o fósforo sob a forma de pentóxido de fósforo (P₂O₅) é uma necessidade para tornar possível a utilização desse produto em várias proporções definidas com outros compostos para assim resultar em fertilizantes minerais ou orgânicos. Os quais em contato

com o solo possam estar em simbiose com os elementos vitais, os nutrientes (oxigênio, carbono, nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, ferro, cobre, zinco, manganês, boro, molibdênio, hidrogênio e água) (Balanço Mineral Brasileiro (Fosfato), 2001).

2.3 Fertilizantes

2.3.1 Características e cenário do fertilizante químico no Brasil

Esterco, restos de plantas e de animais, tortas de grãos de vegetais (resíduo da extração do óleo), farinha de ossos e de conchas e cinzas são exemplos de fontes importantes de fertilizantes. Em tempos modernos, a compostagem de lixo reveste-se de importância fundamental, tanto como solução para o problema do lixo doméstico quanto como fonte de adubo. Vale ressaltar as diferentes funções da adubação, destacando o fornecimento de nutrientes deficientes ao solo, a adequação às condições físicas de ventilação, drenagem e proliferação de microrganismos (CHAVES, 2010).

Algumas das opções anteriores não suprem a necessidade de elementos químicos, essencial ao desenvolvimento das plantas. Os seres vivos precisam de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) em quantidades ou proporções definidas para desenvolvimento de suas funções vitais, grupo de elementos chamado de macronutrientes (CHAVES, 2004).

A adição desses elementos ao solo é feita através dos adubos. As matérias-primas para estes produtos são os fertilizantes, destacando os fertilizantes solúveis, constituídos obrigatoriamente de N, P e K e frequentemente os demais nutrientes, em receitas preparadas de acordo com as necessidades específicas do solo que irão adubar. As fontes de fósforo mais comuns são os fertilizantes fosfatados, apresentados em níveis de alta e baixa concentração. Os fosfatos solúveis de baixa concentração – superfosfato simples (SSP), e o fosfato parcialmente acidulado (FPA) são fabricados pela reação do produto do beneficiamento, concentrado de rocha fosfática com o ácido sulfúrico, em reações de longo tempo de duração. Os fosfatos ditos de alta concentração (mono-amônio fosfato, MAP, triamônio fosfato, TAP, superfosfato triplo, TSP, e triplo simples, TSP) são produzidos reagindo o mesmo concentrado de rocha fosfática com ácido fosfórico, para a obtenção de produto com alto conteúdo do fósforo (RESENDE, 2005).

O uso de fertilizantes para corrigir as insuficiências nutricionais e aumentar o rendimento das culturas se faz necessário e indispensável diante da fertilidade natural dos

solos brasileiros. A agricultura brasileira tornou-se dependente dos fertilizantes, o que afeta diretamente a produção e economia do país, principalmente pela grande quantidade utilizada. As características geológicas condicionam o país à necessidade do emprego expressivo de fertilizantes para a reposição de quantidades de elementos vitais retirados do solo pelos processos de intemperismo ou em função da baixa disponibilidade destes compostos ou elementos no solo (SILVA, 2013).

2.3.2 Biofertilizante

A Lei 6495 (1980) Decreto 4954/2004 define biofertilizante como o produto que contém princípio ativo ou agente orgânico, isento de substâncias agrotóxicas, capaz de atuar, direta ou indiretamente, sobre o todo ou parte das plantas cultivadas, elevando a sua produtividade.

O potencial biológico de um biofertilizante é expresso pela quantidade de microrganismos existentes, responsáveis pela liberação de metabólitos (ANDRADE, NOGUEIRA, 2005).

Na literatura são encontrados vários trabalhos sobre efeitos benéficos da inoculação de microrganismos na promoção do crescimento de plantas (GALLEGUILLLOS *et al.* 2000; LUGTENBERG *et al.* 2002; GRAY e SMITH, 2005).

A fixação biológica de nitrogênio, a produção de metabólitos pelos microrganismos como fito-hormônios (WAISEL, ESHEL e KAFKAFI, 2002; VESSEY, 2003), o controle de organismos deletérios por antagonismo ou o estabelecimento de competição na rizosfera inibindo os fitopatógenos (SHARMA *et al.* 2003) que promovem a disponibilidade de nutrientes como ferro, fósforo e potássio, (MASALHA *et al.* 2000; SHARMA e JOHRI, 2003; SILVA FILHO e VIDOR, 2001; NARLOCH, 2002), são alguns efeitos benéficos das atividades desenvolvidas pelos microrganismos.

2.4 Interações entre microrganismos e plantas

Ainda que sejam necessários avanços tecnológicos para quantificar a biodiversidade dos agroecossistemas, os microrganismos constituem seu principal componente. Os solos tropicais, por exemplo, apresentam uma grande diversidade microbiológica, sendo necessário estudá-la para que seja adequadamente utilizada e preservada (FIGUEIREDO *et al.* 2008; HIRATA e FILHO, 2011).

Plaxton e Lambers (2015) destacaram que ao se apresentar como inadequado, o potencial de ionização da rizosfera torna-se um desafio, principalmente para plantas de colheita. Como tentativa de correção a aplicação de fertilizantes concentrados em fósforo apresenta-se como um método de compensação ineficiente, destacando assim a importância de entender o metabolismo e desenvolvimento de processos em plantas diante da aquisição e utilização deste nutriente.

Behera *et al.* (2014) concluíram que a solubilização de fósforo por microrganismos representa um importante papel na nutrição deste macronutriente, pela disponibilização do mesmo para as plantas. Afirmaram ainda que o principal mecanismo de solubilização de fósforo inorgânico no solo acontece pela diminuição do pH do mesmo pela produção de ácidos orgânicos e mineralização do fósforo orgânico por fosfatase ácida. Destacaram também que a manipulação genética de bactérias solubilizadoras de fosfato com objetivo de melhorar a capacidade de solubilização não é apenas importante como aparentemente possível.

Vários outros mecanismos influenciam positivamente os vegetais (COLA e SIMÃO, 2012), destacando a assimilação microbiana do potássio solúvel, seguida de sua liberação para o solo (HARLEY e GIKES, 2000), além do cálcio e do ferro que ao absorvê-los acompanhados dos fosfatos, tornam o fósforo disponível (NARLOCH, 2002; HAYAT *et al.* 2010). Outro processo utilizado pelos microrganismos para disponibilização de fósforo é a mineralização. Nesse processo compostos orgânicos contendo fósforo e outros minerais através de ações enzimáticas específicas os tornam assimiláveis as plantas (NAHAS *et al.* 1982).

Segundo Silva Filho *et al.* (2002), populações de microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) existentes no solo estão entre 10^4 e 10^7 células.g⁻¹ de solo, podendo variar de acordo com o local e o método de avaliação, e na ordem de 10^6 células.g⁻¹ de solo da rizosfera de diversas leguminosas. A eficiência da solubilização pode diferenciar entre gêneros e famílias de microrganismos, em muitos casos a eficiência dos fungos é mais evidenciada do que as das bactérias, embora estas sejam encontradas em maior número (EIRA, 1992).

Em ecossistemas naturais, diante das alterações ambientais, a diversidade e o número de microrganismos na comunidade apresentam pequenas oscilações, definindo o equilíbrio microbiológico como dinâmico (NAHAS *et al.* 2009). A inoculação de microrganismos benéficos causa a melhoria no desenvolvimento de plantas (HAYAT *et al.* 2010), controle de fitopatogênico (ABDLWARETH *et al.* 2012) além de favorecer o crescimento diante de condições adversas (GIRI e MUKERJI, 2004). As bactérias do gênero rizóbio (SILVA *et al.*

2007), fungos micorrízicos arbusculares (SILVA, 2003) e bactérias solubilizadoras de fosfato e potássio (STAMFORD *et al.* 2008) estão entre os microrganismos com comprovado potencial benéfico as plantas.

2.5.1 Microrganismos solubilizadores de fósforo

Os microrganismos realizam funções únicas na manutenção de ecossistemas, como componentes essenciais de cadeias alimentares, reciclagem de nutrientes e nos ciclos biogeoquímicos existentes (LEITE, 2009). A biodegradação é considerada um processo complexo que envolve um grande número e diferentes espécies microbianas. A completa degradação de um composto orgânico é resultado de atividades microbiana individual e de grupos funcionais (SUN *et al.* 2004). A manutenção do solo é dependente das interações microbianas, as quais apresentam significativa importância ecológica na disponibilização de elementos que se apresentam em formas pouco solúveis e que são essenciais ao crescimento vegetal (ALVES *et al.* 2010).

Desde 1903 explora-se o crescimento vegetal pela atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos existentes ou adicionados ao solo. O início dos estudos foi marcado pela detecção de “ação solvente” de bactérias no solo (SPERBER, 1958; KUCEY, JENZEN e LEGGETT, 1989). Assim estudos são realizados com esses microrganismos e com minerais fosfatados que possam ser solubilizados (GOLDSTEIN, 1986; NAHAS e ASSIS, 1992; SILVA FILHO; VIDOR, 2001).

Os microrganismos solubilizadores são encontrados em geral no solo (KIM, JORDAN e KRISHNAN, 1997; SILVA FILHO, 1998, SILVA FILHO *et al.* 2002; NARLOCH e SCHARF, 2002), na superfície das sementes (KATZNELSON, PETERSON e ROUATT, 1962) e, também, em rochas e materiais oriundos de minas (ARBIETO, 2005).

D'Souza e Rodrigues (2013) encontraram um total de 28 espécies de fungos do gênero *Glomus*, *Acaulospora*, *Scutellospora*, *Gigaspora* e *Entrophospora* nos mangues de Goa, oeste da Índia, que apresentaram potencial de biossolubilização.

Kanimozhi e Panneerselvam (2011) constataram a eficiente solubilização de fosfato por *Aspergillus niger* e *Penicillium nigricans* oriundos do mangue de Muthupettai, Tamilnadu.

Wang *et al.* (2012) em seu trabalho com *Paenibacillus polymyxa* e *Paenibacillus macerans* constataram que esses microrganismos poderiam, diretamente, aumentar a

disponibilidade de P no solo para as raízes das plantas e, indiretamente, melhorar a captação do elemento aos fungos micorrízicos arbusculares.

Sridevi e Mallaiah (2009) estudando quarenta e seis isolados de *Rhizobium* de raízes de leguminosas observaram habilidades nesses microrganismos em solubilizar fósforo e que este fato poderia ser utilizado para compreender o mecanismo de aquisição de fosfato em plantas hospedeiras, a partir do qual foram isolados.

Oliveira *et al.* (2009) destacaram em seu trabalho que *Aspergillus terreus* apresentou capacidade de solubilizar fósforo em meio contendo fosfato de alumínio, fitato e lecitina. *Talaromyces rotundus* foi um dos microrganismos com maior capacidade produtora de fosfato em meio contendo fitato e lecitina, indicando que este fungo representa uma espécie importante para a produção de fitase e fosfolipases.

Gupta e Das (2008) detectaram um total de 36 fungos pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Cladobotrytis*, *Paecilomyces*, *Alternaria*, encontrados nos mangues de Bhitarkanika, Odisha, Índia, sendo que *Penicillium* e *Aspergillus* são comumente citados como microrganismos solubilizadores de fosfato (GAUR e SACHAR, 1980).

Vários gêneros de bactérias e fungos, incluindo micorrízicos, são citados em estudos sobre microrganismos solubilizadores de fosfato (NARLOCH, 2002). Bactérias dos gêneros *Pseudomonas* (GOLDSTEIN, 1986) e *Bacillus* (SILVA FILHO e VIDOR, 2001) se destacam como microrganismos solubilizadores.

Entre os fungos, merecem destaque os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (KUCEY, 1987; SILVA FILHO e VIDOR, 2001). Citam-se, ainda os gêneros *Paecilomyces*, *Rhizopus* e *Fusarium* (AGNIHORTRI, 1970; CHABOT *et al.* 1996; SILVA FILHO e VIDOR, 2001).

Na agricultura os fungos micorrízicos representam uma categoria bem conhecida em que fungos ectomicorrízicos se destacam na solubilização de fosfatos inorgânicos (LEYVAL e BERTHELIN, 1986; GOMES e OLIVEIRA, 1992; SILVA FILHO *et al.* 1992).

Além de promover o crescimento vegetal por meio dos mecanismos envolvidos na solubilização de fosfato, os microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) aumentam a eficiência da fixação biológica de nitrogênio.

O fósforo é fator limitante para fixação de nitrogênio pela simbiose rizóbio-leguminosas, aumentando a disponibilidade de outros elementos ou produzindo substâncias promotoras de crescimento de plantas (CHABOT *et al.* 1998; GYANESHWAR *et al.* 2002), como substâncias promotoras do crescimento de plantas (citocinas, giberelinas, ácidos indol-

3-acético) (GONZALES-EGUIARTE e BAREA, 1975; LEINHOS e VACEK, 1994) e vitaminas (riboflavina, niacina e vitamina B12) (STRZELCZYK e ROZYCKI, 1985).

2.5.2 Mecanismos de solubilização

Em plantas e microrganismos, o mecanismo primário de solubilização de fósforo é a excreção de H^+ , produção de ácido orgânico e biossíntese da fosfatase ácida (ARCAND e SCHNEIDER, 2006). Ácidos orgânicos, como acético, láctico, málico, oxálico, cítrico podem formar complexos com o ferro ou alumínio oriundos dos fosfatos de alumínio e férrico, liberando o fosfato para as plantas no solo (GYANESHWAR *et al.* 2002). Ácidos orgânicos podem aumentar a disponibilidade de fósforo pelo bloqueio dos pontos de absorção de fósforo em partículas do solo ou através da formação de complexos com cátions na superfície mineral do solo (BIANCO e DEFEZ, 2010).

A solubilização de fósforo por microrganismos pode ocorrer principalmente por dois mecanismos de ação sobre o meio. O primeiro é conhecido como mineralização, em que o fósforo é liberado em formas imediatamente assimiláveis pela atividade enzimática específica das enzimas fosfatases que hidrolisam o P-orgânico presente em fitatos, fosfolípidios e ácidos nucleicos (NAHAS *et al.* 1982).

Diante da limitação da capacidade microbiológica de absorver o fósforo essa atividade enzimática apresenta-se limitada, ou seja, diminui ou cessa assim que os microrganismos se tornarem saturados desse macronutriente. Assim, a solubilização de fósforo estaria condicionada às necessidades microbianas, não podendo esperar que a sua contribuição para o solo seja ilimitada, ou proporcional meramente à quantidade de fósforo insolúvel existente no meio (NELSON *et al.* 1976).

De acordo com OLIVEIRA *et al.* (1999) a produção da fosfatase ácida é um dos mecanismos envolvidos em ambientes pobres em fósforo. O termo fosfatase é atribuído ao conjunto de enzimas extracelulares de microrganismos ou plantas que promovem a liberação de fósforo de compostos orgânicos.

A deficiência de fosfato inorgânico ou dificuldade de absorver fósforo em condições de falta de água podem induzir a formação desta enzima, sendo que sua quantidade na planta aumenta quando os sistemas apresentam baixos teores de fósforo disponível (TROLLDENIER, 1992, CLARHOLM, 1993, OBERSON *et al.* 1996, CONTE, 2001). De acordo com Tarafdard *et al.* (1981), a atividade da fosfatase ácida apresenta uma correlação significativa com o fósforo inorgânico. A atividade de fosfatase ácida no mecanismo do uso

de fósforo pelas plantas é maior quanto menor o teor de fósforo inorgânico no tecido (FREITAS, 1995), porém é inibida pelo íon fosfato diante do mecanismo de retroinibição (REID; BIELESKI, 1970).

Silva e Basso (1993) verificaram relação negativa entre atividade da fosfatase ácida com o crescimento e a concentração de fósforo na parte aérea e subterrânea da cana-de-açúcar. Por outro lado, Antibus e Lesica (1990) destacaram pontos positivos entre a atividade da fosfatase ácida com o conteúdo de fósforo vascular de epífitas.

A determinação da atividade de fosfatases, para algumas espécies vegetais, pode ser utilizada como uma ferramenta de diagnose nutricional, prevendo deficiência de P nas plantas antes do aparecimento dos sintomas visuais de deficiência (BESFORD, 1979).

O segundo mecanismo de solubilização que tem grande importância, ocorre principalmente pela produção de ácidos inorgânicos, orgânicos e/ou pela diminuição do valor do pH pelos microrganismos solubilizadores de fosfato (GYANESHWAR *et al.* 2002; NARLOCH, 2002).

Bolan *et al.* (1994) verificaram que a aplicação de vários ácidos orgânicos de ocorrência normal em solos, tais como: málico, láctico, fórmico, acético, oxálico, tartárico e cítrico à amostras de solos de diferentes composições mineralógicas e diferentes teores de carbono promoveu um aumento da solubilização do fosfato monocálcico e de rocha fosfática. Esses ácidos podem ser produzidos pelo próprio metabolismo microbiano (CUNNINGHAM e KULACK, 1992; KIM *et al.* 1997) e, também, serem encontrados nos exsudatos das raízes das plantas.

Os ácidos orgânicos podem agir como acidificantes do meio ou como agentes quelantes ou complexantes, formando compostos com cálcio, ferro e alumínio (SPERBER, 1958; WHITELAW, 2000).

Illmer e Schinner (1992) concluíram que a produção de ácidos orgânicos não é o principal mecanismo envolvido na solubilização de fosfatos, ao encontrar apenas três ácidos produzidos por bactérias solubilizadoras, entre as 24 testadas. Esses autores consideram a possibilidade de acidificação do meio pela liberação de prótons H^+ a partir do processo de troca catiônica ou da cadeia respiratória.

Branco *et al.* (2001) citam ainda outro mecanismo, inespecífico, que causa a acidificação do meio pela presença de gás carbônico resultante da atividade respiratória e da decomposição da matéria orgânica, levando a formação de H_2CO_3 . Neste caso, a solubilização dos fosfatos se dá independentemente da demanda específica de fósforo e passa a ser

proporcional às quantidades disponíveis de matéria orgânica a ser degradada como fonte de carbono e de energia.

O consumo de cálcio e ferro pelos microrganismos pode ser outro mecanismo de disponibilização de fósforo as plantas. Ao consumir esses compostos acompanhados dos fosfatos, os microrganismos tornam o fósforo assimilável pelas plantas (NARLOCH, 2002).

A maioria dos microrganismos solubiliza fosfato de cálcio, sendo raros aqueles que conseguem solubilizar fosfato de ferro ou de alumínio (GYANESHWAR *et al.* 2002), justificando que a habilidade de solubilização depende de fatores como o tipo de fosfato, a natureza da fonte de nitrogênio e a fonte de carbono presente (SILVA FILHO e VIDOR, 2000).

Resultados significativos relacionados ao crescimento vegetal foram obtidos quando Chabot *et al.* (1998) introduziram a capacidade de solubilização em microrganismos que não expressavam essa característica. Porém a solubilização de fosfato não pode ser expressa por um único gene ou por um grupo de genes e não é comum a todos os microrganismos solubilizadores (NARLOCH, 2002).

2.5.3 Fungos solubilizadores

A comunidade microbiana que depende diretamente do solo desempenha papel fundamental na manutenção da qualidade do solo e tem se tornado alvo crescente de estudos relacionado à biossolubilização de fósforo (GARBEVA *et al.* 2004). Grande parte desta comunidade possui a habilidade de mineralizar fosfatos orgânicos e solubilizar fosfatos inorgânicos, permitindo a liberação de fósforo assimilável pelas plantas (SILVA FILHO, 1998). Tais microrganismos apresentam potencial de utilização como inoculante, já que podem maximizar o desenvolvimento vegetal (SAHIN *et al.* 2004, SOUCHIE *et al.* 2006).

Reyes *et al.* (1999) relataram correlação positiva entre a solubilização mineral de fosfato por *Penicilium rugulosum* e a produção de ácido glucônico ou cítrico. A presença destes microrganismos tem sido constatada na maioria dos solos (JONES *et al.* 1991, NAHAS *et al.* 1994b), sendo uma parcela importante desta comunidade microbiana hábil em mineralizar fosfatos orgânicos e solubilizar fosfatos inorgânicos (SILVA FILHO, 1998), maximizando o desenvolvimento vegetal (SAHIN *et al.* 2004).

Entre as populações fúngicas com potencial para solubilização destacam-se os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (SILVA FILHO *et al.* 2002). Investigando alternativas para a obtenção de fósforo solúvel, Nahas *et al.* (1990) demonstraram a possibilidade de produção de

1,2 g.L⁻¹ de fosfato solúvel pela ação de *Aspergillus niger* sobre fluorapatita em meio de vinhaça.

Souchie *et al.* (2006) relataram o sinergismo entre fungos solubilizadores e micorrizicos na solubilização de fósforo, em que concluíram que *Trifolium platense* foi favorecido pela inoculação de *Aspergillus sp.* (PSF7), *Glomus clarum* e *Glomus glosporum*, evidenciando a relação positiva entre esses microrganismos.

Microrganismos e células devem estar constantemente envolvidos em um ambiente adequado na tentativa de prover condições ótimas de crescimento. Um biorreator é um exemplo de ambiente em que este processo natural é mantido e as condições adequadas como temperatura, pH, substrato, sais nutricionais, vitaminas e oxigênio (para organismos aeróbios) são providas, possibilitando que as células cresçam e produzam os metabólitos de interesse (CERRI *et al.* 2008).

2.6 Configurações de Biorreatores

2.6.1 Biorreatores do tipo Air-lift

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

Os reatores air-lift (ARL) são aqueles que melhor conferem homogeneidade de nutrientes ao sistema, ganhando assim destaque em processos biotecnológicos, frente ao modelo convencional tipo tanque agitado e aerado, além de proporcionarem altas transferências de oxigênio (CHISTI, 1998).

O biorreator air-lift é empregado em bioprocessos aeróbios sendo um biorreator que não apresenta partes móveis, e a dispersão gás-líquido é realizada pelo ar de entrada do aspersor (ONKEN e WEILAND, 1983).

O meio de cultura é deslocado no sentido ascendente impulsionado pelo deslocamento de bolhas de ar que são alimentadas pelo aspersor localizado ao fundo do vaso, retornando no sentido descendente por uma região distinta da região de subida.

As regiões dos biorreatores air-lifts consistem em uma região aspergida por gás, denominada de região de subida (“riser”) e uma região de descida (“downcomer”) por onde

retorna o meio reacional. A região de subida e de descida são interligadas no topo e na base do biorreator (CHISTI e MOO-YOUNG, 1987).

O principal objetivo dos reatores air-lifts é facilitar a troca de matéria entre as fases líquidas e gasosa, por exemplo, em processos que envolvam fotossíntese, possibilitando a dissolução de CO₂ da fase gasosa para a líquida, bem como a remoção de O₂ produzido da fase líquida para a gasosa (MERCHUK e GLUZ, 1999). Os biorreatores air-lift podem ser classificados em duas classes, os biorreatores de circulação interna e os de circulação externa (CHISTI, 1989).

No air-lift com circulação interna é constituído de uma única coluna dividida em duas regiões internas de circulação, existindo ainda uma subclassificação dos biorreatores de circulação interna, em “split-cylinder” e o air-lift de cilindros concêntricos ou com tubo interno (ONKEN e WEILAND, 1983).

Em air-lift com circulação interna de cilindros concêntricos, foco deste trabalho, a circulação de líquido é induzida pela injeção de ar no interior do tubo concêntrico (tubo interno). O movimento ascendente do gás aspergido na base do reator desloca a fase líquida e as células pelo interior do tubo interno. No topo do reator, a maior parte do gás se desprende do líquido e o líquido parcialmente isento de gás desce por uma região distinta daquela por onde ascendeu. Na base do biorreator (região de baixa pressão), o fluido descendente encontra a corrente ascendente de gás, sendo novamente carregado ascendentemente por esta, o que confere ao meio reacional uma circulação interna contínua (MERCHUK e GLUZ, 1999).

2.6.2 Biorreatores do tipo Tambor Rotativo

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

A construção do reator tipo tambor rotativo consiste basicamente em um cilindro horizontal em que o interior é preenchido parcialmente com substrato sólido e a aeração realizada na parte superior ao leito dentro do biorreator. A agitação é controlada e favorece a transferência de massa e calor no interior, além de permitir a distribuição uniforme dos nutrientes. Esse tipo de biorreator pode ser empregado em operações contínuas podendo até aumentar a produtividade em grande escala (LIMA, 2009).

Quando comparado com outras configurações de reatores, apesar da diminuição dos elementos que são colocados no interior do leito, algumas culturas de fungos levam um maior tempo para se desenvolverem diante das forças de cisalhamento. Assim o emprego do biorreator do tipo optativo deve ser restrito a microrganismos que tolerem agitação contínua (PANDEY *et al.* 2001). Ao estudar bioprocessos com fungos filamentosos, os reatores do tipo tambor rotativo podem não ser indicados, devido ao rompimento do micélio, interferindo negativamente na atividade microbiana e comprometendo a produtividade (ASHLEY *et al.* 1999; DURAND, 2003, RAGHAVARAO *et al.* 2002; RODRIGUEZ, 2005).

Ao trabalhar com *M. anisoplia* Roveda Júnior (2008) obteve resultados de resistência à agitação mecânica que indicaram não haver diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos da produção do fungo sem agitação do reator e com rotação a 1 RPM, uma e quatro vezes por dia, durante os 10 dias de incubação do fungo. A alta tolerância à agitação estava ligada à estrutura celular filamentosa do fungo, constituída por hifas ramificadas e septadas, não observando influência na produtividade final dos conídios (ROVEDA JÚNIOR, 2008).

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

Como citado, o objetivo geral deste trabalho é estudar o processo de biossolubilização de fósforo proveniente de concentrado de rocha fosfática empregando diferentes isolados fúngicos em diversos processos fermentativos e configurações de biorreatores. Algumas condições foram estudadas, variando-se a concentração celular inicial, a concentração de glicose, de concentrado de rocha fosfática em meio reacional. Em alguns biorreatores variou-se a vazão volumétrica de ar comprimido, a vazão de reciclo do meio reacional, a relação massa de biomassa e volume do meio sintético seletivo líquido e ainda a vazão volumétrica de ar comprimido úmido no processo de disponibilização de fósforo.

3.1 Material

3.1.1 Rocha fosfática

Para estudo da biossolubilização do fósforo utilizou-se como fonte do mineral o concentrado de rocha fosfática ultrafino (fluorapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$), fornecido pelo Complexo de Mineração de Tapira (Vale Fertilizantes), no Estado de Minas Gerais. De acordo com a empresa doadora, o concentrado de rocha fosfática (Figura 3.1) apresenta teor de P_2O_5 (35,7%), Fe_2O_3 (<6,5%), Al_2O_3 (<0,5%), MgO (<0,5%), TiO (<0,5%), SiO_2 (1 a 2,5%), F (<2,5%), CaO (42 a 45%). As partículas, caracterizadas previamente, apresentaram as seguinte porcentagens de massa retida acumulada (Malhas Tyler): #100 (0%), #200 (2%), @325 (12%), #400 (100%).

Acondicionou-se o mesmo em recipientes de polipropileno devidamente vedados sob a temperatura de $4 \pm 1^\circ\text{C}$.



Figura 3.1- Concentrado de rocha fosfática

3.1.2 Biomassa

A biomassa empregada em algumas etapas do trabalho foi bagaço de cana-de-açúcar, pré-tratado com explosão a vapor, na condição de baixa severidade (12 kgf/cm^2 , 8 min) gentilmente cedido pelo CTC (Centro de Tecnologia Canavieira) - Piracicaba/SP. A biomassa foi estocada sob refrigeração ($5 \pm 1^\circ\text{C}$). A biomassa era previamente deixada em repouso e lavada com água destilada, esterilizada via vapor saturado em autoclave durante 20 min, a 120°C e pressão de $1,0 \text{ kgf/cm}^2$ e posta em repouso por 24 horas em estufa a $100 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

3.2 Métodos

Com objetivo de explicar a metodologia empregada neste trabalho elaborou-se fluxogramas com as etapas desenvolvidas como apresentado nas Figuras 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5.

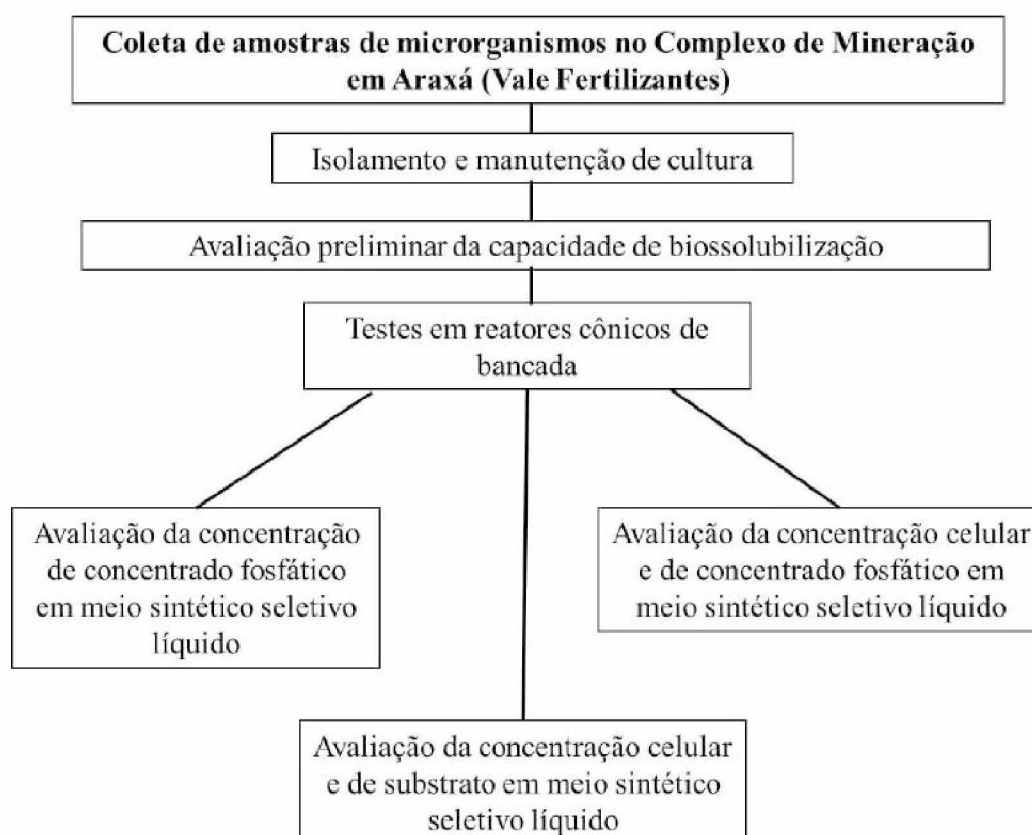


Figura 3.2 – Fluxograma dos ensaios de coleta, isolamento e avaliação preliminar da capacidade de bio-solubilização de isolados fúngicos

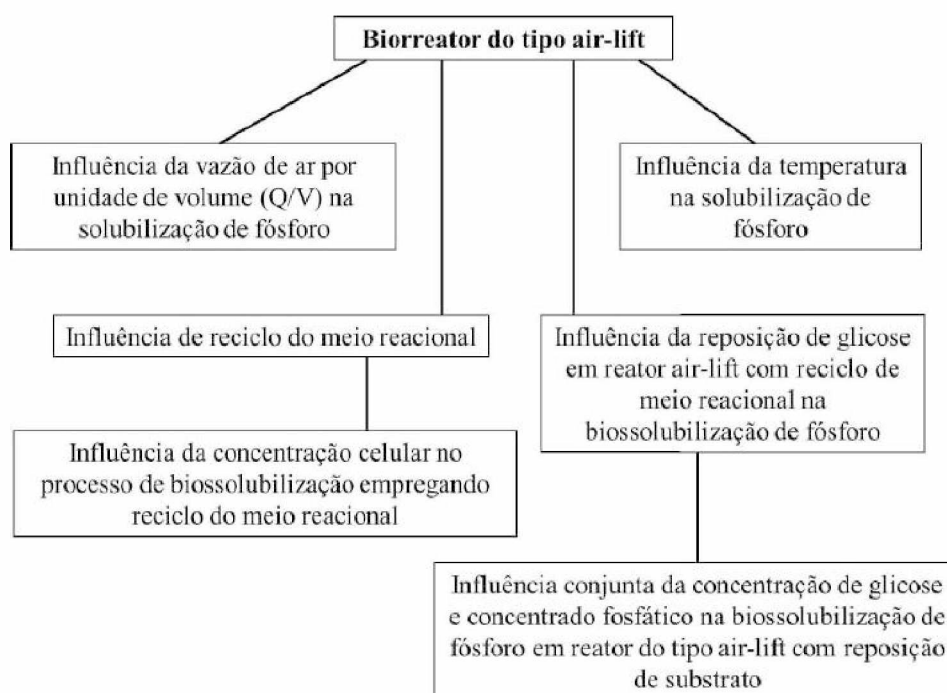


Figura 3.3 – Fluxograma dos ensaios realizados em biorreator air-lift

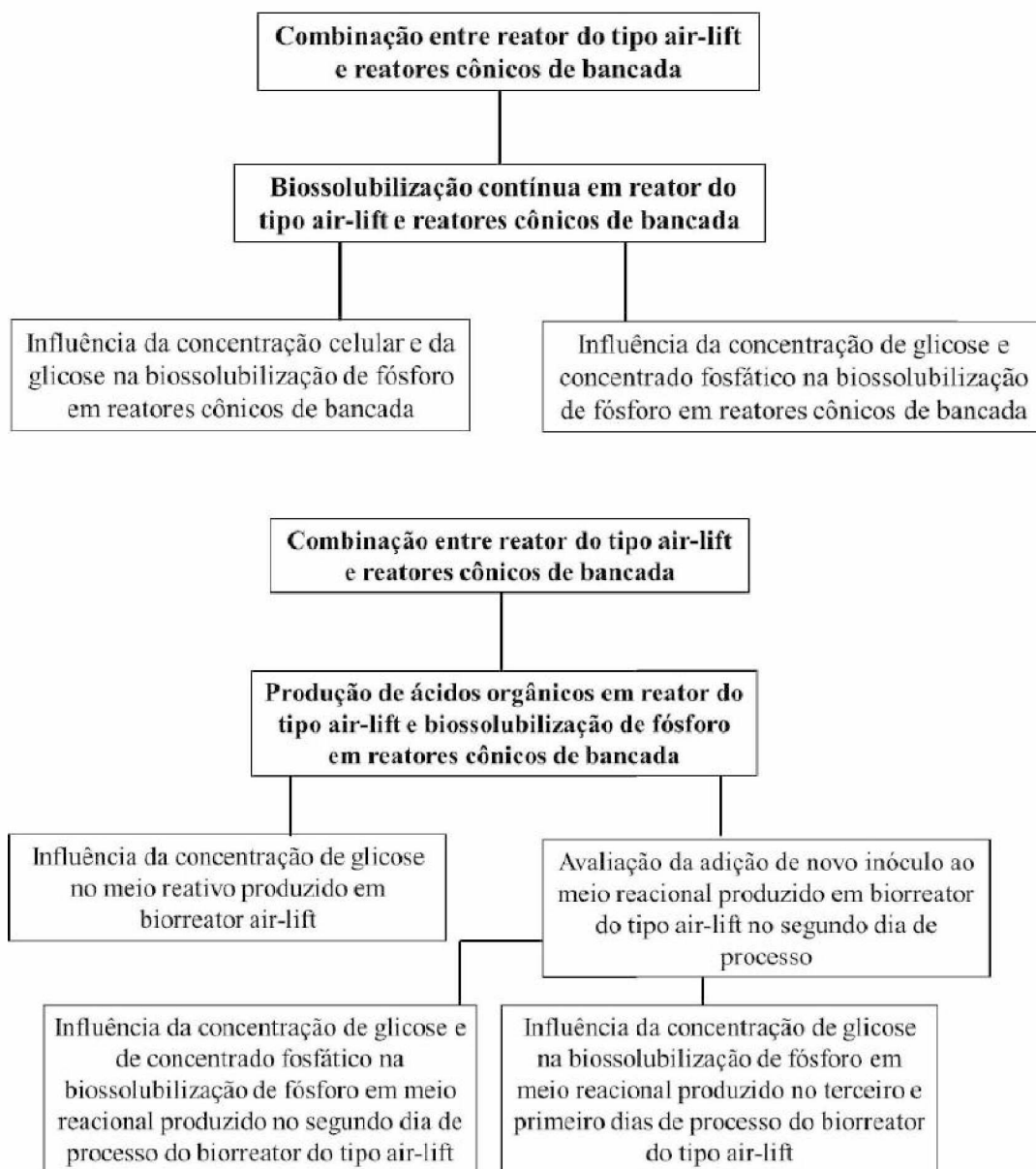


Figura 3.4 – Fluxograma dos ensaios realizados com combinação entre biorreator air-lift e reatores cônicos de bancada

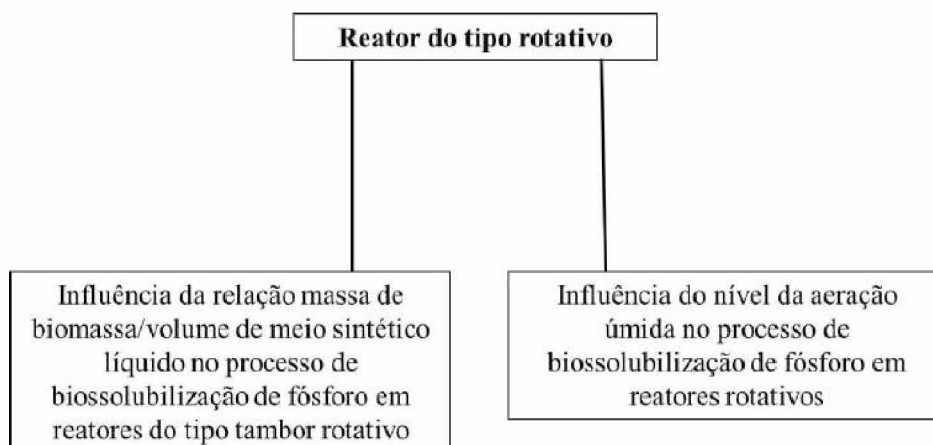


Figura 3.5 – Fluxograma dos ensaios realizados em biorreator rotativo

3.2 Testes preliminares

3.2.1 Isolamento e repicagem

Diversas amostras contendo microrganismos fúngicos apresentando colorações visivelmente diferentes foram coletadas aleatoriamente em diferentes pontos do Complexo de mineração carbonatítica de Araxá (Vale Fertilizantes) em Minas Gerais.

Os microrganismos foram isolados das amostras coletadas para possível obtenção das culturas puras. Os cultivos foram realizados por meio de repicagens para manutenção e manipulação dos isolados, utilizando, bico de bunsen, placas de Petri contendo meio sintético seletivo sólido (Tabela 3.1) e alça de repicagem. Estes procedimentos foram executados em ambiente apropriado, em câmara de fluxo laminar ou próximo à chama do bico de bunsen em ambiente desinfetado com álcool 70 %.

Inicialmente as placas contendo meio sintético sólido (Tabela 3.1) e os microrganismos isolados das amostras coletadas foram incubadas a $27 \pm 3^\circ\text{C}$ por período de 4 a 7 dias com a finalidade de estimular a esporulação. Após a esporulação foi observado visualmente microrganismos com diferentes aspectos, sendo assim os isolados puros identificados pelos números: 1, 1', 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 18 e 19. Alguns isolados fúngicos, por exemplo, o 1, ao ser isolado apresentou pigmentação diferente da amostra original, surgindo assim dois isolados derivados da amostra 1.

Tabela 3.1 - Meio sintético-seletivo sólido (PIKOVSKAYA, 1948).

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

Em seguida os microrganismos isolados foram repicados e cultivados em placas de Petri contendo meio sintético seletivo sólido (Tabela 3.1) por um período de 4 a 7 dias a $27 \pm 3^\circ\text{C}$. Este cultivo foi realizado com a finalidade de desenvolver o microrganismo.

Utilizou-se glicerol 10% previamente esterilizado em eppendorf para armazenar a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ amostras de meio sintético seletivo sólido contendo as colônias dos microrganismos isolados com objetivo de preservar a viabilidade dos mesmos por um longo período. Para reativar o microrganismo armazenado em glicerol, realizou-se o repique em placas de Petri com meio sintético seletivo sólido (Tabela 3.1). Para garantir a viabilidade das culturas renovou-se as amostras armazenadas em óleo mineral a cada 3 meses.

3.2.2 Avaliação preliminar da capacidade de biossolubilização

Os 16 isolados fúngicos foram submetidos à classificação quantitativa, com a finalidade de identificar entre os isolados aqueles com maior capacidade de solubilização de fósforo proveniente de concentrado de rocha fosfática em meio reacional líquido (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Meio sintético seletivo modificado líquido (SAMPAIO *et al.* 2003).

Componente	Concentração (g/L)
Dextrose	10
Extrato de Levedura	0,5
Concentrado de rocha fosfática	24
Sulfato de Magnésio	0,1
Sulfato de amônio	0,5
Sulfato ferroso	0,001
Sulfato de manganês	0,001
Cloreto de potássio	0,2

Para realização deste ensaio foi preparado o meio sintético seletivo modificado líquido (Tabela 3.2) em que o fosfato tricálcico foi substituído pelo concentrado de rocha fosfática ultrafino (SUDHAKARA REDDY *et al.* 2002).

Volumes de 100 mL do meio sintético seletivo modificado líquido foram distribuídas em reatores cônicos de bancada de 500 mL, devidamente fechados com chumaços de algodão (Figura 3.6) e em seguida esterilizados via vapor saturado em autoclave durante 20 min, a 121°C e pressão de 1,0 kgf/cm². Após resfriamento a temperatura ambiente, os isolados fúngicos foram inoculados nos reatores cônicos de bancada resultando em uma massa celular de aproximadamente 0,125 g/L. A solubilização de fósforo pelos 16 isolados em meio seletivo modificado líquido foi avaliada, inicialmente, após 12 dias a temperatura ambiente ($27 \pm 3^\circ\text{C}$) em condição estática. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.



Figura 3.6- Avaliação preliminar da capacidade de biossolubilização dos 16 isolados fúngicos em meio sintético seletivo modificado líquido em reatores cônicos de bancadas a $27 \pm 3^\circ\text{C}$ após 12 dias.

Após 12 dias foram realizadas em todas as amostras as análises para determinação do fósforo solúvel de acordo com a metodologia analítica descrita por Alves (2012) apresentada no item 3.7. Todos os testes foram realizados em duplicata.

3.3 Testes em reatores cônicos de bancada

3.3.1 Avaliação da concentração de concentrado de rocha fosfática em meio reacional líquido

A influência da concentração de concentrado de rocha fosfática foi avaliada no processo de solubilização de fósforo em meio reacional líquido pelos 4 isolados que apresentaram maior capacidade diante da avaliação preliminar da capacidade de biossolubilização descrita no item 3.2.2. O meio reacional líquido apresentou a composição de acordo com a Tabela 3.2, exceto pela concentração de concentrado de rocha fosfática que foi empregado a 10, 20 e 30 g/L. Os ensaios foram realizados em reatores cônicos de bancada de volume útil de 500 mL, a temperatura ambiente ($27 \pm 3^\circ\text{C}$), sem agitação durante 7 dias. Células dos 4 microrganismos foram inoculadas em 100 mL de meio sintético seletivo líquido originando uma concentração celular final de 0,125 g/L. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas. O fósforo solúvel foi quantificado de acordo com o item 3.7.

3.3.2 Avaliação da concentração celular e de substrato em meio reacional líquido

Após avaliar a influência da concentração de fósforo em meio reacional líquido no processo de solubilização pelos 4 isolados fúngicos, analisou-se a influência do inóculo e de substrato (glicose) no processo.

Os ensaios foram realizados empregando meio seletivo sintético líquido (Tabela 3.2) em que o concentrado de rocha fosfática foi utilizado na concentração em que os isolados apresentaram maior capacidade de biossolubilização nos ensaios descritos no item 3.2.2. A concentração de substrato (glicose) foi de 10 e 20 g/L e a concentração celular nos reatores cônicos de bancada foi de 0,125 e 0,165 g/L. Os testes foram realizados em duplicatas em reatores cônicos de bancada durante 7 dias como descrito no item 3.2.2 e o fósforo solúvel foi quantificado de acordo com o item 3.7.

3.3.3 Avaliação da concentração celular e de concentrado de rocha fosfática em meio reacional líquido

Entre os 4 microrganismos utilizados nos testes descritos nos itens 3.2.3 e 3.2.4, 2 indicaram maior capacidade de solubilizar o fósforo proveniente do concentrado de rocha fosfática, sendo estes empregados nos testes seguintes. Fixou-se a concentração de substrato (glicose) em meio líquido diante do resultado obtido no item 3.2.4, variando-se assim a concentração celular entre 0,165 e 0,395 g/L e a concentração de concentrado de rocha fosfática entre 5 e 10 g/L. Os testes foram realizados em duplicatas em reatores cônicos de bancada durante 7 dias como descrito no item 3.2.2 e o fósforo solúvel foi quantificado de acordo com o item 3.7.

Ao final do teste descrito neste item o microrganismo que apresentou maior capacidade de bio-solubilização foi enviado à identificação e empregado em todos testes subsequentes. A identificação foi realizada por testes bioquímicos de taxonomia convencional pela Fundação André Tosello de Pesquisa e Tecnologia (Campinas/SP). A cultura de fungo foi identificada por métodos moleculares com a amplificação do DNA alvo através da reação em cadeia da polimerase (PCR) por meio dos oligonucleotídeos iniciadores SRER (WHITE *et al.* 1990).

3.4 Biorreator do tipo air-lift

O biorreator air-lift (Figuras 3.7 e 3.8) utilizado neste trabalho foi construído na Oficina mecânica da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia. A temperatura do bioerreator foi controlada por banho termostatizado modelo Optherm HAAKE DC3 e a velocidade do ar comprimido ascendente foi medida por anemômetro Hot Wire Anemometer HT-9829. O biorreator do tipo air-lift empregado neste trabalho apresentou 32 cm de altura (cilindro externo), 9 cm de diâmetro interno do cilindro interno (espessura igual a 0,5 cm), 12cm de diâmetro interno do cilindro externo (espessura igual a 0,5 cm), totalizando um volume útil igual a 3000 mL. As configurações do biorreator air-lift são apresentadas na Figura 3.7 e a montagem do biorreator air-lift é apresentada na Figura 3.8.

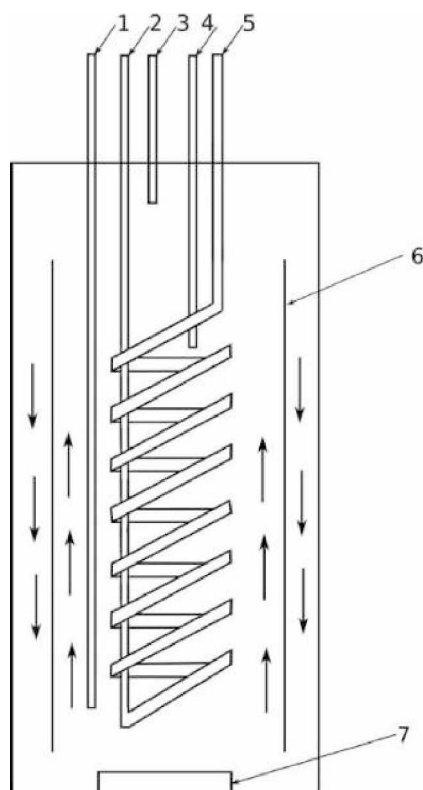


Figura 3.7- Esquema do reator air-lift 1 – Reciclo do meio reacional; 2 e 5 – Serpentina. 3 – Saída de gás; 4 – Amostrador; 6 – Cilindro interno; 7 – Placa de porosa (aeração ascendente)



Figura 3.8 – Unidade do biorreator air-lift

3.4.1 Influência da vazão de ar por unidade de volume (Q/V) na solubilização de fósforo em biorreator do tipo air-lift

Após a realização dos testes descritos no item 3.3.3 selecionou-se um único microrganismo aquele que se destacou diante de sua capacidade de solubilização de fósforo em meio seletivo sintético líquido, sendo este empregado nos testes subsequentes em biorreator do tipo air-lift.

No primeiro teste realizado em biorreator air-lift avaliou-se a influência da vazão de ar por unidade de volume, ou seja, o volume de ar comprimido por volume de meio reacional líquido por minuto (VVM), a qual foi avaliada em 0,5 e 1,0 VVM. A concentração de substrato e de concentrado de rocha fosfática no meio reacional líquido (Tabela 3.2) foram determinadas pelos testes preliminares realizados em reatores cônicos de bancada descritos nos itens 3.3.2 e 3.3.3.

A concentração celular inicial igual a 3,8g/L em reator do tipo air-lift foi acompanhada diariamente durante os 6 dias de operação do reator, juntamente com o fósforo solúvel em meio (item 3.7). Avaliou-se a ainda a produção de ácidos orgânicos e consumo de glicose por cromatografia líquida (HPLC) realizada em cromatógrafo marca Shimadzu modelo LC-20A Prominence, coluna SUPELCOGEL C-610H. Empregou-se como fase móvel ácido fosfórico (0,1%) com vazão de 0,5 mL/min, temperatura do forno 32°C e volume de injeção de 20 µL. Todos os testes foram feitos em duplicata.

3.4.2 Influência da temperatura na solubilização de fósforo em reator do tipo air-lift

Após avaliar a influência da vazão de ar comprimido por volume de meio reacional líquido por minuto (VVM), analisou-se a influência da temperatura no processo de solubilização de fósforo em reator air-lift.

Durante 6 dias acompanhou-se a concentração celular, o consumo de glicose, a concentração de ácidos orgânicos e a solubilização de fósforo (item 3.7) em reator air-lift utilizando a vazão de ar comprimido por volume de meio líquido por minuto (VVM) em que o microrganismo apresentou maior capacidade de biossolubilização (item 3.4.1). As temperaturas de operação variaram em 36 e 40 ± 0,5°C, sendo a mesma controlada por um banho termostatizado modelo Optherm HAAKE DC3. Todas as análises foram realizadas em duplicatas.

3.4.3 Influência de reciclo do meio reacional em reator air-lift

Definida a vazão de ar comprimido por volume de meio reacional líquido por minuto (VVM), analisou-se a influência do reciclo de meio reacional no processo de solubilização de fósforo em reator do tipo air-lift. Durante o período de 6 dias acompanhou-se o crescimento celular, a produção e consumo de metabólitos e a solubilização de fósforo (item 3.7) em reator air-lift operando a temperatura que apresentou melhores resultados de acordo com o item 3.4.2. A vazão de reciclo de meio reacional variou entre 200 e 400 mL/min, empregando a vazão de ar comprimido por volume de meio líquido por minuto (VVM) em que o microrganismo apresentou maior capacidade de biossolubilização (item 3.3.1).

A temperatura foi controlada por um banho termostatizado modelo Optherm HAAKE DC3 e o reciclo do meio líquido por uma bomba peristáltica Easy-load Masterfle Model 7518-00. Ambos os reatores foram operados empregando a mesma composição de meio reacional líquido com concentração de glicose e concentrado de rocha fosfática obtidas nos testes descritos nos itens 3.3.2 e 3.3.3. Alíquotas foram coletadas diariamente para acompanhamento do crescimento celular, concentração de glicose, ácidos orgânicos e fósforo (item 3.7).

3.4.3.1 Influência da concentração celular no processo de biossolubilização empregando reciclo do meio reacional

Avaliou-se a concentração celular inicial no processo nas mesmas condições do item 3.4.3. Os resultados obtidos com a concentração celular inicial do inóculo igual a 0,5 e 2 g/L, foram comparados com os alcançados empregando a concentração inicial igual a 3,8 g/L, descrita no item 3.4.3. Alíquotas foram coletadas diariamente para acompanhamento da concentração celular, produção e consumo de metabólitos e solubilização de fósforo (item 3.7).

3.4.4 Estudo da biossolubilização de fósforo diante da reposição de glicose em reator air-lift com reciclo de meio reacional

Estudou-se o processo de biossolubilização de fósforo proveniente de concentrado de rocha fosfática em reator air-lift com reposição de glicose empregando as condições experimentais estudadas em itens anteriores em que se obteve melhores resultados de fósforo solúvel em meio reacional. Durante o período de 6 dias acompanhou-se diariamente a

concentração celular, a produção e consumo de metabólitos e a solubilização de fósforo (item 3.7) em reator air-lift com reciclo de meio reacional. A reposição de glicose foi realizada sempre que a concentração da mesma ao ser quantificada através de cromatografia líquida (HPLC) indicava valores próximos a 1g/L.

3.4.4.1 Influência conjunta da concentração de glicose e concentrado de rocha fosfática na bioessolubilização de fósforo em reator do tipo air-lift com reposição de substrato

Estudou-se conjuntamente a influência da concentração de glicose e concentrado de rocha fosfática no processo de bioessolubilização de fósforo durante 6 dias. A concentração de glicose foi de 5, 10 e 15 g/L enquanto a concentração de concentrado de rocha fosfática foi de 5 e 10 g/L. Aliquotas foram coletadas diariamente para acompanhamento da concentração celular, produção e consumo de metabólitos e solubilização de fósforo (item 3.7).

3.5 Combinação entre reator do tipo air-lift e reatores cônicos de bancada

3.5.1 Bioessolubilização sequencial em reator do tipo air-lift e reatores cônicos de bancada

3.5.1.1 Influência da concentração celular e concentrado de rocha fosfática na bioessolubilização de fósforo em reatores cônicos de bancada

Inicialmente, estudou-se a bioessolubilização de fósforo em reator air-lift empregando meio reacional líquido (Tabela 3.2) com as concentrações de glicose e concentrado de rocha fosfática otimizadas a partir de testes realizados nos itens anteriores. A vazão de ar comprimido por volume de meio líquido por minuto (VVM) empregada foi a que apresentou melhores resultados em fósforo solúvel estudada anteriormente. Durante o período de 6 dias acompanhou-se a concentração celular, a produção e consumo de metabólitos e a solubilização de fósforo (item 3.7) em reator do tipo air-lift operando a $28 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Após determinado período (análise de resultados de concentração de ácidos orgânicos) empregou-se o meio reacional produzido em reator air-lift em reatores cônicos de bancada. Utilizou-se 100 mL do meio reacional em cada reator cônico de bancada com o objetivo de avaliar a influência da adição de concentrado de rocha fosfática (concentração previamente estudada) e de novo inóculo ao volume reacional no processo de bioessolubilização. Os testes foram realizados em duplicatas sob temperatura ambiente ($27 \pm 3^{\circ}\text{C}$), agitação constante igual a 100 RPM, em que durante 6 dias acompanhou-se a concentração celular, a produção e

consumo de metabólitos e a solubilização de fósforo (item 3.7) em reatores cônicos de bancada. Todos os testes foram realizados em duplicata.

3.5.1.2 Influência do tempo reacional em reator do tipo air-lift, da concentração de glicose e de concentrado de rocha fosfática na bio-solubilização de fósforo em reatores cônicos de bancada

Para avaliar a influência do tempo de produção de meio reacional em reator do tipo air-lift no processo de bio-solubilização de fósforo em reatores cônicos de bancada empregaram-se volumes do meio produzido em dois dias diferentes, terceiro e quarto dias de processo.

Estudou-se ainda conjuntamente, a influência da concentração de concentrado de rocha fosfática e de glicose em reatores cônicos de bancada, em que ambos variaram em 5 e 10 g/L. Os testes foram realizados em duplicatas sob temperatura ambiente ($27 \pm 3^\circ\text{C}$), agitação constante igual a 100 rpm, em que durante 6 dias acompanhou-se o concentração celular, a produção e consumo de metabólitos e a solubilização de fósforo (item 3.7).

3.5.2 Produção de ácidos orgânicos em reator do tipo air-lift e bio-solubilização de fósforo em reatores cônicos de bancada

3.5.2.1 Influência da concentração de glicose no meio reacional produzido em biorreator do tipo air-lift

A concentração de ácidos orgânicos em reator air-lift preenchido pelo meio reacional líquido (Tabela 3.2) sem adição de concentrado de rocha fosfática empregando glicose a 5 e 10 g/L, foi realizada mantendo o concentrado de rocha fosfática igual a concentração que apresentou melhores resultados anteriormente. A temperatura foi controlada por um banho termostático modelo Optherm HAAKE DC3 e o reciclo do meio líquido por uma bomba peristáltica modelo Easy-load Masterfle Model 7518-00. Durante 6 dias acompanhou-se o concentração celular, a produção e consumo de metabólitos e a solubilização de fósforo (item 3.7).

3.5.2.2 Avaliação da adição de novo inóculo ao meio reacional produzido em biorreator do tipo air-lift no segundo dia de processo

A influência da adição de novo inóculo ao meio reacional produzido no segundo dia de processo e troca de inóculo proveniente de reator air-lift foi avaliada em reatores cônicos de bancada ao adicionar glicose a 10 g/L e concentrado de rocha fosfática a 5g/L. Os testes

foram realizados em duplicatas sob temperatura ambiente ($27 \pm 3^\circ\text{C}$), agitação constante igual a 100 RPM. Durante 6 dias acompanhou-se o concentração celular, a produção e consumo de metabólitos e a solubilização de fósforo (item 3.7).

3.5.2.3 Influência da concentração de glicose e de concentrado de rocha fosfática na bio-solubilização de fósforo em meio reacional produzido no segundo dia de processo do biorreator do tipo air-lift

Avaliou-se o processo de bio-solubilização em reatores cônicos de bancada com adição de glicose e concentrado de rocha fosfática em concentrações iguais a 5, 10 e 15 g/L; 5 e 10 g/L, respectivamente. Os testes foram realizados em duplicatas sob temperatura ambiente ($27 \pm 3^\circ\text{C}$), agitação constante igual a 100 RPM, em que durante 6 dias acompanhou-se o concentração celular, a produção e consumo de metabólitos e a solubilização de fósforo (item 3.7) durante 6 dias.

3.5.3.4 Influência da concentração de glicose na bio-solubilização de fósforo em meio reacional produzido no terceiro e primeiro dias de processo do biorreator do tipo air-lift

Ao empregar o meio reacional produzido em reator air-lift (item 3.4.3) no terceiro e primeiro dias de processo (isento de concentrado de rocha fosfática) avaliou-se o processo de bio-solubilização em reatores cônicos de bancada com adição de glicose e concentrado de rocha fosfática. A concentração de glicose empregada foi de 5 e 10 g/L, enquanto a de concentrado de rocha fosfática foi de 5 g/L. Os testes foram realizados em duplicatas sob temperatura ambiente ($27 \pm 3^\circ\text{C}$), agitação constante igual a 100 rpm. Durante 6 dias acompanhou-se o concentração celular, a produção e consumo de metabólitos e a solubilização de fósforo (item 3.7).

3.6 Reatores do tipo tambor rotativo

3.6.1 Influência da relação massa de biomassa/volume de meio sintético líquido no processo de bio-solubilização de fósforo em reatores do tipo tambor rotativo

Os reatores do tipo tambor rotativo (Figura 3.9) foram a terceira configuração de reator utilizada para estudar o processo de bio-solubilização de fósforo derivado de concentrado de rocha fosfática. A unidade de reatores do tipo tambor rotativo foi construída na oficina mecânica da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de

Uberlândia. Os três tambores do tipo rotativo foram construídos com 900 mL de volume útil. A frequência dos tambores foi controlada pelo inversor CFW10 Easydrive, e a velocidade de ar comprimido foi ajustada pelo anemômetro Hot Wire Anemometer HT-9829.



Figura 3.9 - Reator do tipo tambor rotativo

Neste tipo de reator, observou-se que o contato do microrganismo com o meio reacional e consequente biossolubilização ocorreu por tombamento e verificou-se ainda a necessidade de se trabalhar com um meio reacional com menor umidade.

Com o objetivo de fornecer um suporte para o concentração do microrganismo e de tornar o meio reacional menos úmido utilizou-se bagaço de cana-de-açúcar (item 3.1.2). A biomassa foi previamente esterilizada via vapor saturado em autoclave durante 20 min, a 120°C e pressão de 1,0 kgf/cm².

Os testes iniciais em reatores rotativos foram realizados empregando 39,53 g e 28,62 g de biomassa e 100, 80 e 50 mL de meio reacional líquido (Tabela 3.2) com concentração celular inicial igual a 3,8 g/L. Concentrações de glicose e concentrado de rocha fosfática otimizadas anteriormente foram empregadas no processo de biossolubilização de fósforo em reatores rotativo sob a rotação igual a 1 rpm (inversor CFW10 Easydrive).

Ao trabalhar com volume do meio reacional igual a 100 mL as amostras do meio reacional dos tambores rotativos eram coletadas diariamente durante 4 dias. Ao estudar os volumes de 80, 50 e 20 mL cada reator do tipo tambor reativo foi empregado como reator de sacrifício, ou seja, cada reator correspondia a uma amostra. Assim com o objetivo de

padronizar a coleta de amostras no momento de extração em reatores rotativos completou-se o volume de meio líquido para 100 mL. Por exemplo, para o teste em que utilizou 50 mL de meio reacional líquido inicialmente, adicionou-se 50 mL de meio para realizar a extração no reator rotativo. A extração foi realizada utilizando papel filtro em que o bagaço de cana de açúcar era retido. Durante 3 dias acompanhou-se a concentração celular, a produção e consumo de metabólitos e a concentração de fósforo solúvel (item 3.7).

3.6.2 Influência do nível da aeração úmida no processo de biossolubilização de fósforo em reatores rotativos

Após avaliar a influência da relação massa de biomassa/volume de meio reacional líquido no processo de biossolubilização de fósforo em reatores do tipo rotativo, avaliou-se a influência da aeração úmida no processo.

Adotando a melhor relação entre volume de bagaço de cana de açúcar e volume de meio reacional líquido estudada no item 3.6.1, avaliou-se a influência de ar comprimido úmido a 11,52; 8,06 e 2,88 VVM. A corrente de ar comprimido alimentada tornava-se úmida ao entrar em contato com água deionizada no interior de um quitasato, deixando o mesmo com teor de umidade acompanhando a cada duas horas. O teor umidade do meio reacional foi determinado de acordo com a Norma ASTM E871-82.

Cada reator do tipo tambor reativo foi empregado como reator de sacrifício, ou seja, cada reator correspondia a uma amostra em que no momento da extração em reatores rotativos completou-se o volume de meio líquido para 100 mL. Durante 3 dias acompanhou-se a concentração celular, a produção e consumo de metabólitos e a concentração de fósforo solúvel (item 3.7).

3.7 Metodologia analítica

3.7.1 Determinação de fósforo solúvel

A determinação do fósforo solúvel em solução foi realizado de acordo com o procedimento descrito em APHA – AWWA – WEF - part 4000 Inorganic nonmetallic constituents, 4500-P Phosphorus.

3.7.1.2 Fósforo Solúvel

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

3.7.1.3 Método colorimétrico

Após o procedimento descrito anteriormente, o ortofosfato liberado foi determinado pelo método colorimétrico do fosfato vanadomolibdato.

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

Para leitura do resultado de fósforo empregou-se a proporção de 2 mL do extrato líquido da amostra, ou o mesmo diluído, para 1 mL de solução de vanadomolibdato de amônio seguido de agitação vigorosa. Após 2 minutos para desenvolvimento da cor, foi determinada a absorbância das amostras em espectrofotômetro a 420 nm. Água destilada foi utilizada como branco, seguindo o mesmo procedimento dos extratos. A curva de calibração foi constituída pelos pontos de 1,0 mg/L, 3,0 mg/L, 5,0 mg/L, 7,5 mg/L e 10,0 mg/L. A solução padrão empregada foi de fosfato de potássio monobásico anidro P.A (KH_2PO_4), da marca Vetec.

3.7.2 Determinação de concentração celular

A concentração celular (densidade microbiológica) foi determinada de acordo com Vieira *et al.* (2009) através do cálculo de massa seca. Essa foi obtida pela centrifugação (centrífuga da macr Beckman J-25 com torração igual a 8000 RPM) de um volume conhecido (2, 5 ou 10 mL) da suspensão celular, seguida pela resuspensão do precipitado em volume conhecido de água destilada (2, 5 ou 10 mL) em recipiente previamente tarado, seguida da introdução do sistema (recipiente + células) em estufa a $90 \pm 1,0^\circ\text{C}$. Após 24 horas, o recipiente foi acondicionado em dessecador com sílica gel até resfriamento e após a verificação de peso constante a massa celular seca foi anotada. A diferença de massa correspondeu à massa de células presente no volume de suspensão celular.

3.7.3 Determinação da concentração de metabólitos

As análises das concentrações de glicose e ácidos orgânicos foram realizadas por HPLC (High Performance Liquid Chromatography), marca Shimadzu modelo LC-20A Prominence, coluna SUPELCOGEL C-610H na qual os componentes são separados e detectados por refração de luz.. Empregou-se como fase móvel ácido fosfórico (0,1%), com fluxo de 0,5 mL/min, temperatura do forno 32 °C e volume de injeção de 20 µL. As concentrações de açúcares e ácidos foram calculados com auxílio de curvas padrão realizadas previamente.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e repicagem

Após a coleta de diversas amostras contendo microrganismos fúngicos no Complexo de Mineração carbonatítico de Araxá (Vale Fertilizantes) em Minas Gerais, como descrito no item 3.2.1, realizou-se o cultivo e manutenção das culturas.

Após a esporulação foi observado microrganismos com diferentes aspectos, encontrando-se assim 16 isolados fúngicos identificados aleatoriamente pelos números: 1, 1', 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 18 e 19. Isolados como 1 e 1' originaram da mesma amostra coletada empregada para realizar o isolamento inicial, sendo que ao longo da manutenção do microrganismo apresentaram diferentes colorações, originando então dois isolados fúngicos. Estes isolados foram utilizados nos testes subsequentes. Na figura 4.1, tem-se o isolado fúngico 8 cultivado em meio sintético seletivo sólido em placa de Petri.



Figura 4.1- Isolado fúngico 8 – um dos fungos previamente selecionados para este estudo.

4.2 Avaliação preliminar da capacidade de biossolubilização

Ao realizar a avaliação preliminar da capacidade de biossolubilização de fósforo proveniente de concentrado de rocha fosfática em meio reacional líquido (Tabela 3.2) pelos 16 isolados fúngicos durante 12 dias em reatores cônicos de bacada sem agitação, os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Resultados da avaliação preliminar da capacidade de biossolubilização para os 16 Isolados Fúngicos empregando meio seletivo modificado líquido

Isolado	Fóforo solúvel (ppm)	Média fósforo solúvel (ppm)	Desvio Padrão
11	7,16 7,42	7,29	0,18
5	49,16 50,26	49,71	0,78
12	28,42 28,99	28,71	0,40
1'	63,03 63,98	63,51	0,67
1	10,15 10,46	10,31	0,22
2	44,02 44,62	44,32	0,42
15	42,32 42,65	42,49	0,23
18	38,12 39,01	38,57	0,63
3	7,02 6,12	6,57	0,64
4	29,05 28,12	28,59	0,66
6	27,05 26,52	26,79	0,37
10	66,08 65,26	65,67	0,58
16	5,032 4,65	4,84	0,27
19	44,03 43,13	43,58	0,64
9	40,02 38,98	39,50	0,74
8	60,12 58,87	59,50	0,88

P - Fósforo; Concentrado de rocha fosfática – 24 g/L.

Ao observar os resultados de fósforo solúvel apresentados na Tabela 4.1, verifica-se que 4 isolados indicaram resultados expressivos no processo de solubilização de fósforo proveniente de concentrado de rocha fosfática, sendo eles 8, 5, 10 e 1'.

O meio seletivo modificado líquido (Tabela 3.2) empregado continha cerca de 3740,96 ppm de fósforo (24 g/L de concentrado de rocha fosfática, teor médio de 37,5% de P_2O_5). O isolado fúngico 10, pelo mecanismo de solubilização, tornou disponível em meio reacional líquido cerca de 1,76% do fósforo presente no concentrado de rocha fosfática.

Para os isolados 1', 8 e 5, as percentagens de fósforo solúvel alcançadas em meio reacional líquido foram respectivamente, 1,69, 1,58 e 1,31%. Percentagens essas correspondentes às respectivas concentrações de fósforo solúvel 63,22; 59,10 e 49,01 ppm. Valores estes aqueles (13-31 ppm) encontrados por Wahid e Mehana, (2000) e Abd-alla e Omar, (2001) ao estudarem *Aspergillus niger* e rocha fosfática. Concentrações superiores entre 300-400 ppm (VASSILEV *et al.*, 1995 e VASSILEVA *et al.* 1998) e entre 219-382 ppm (SCHNEIDER *et al.* 2010) foram alcançadas por esses autores empregando *Aspergillus niger* e rocha fosfática.

Concentrações variáveis de P solúvel foram alcançadas em estudos com diferentes tipos de rocha fosfática, microrganismo e condições de cultivo. Bojinova *et al.* (1997) obtiveram P solúvel em concentrações de 747 ppm usando ácido cítrico industrial produzido por *A. niger*.

Cereti *et al.* (2004) ao trabalharem com *Aspergillus niger* alcançaram concentrações de P solúvel de 750 ppm de rocha fosfática de origem sedimentar, utilizando um biorreator descontínuo onde as amostras foram renovadas em períodos de 48h durante cultivo de 8 dias. Diante de concentrações superiores de fósforo solúvel encontradas na literatura empregando diferentes condições experimentais bem como diferentes biorreatores, procurou-se focar neste trabalho o processo de biossolubilização de fósforo proveniente de concentrado de rocha fosfática a partir de diferentes condições operacionais.

4.3 Testes em reatores cônicos de bancada

4.3.1 Avaliação da concentração de concentrado de rocha fosfática em meio reacional líquido

Ao avaliar a influência da concentração de concentrado de rocha fosfática em meio reacional líquido durante 7 dias com concentração celular inicial igual a 0,125 g/L como descrito no item 3.2.3 pelos quatro isolados que apresentaram maior capacidade de biossolubilização, obteve-se a Figura 4.1 apresentada a seguir.

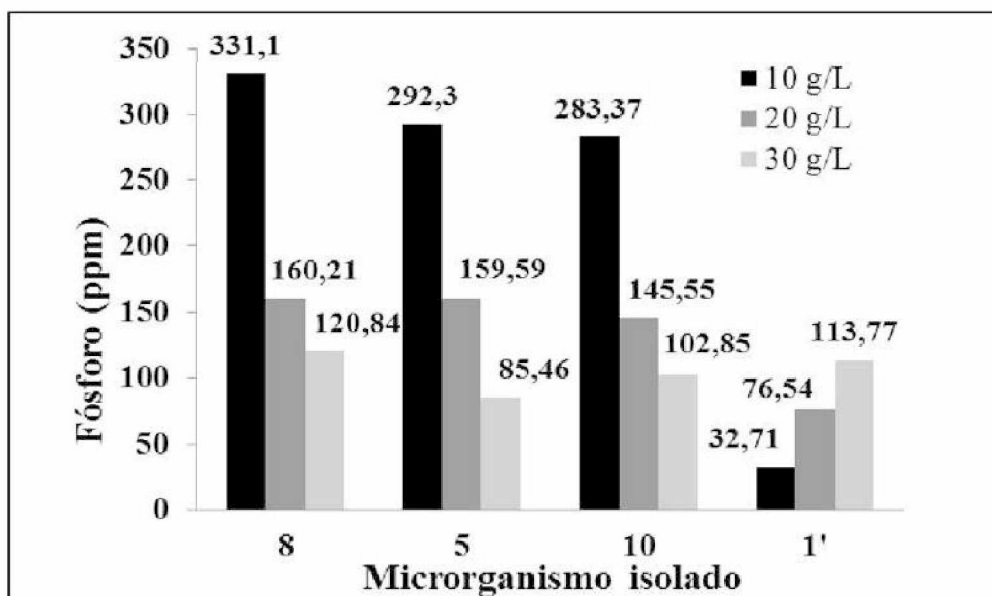


Figura 4.1- Avaliação da influência concentração de concentrado de rocha fosfática em meio reacional líquido em reatores cônicos de bancada.

Ao analisar a Figura 4.1 observa-se que o emprego de concentrações menores de concentrado de rocha fosfática implicaram em maiores concentrações de fósforo solúvel, exceto para o isolado 1'. O isolado 8 apresentou maior capacidade de solubilização em todas as concentrações de concentrado de rocha fosfática empregadas, disponibilizando após 7 dias de processo em meio líquido sintético modificado cerca de 21,24% do fósforo total presente na concentração de 10 g/L (1558,73 ppm de P).

4.3.2 Avaliação da concentração celular e de substrato em meio reacional líquido

Após avaliar a influência da concentração de concentrado de rocha fosfática em meio seletivo líquido como descrito no item 3.3.1, estudou-se a influência conjunta da concentração celular e de substrato no processo de biossolubilização (item 3.3.2). A concentração de substrato (glicose) utilizada foi igual a 10 e 20 g/L, a concentração celular nos reatores cônicos de bancada igual a 0,125 e 0,165 g/L e a concentração de concentrado de rocha fosfática foi fixada em 5 g/L (779,24 ppm de P) de acordo com resultados obtidos no item 4.3.1. Os resultados obtidos após 7 dias de processo são apresentados nas Figuras 4.2 e 4.3 para concentrações de substrato de 10 e 20 g/L, respectivamente.

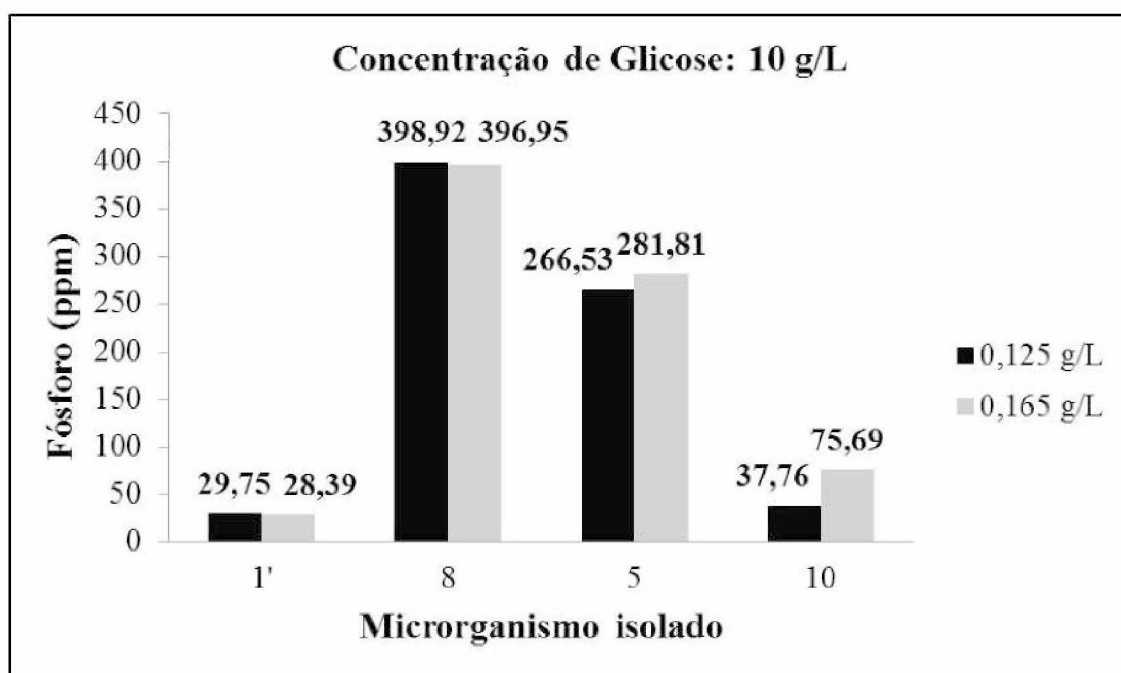


Figura 4.2- Avaliação da concentração celular em meio reacional líquido em reatores cônicos de bancada. Concentração de glicose: 10 g/L.

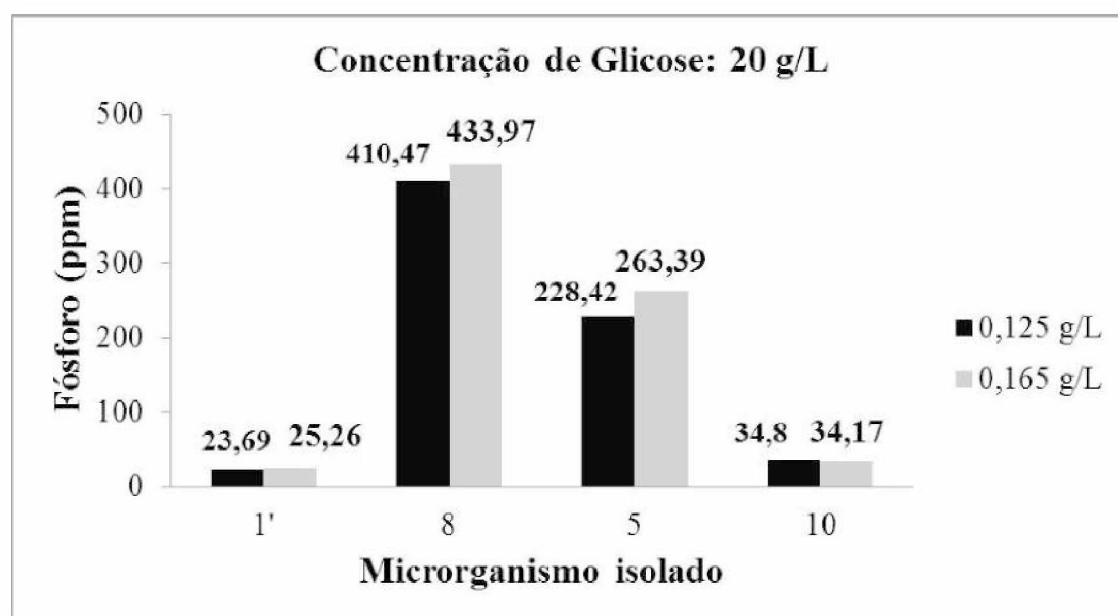


Figura 4.3- Avaliação da concentração celular em meio reacional líquido. Concentração de glicose: 20 g/L.

Ao avaliar a Figura 4.2 observa-se que o isolado 8 apresentou maior capacidade de solubilização entre os outros isolados para as concentrações celulares iguais a 0,125 e 0,165g/L, atingindo, respectivamente, 398,92 e 396,95 ppm de fósforo solúvel, após 7 dias de processo. O isolado 5 alcançou 266,53 ppm de P para concentração celular de 0,125 g/L e

281,81 ppm de P para concentração celular de 0,165 g/L. Ao aumentar a concentração de substrato (Figura 4.3) para 20 g/L, o isolado 8, apresentou novamente resultados expressivos, 410,47 e 433,97 ppm de P solúvel para concentrações celulares iguais a 0,125 e 0,165 g/L, respectivamente.

As concentrações de fósforo solúvel em função da concentração celular fixando-se a concentração de substrato não se apresentaram tão discrepantes para o isolado 8, cerca de 0,49% em relação concentração celular inferior. Essa diferença percentual aumenta para 5,72% quando a concentração de substrato empregada é igual a 20 g/L. Observa-se que o aumento de concentração de substrato para o isolado 8 foi acompanhado de um aumento na concentração de fósforo solúvel de 2,89% e 9,32%, para as concentrações celulares de 0,125 e 0,165 g/L, respectivamente.

4.3.3 Avaliação da concentração celular e de concentrado de rocha fosfática em meio reacional líquido

Após avaliar a influência da concentração celular e substrato no processo de biossolubilização de fósforo em meio seletivo líquido como apresentado no item 3.3.2 estudou-se a influência da concentração celular em conjunto com a concentração de concentrado de rocha fosfática como descrito no item 3.3.3. De acordo com os resultados apresentados no item 4.3.2, selecionou-se os isolados 5 e 8 diante dos resultados de fósforo solúvel obtidos em comparação com os outros isolados. Fixou-se a concentração de substrato em 5g/L com o objetivo de diminuir os custos com reagentes, já que a diferença percentual não se apresentou expressiva entre 10 e 20 g/L. Optou-se também, por variar a concentração celular para os valores de 0,165 e 0,395 g/L, já que diante dos resultados anteriores o aumento da concentração celular foi acompanhado pelo aumento da concentração de fósforo solúvel. Os resultados de fósforo solúvel após 7 dias de processo para as concentrações de 5 e 10 g/L de concentrado de rocha fosfática estão apresentados nas Figuras 4.4 e 4.5, respectivamente.

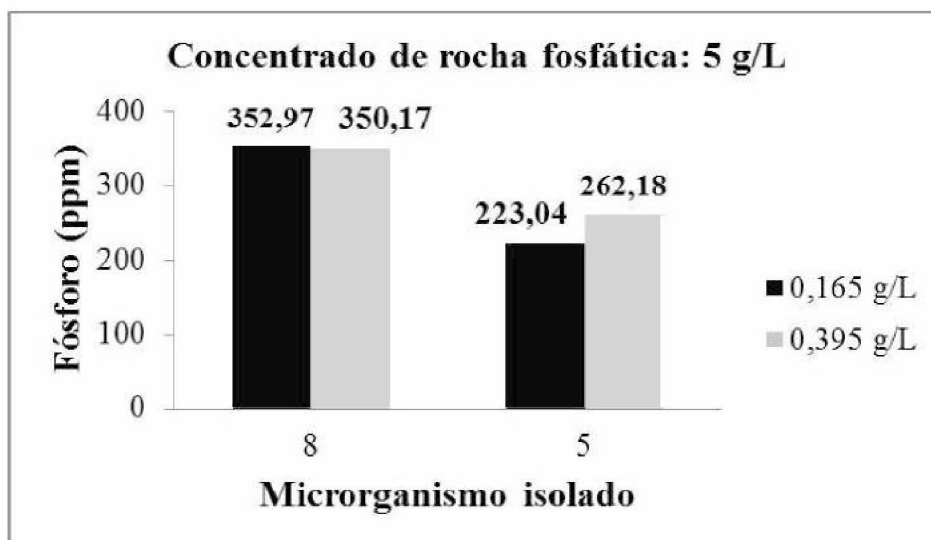


Figura 4.4- Avaliação da influência da concentração celular em meio reacional líquido em reatores cônicos de bancada. Concentração de glicose: 5g/L; concentrado de rocha fosfática: 5 g/L.

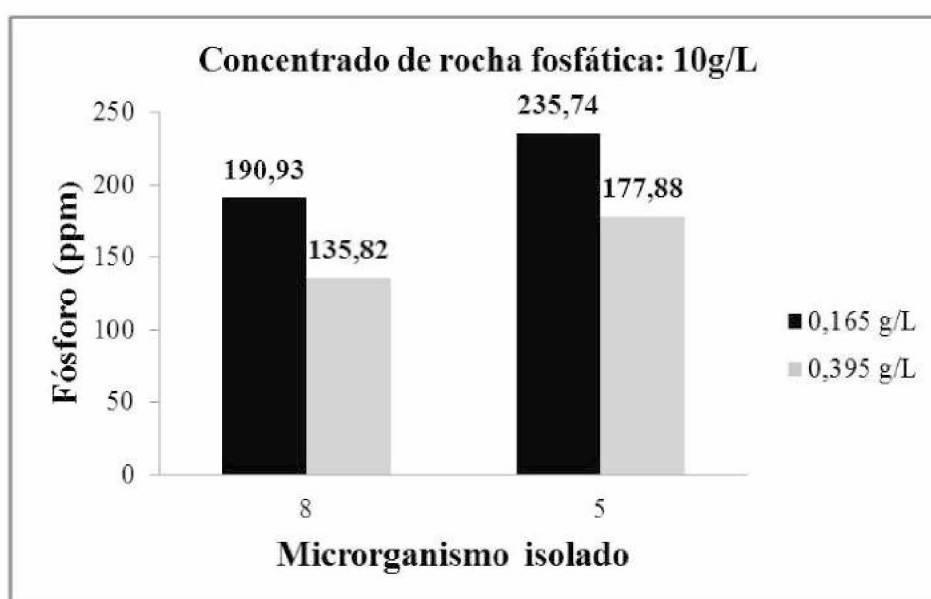


Figura 4.5- Avaliação da influência da concentração celular em meio reacional líquido em reatores cônicos de bancada. Concentração de glicose: 5g/L; concentrado de rocha fosfática: 10 g/L.

Ao avaliar a capacidade de biossolubilização do isolado 8, observa-se que o aumento da concentração de concentrado de rocha fosfática em meio sintético líquido foi acompanhado da redução de fósforo solúvel em 45,89% e 39,11% para as concentrações celulares de 0,165 e 0,395 g/L, respectivamente. Para o isolado 5 essa redução foi de 32,68% e 32,15%. O isolado fúngico 8 apresentou uma redução de 36,88% e 28,86% de fósforo solúvel ao aumentar a concentração celular em meio sintético líquido com 5 g/L e 10 g/L de

concentrado de rocha fosfática, respectivamente. Para o isolado 5 essas reduções foram de 25,15% e 24,54%, respectivamente. Inicialmente o estudo de biossolubilização com os 16 isolados fúngicos foi de 12 dias de processo, reduzindo-se a 7 dias ao selecionar os dois isolados (8 e 5) que apresentaram maior capacidade de biossolubilização.

Este tempo de processo já foi relatado por (Wakelin *et al.* 2004), bem como tempos bem superiores como 28 e 42 dias citados por Rinu e Pandey (2010) ao conduziram os estudos com diferentes espécies de *Aspergillus* em amostras de solos coletados de diferentes localidades da região do Himalaia indiano até 28 dias a 28 e 21°C e até 42 dias a 9 e 14°C. A maioria dos estudos relatou solubilização de fosfato anteriormente considerada por períodos: 14 dias (Goenadi *et al.* 2000), 17 dias (Vassileva *et al.* 1998) e 28 dias (Wahid e Mehana, 2000).

Em outros estudos, o período de alcance de máxima solubilização foi reduzido como citado por Acevedo *et al.* (2014) ao estudaram quatro isolados (dois fungos (PSF-25, PSF-26), uma bactéria (PSB-08) e uma levedura (PSY-12)), através de análises nas mudanças no crescimento, atividade na solubilização de fosfato e pH empregando $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ como fonte de fosfato insolúvel. A concentração de fosfato solúvel ao empregar PSF-25 aumentou rapidamente entre 24 e 48 horas de crescimento, permanecendo constante após 72 horas. Ao empregar PSF-26, a concentração de fosfato solúvel aumentou para o período de 24 a 48 horas de 68 a 1900 ppm. O isolado PSB-08 apresentou um crescimento entre 4 e 16 horas, acompanhado pelo aumento na concentração de fosfato solúvel de 32 a 841 ppm, enquanto o PSY-12 cresceu de maneira expressiva entre 16 e 24 horas apresentando um aumento na concentração de fosfato solúvel entre 221 e 1729 ppm. A fim de otimizar o processo de solubilização com o objetivo de alcançar concentrações elevadas de fósforo solúvel, o isolado fúngico 8 foi escolhido para dar continuidade aos experimentos.

Amostras contendo este isolado foram enviadas à Fundação André Tosello de Pesquisa e Tecnologia (Campinas/SP) para identificação por testes bioquímicos de taxonomia convencional. A cultura de fungo foi identificada por métodos moleculares com a amplificação do DNA alvo pela reação em cadeia da polimerase (PCR) por meio dos oligonucleotídeos iniciadores SRER (WHITE *et al.* 1990). O isolado fúngico 8 (Figura 4.1) foi então identificado como *Trichoderma harzianum* (*Hypocrea lixii*). Essa espécie é encontrada nos mais diversos tipos de solo, adubo e vegetal em decomposição. Sua dominância no solo é devido à alta capacidade metabólica e sua interrelação agressiva na competição por fontes de energia. O *T. harzianum* é a espécie mais abundante desse gênero (RAHMAN *et al.* 2011). Pode-se exemplificar uma das vantagens de se empregar os

microrganismos fúngicos no processo de solubilização de fósforo ao citar o trabalho de Melo e Costa (2005) ao desenvolverem uma formulação granulada a base de *Trichoderma harzianum* para controle de fitopatógenos.

4.4 Biorreator do tipo air-lift

4.4.1 Influência da vazão de ar por unidade de volume (Q/V) na solubilização de fósforo em reator air-lift

Ao estudar a influência da vazão volumétrica de ar por minuto no reator tipo air-lift como descrito no item 3.4.1, para valores de 0,5 e 1,0 VVM, obtiveram-se os resultados de concentração celular, concentração de glicose, concentração de fósforo e ácidos orgânicos, apresentados nas Figuras 4.6 a 4.9.

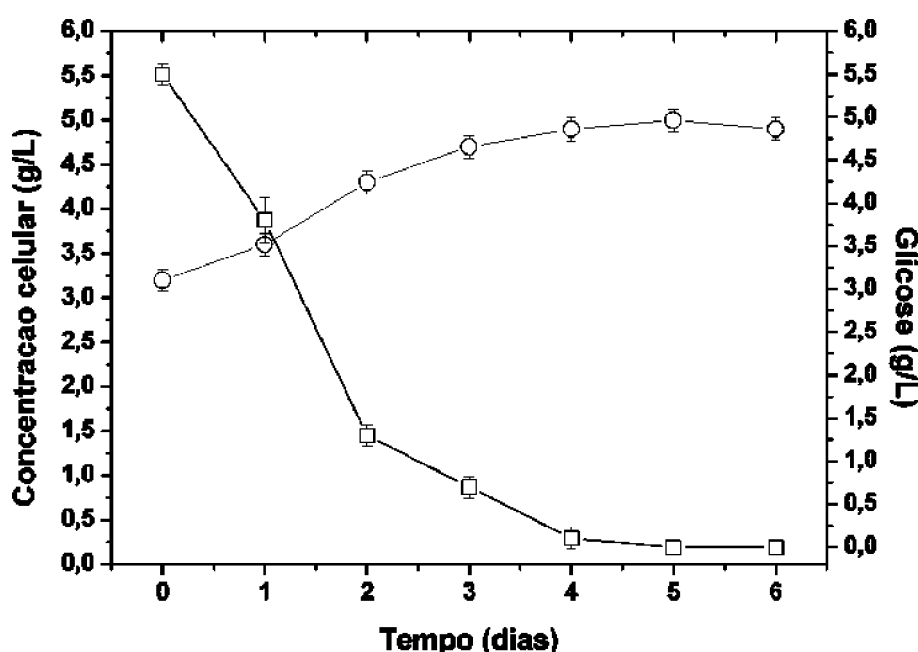


Figura 4.6 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM)

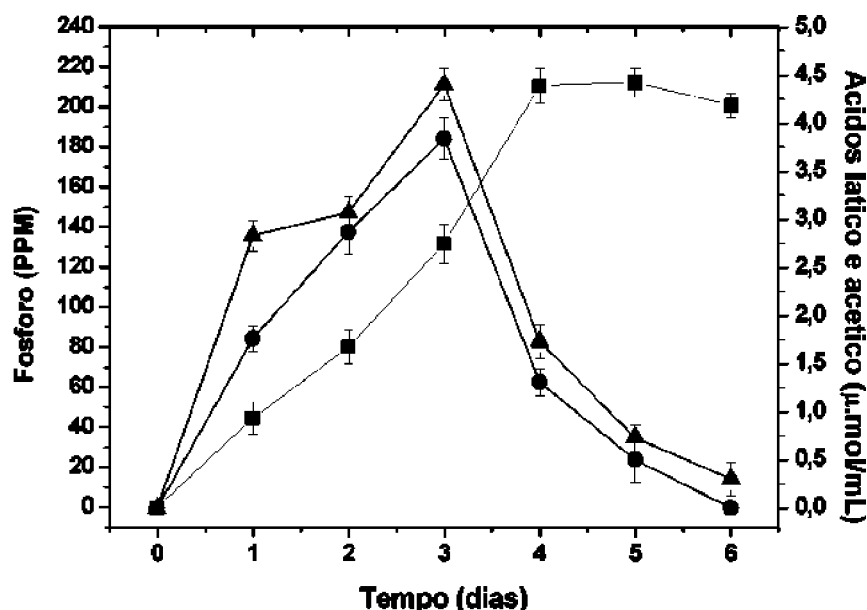


Figura 4.7 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM)

Ao iniciar a biossolubilização em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ empregando concentrado de rocha fosfática e glicose a 5 g/L e concentração celular inicial igual a 3,4 g/L, observa-se um crescimento celular acentuado até terceiro dia com um aumento de 38,23% apresentando-se praticamente constante após o terceiro dia de processo, como apresentado na Figura 4.6. O consumo de glicose mostrou-se acentuado até o terceiro dia de processo reduzindo-se a praticamente a zero a partir desse período, indicando uma redução de 87,27 % em relação à concentração inicial, sendo totalmente consumida pelo microrganismo a partir do quarto dia. Os ácidos orgânicos (lático e acético) apresentaram máximas concentrações no terceiro dia, atingindo 3,84 e 4,4 $\mu\text{mol/mL}$, respectivamente, somando 8,24 $\mu\text{mol/mL}$ de ácidos orgânicos (pH 5,08). A concentração de fósforo solúvel resultante da biossolubilização apresentou um aumento de 59,91% entre o terceiro e quarto dias de processo, mantendo-se praticamente constante até o quinto dia de processo, como apresentado na Figura 4.7.

Com o objetivo de avaliar a influência da vazão volumétrica por minuto em reator do tipo air-lift aumentou-se a mesma de 0,5 para 1,0. Os resultados são apresentados nas Figuras 4.8 e 4.9.

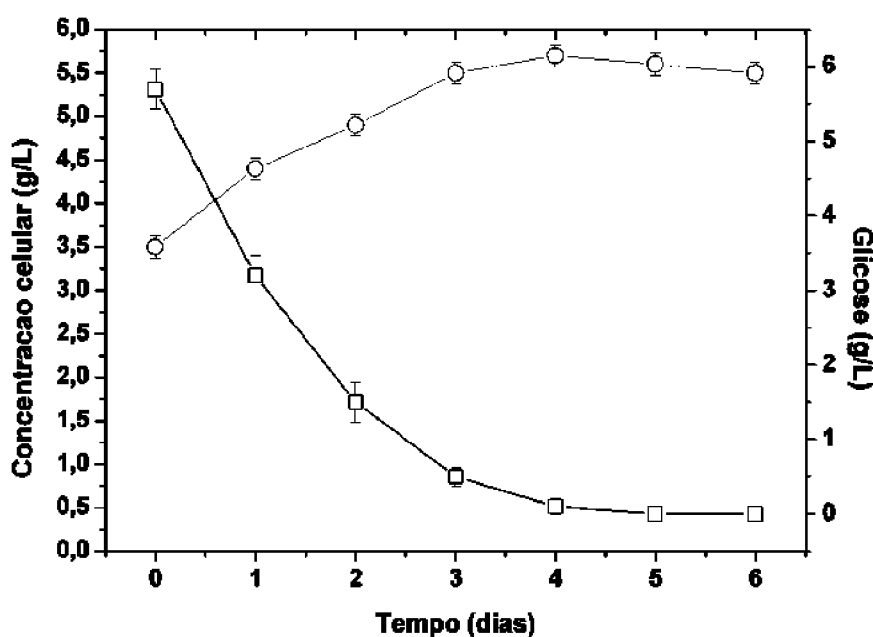


Figura 4.8 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 1,0 VVM)

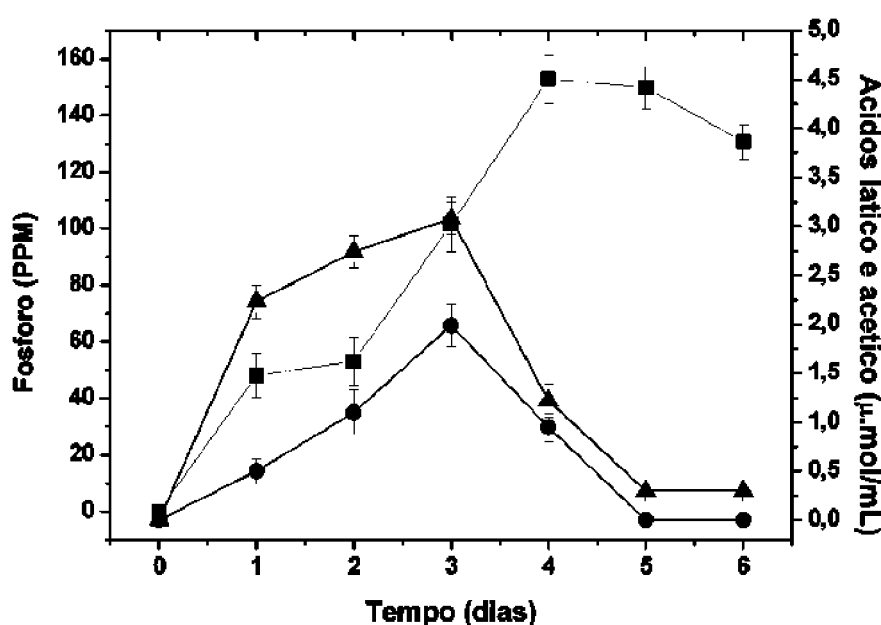


Figura 4.9 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 1,0 VVM)

Ao observar as Figuras 4.8 e 4.9 verifica-se que o aumento da vazão volumétrica de ar foi acompanhado pelo aumento da concentração celular de 48,57 % no terceiro dia (5,5 g/L)

em relação ao início do processo, já para a vazão de 0,5 VVV este aumento foi de 38,23% (concentração celular: 4,7 g/L) para o mesmo período. O consumo de glicose, como apresentado na Figura 4.8 apresentou-se mais acentuado, reduzindo 91,23 % de sua concentração inicial no terceiro dia. Essa redução acompanhada pela concentração total de ácidos orgânicos igual a 5,07 $\mu\text{mol/mL}$ (1,99 $\mu\text{mol/mL}$ de ácido láctico e 3,08 $\mu\text{mol/mL}$ de ácido acético, pH 5,58). Ao analisar a Figura 4.9 observa-se a concentração de fósforo igual a 152,8 ppm, 27,44% inferior à concentração alcançada para o mesmo período empregando a vazão de 0,5 VVM.

O aumento da vazão volumétrica de ar foi acompanhado pelo consumo acelerado de glicose, menor concentração de ácidos orgânicos e menor solubilização de fósforo, levantando a possibilidade de ligação entre a concentração de ácidos orgânicos e a disponibilização de fósforo solúvel pelo microrganismo. A concentração de ácidos orgânicos é citada como um dos mecanismos responsáveis pela biossolubilização de fósforo, concordando com os resultados experimentais deste trabalho ao avaliar a influência da vazão volumétrica de ar por minuto, obtendo-se 8,24 $\mu\text{mol/mL}$ de ácidos orgânicos no terceiro dia com 0,5 VVM.

Este valor de concentração de ácidos orgânicos está na faixa encontrada por Acevedo *et al.* (2014), que detectaram a produção de ácidos cítrico, succínico, glucônico e acético em quantidade total variando de 0,7 a 14 $\mu\text{mol/mL}$.

De acordo com resultados obtidos por esses autores nas análises realizadas em HPLC, entre os microrganismos estudados o PSF-25 produziu a maior quantidade de ácidos orgânicos (14 $\mu\text{mol/mL}$) entre eles, ácido glucônico (10,1 $\mu\text{mol/mL}$), ácido cítrico (2,1 $\mu\text{mol/mL}$) e ácido succínico (1,8 $\mu\text{mol/mL}$). Resultados encontrados por Acevedo *et al.* (2014) estão em concordância com o trabalho de Chuang *et al.* (2007) e Oliveira-Mendes *et al.* (2014), que afirmaram que os ácidos glucônico e cítrico estão entre os ácidos mais produzidos por *Aspergillus niger* na presença de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Apesar da natureza diferente dos ácidos encontrados por Acevedo *et al.* (2014), provavelmente devido ao microrganismo estudado, os ácidos encontrados neste trabalho condizem em termos de concentração com os trabalhos citados anteriormente.

4.4.2 Influência da temperatura na solubilização de fósforo em reator air-lift

Como apresentado no item 3.4.2 estudou-se o processo de biossolubilização de fósforo em reator air-lift a 36 e $40 \pm 3^\circ\text{C}$. Os resultados de concentração celular, consumo de glicose, concentração de fósforo e ácidos orgânicos são apresentados nas Figuras 4.10 a 4.13.

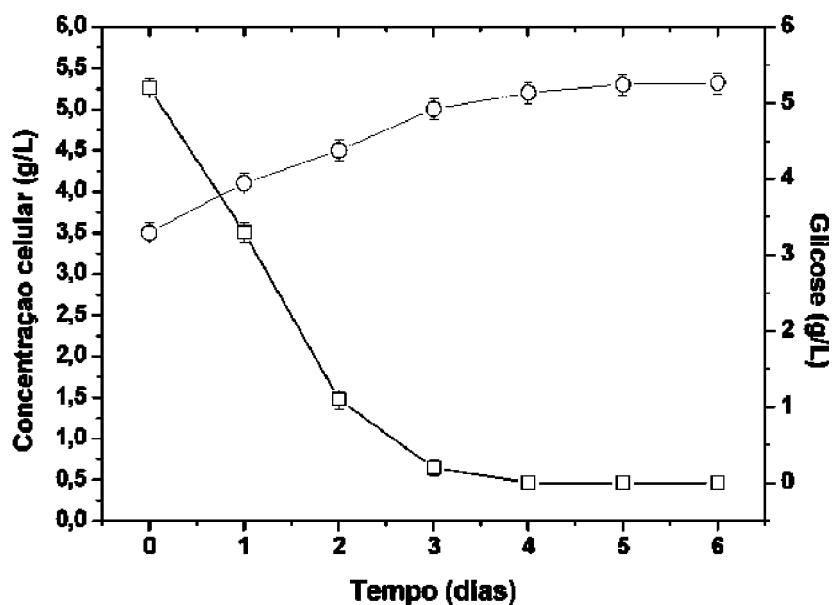


Figura 4.10 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator tipo air-lift a $36 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM)

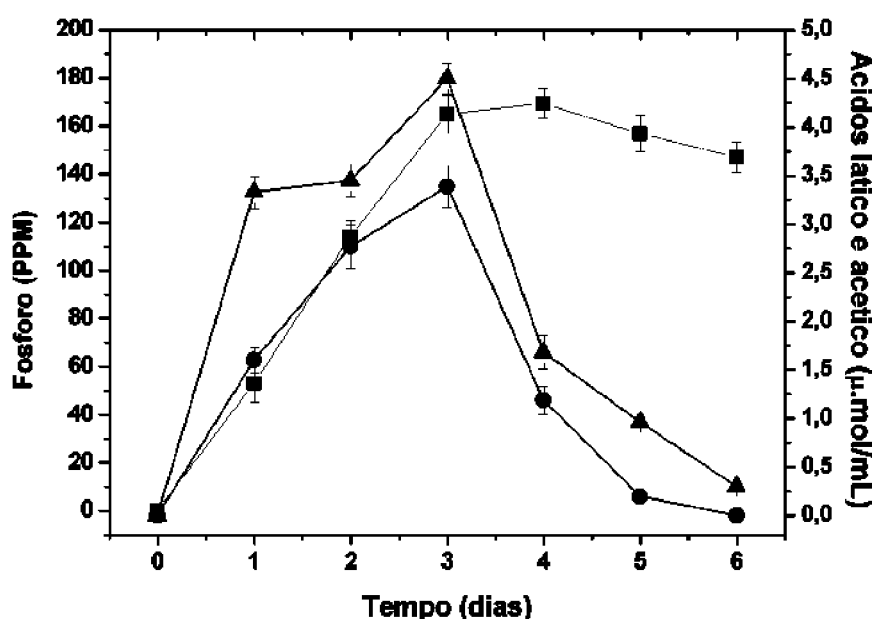


Figura 4.11 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator tipo air-lift a $36 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, Concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM)

Entre o primeiro e o segundo dias de processo em reator air-lift a 36°C a concentração celular aumentou em 14,63% atingindo o valor de 4,7 g/L. O concentração celular foi acompanhando pelo aumento da bioassolubilização de fósforo em 114,66%. No terceiro dia de

processo a concentração de fósforo igual a 165,07 PPM foi alcançada, acompanhada pelo consumo de praticamente todo o substrato e ainda da produção máxima total de 7,89 $\mu\text{mol/mL}$ de ácidos orgânicos (pH 5,24). Ao aumentar a temperatura de operação do reator air-lift para 40°C os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 4.12 e 4.13.

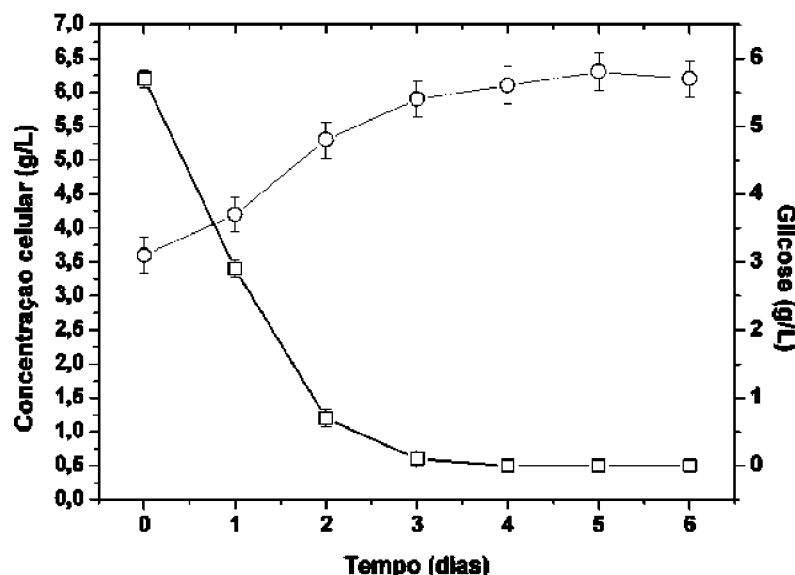


Figura 4.12 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator tipo air-lift a $40 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, Concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM).

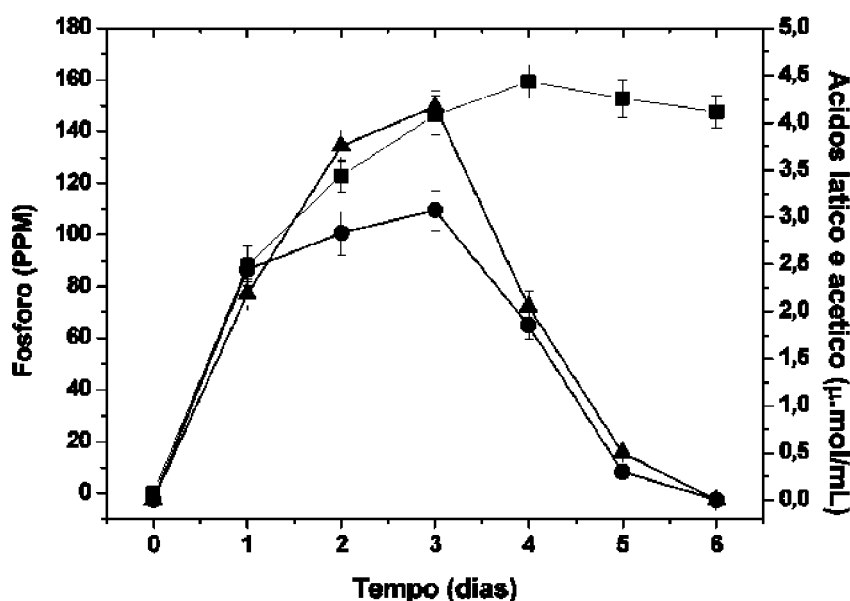


Figura 4.13 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator tipo air-lift a $40 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, Concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM)

Ao avaliar a Figura 4.12 e compará-la com a Figura 4.10 para o período de três dias após o início do processo, observa-se um consumo mais rápido de glicose havendo redução de 98,24% da concentração inicial de substrato. Ao observar as Figuras 4.11 e 4.13, observa-se que o aumento da temperatura em 4°C foi acompanhado pela diminuição de 11,35% na concentração de fósforo solúvel para o terceiro dia de processo. Para este período a concentração total de ácidos orgânicos para a temperatura de $40 \pm 3^\circ\text{C}$ foi de 7,24 $\mu\text{mol/mL}$ (pH 5,33) inferior à concentração alcançada para a temperatura de 36°C .

Ao comparar as três temperaturas estudadas, 28, 36 e $40 \pm 3^\circ\text{C}$, verifica-se pela avaliação das Figuras 4.8, 4.10 e 4.12 que o crescimento celular apresentou-se mais acentuado a temperaturas mais elevadas, acompanhado pelo consumo acelerado de glicose, menor concentração total de ácidos orgânicos e menor disponibilização de fósforo em meio reacional. A temperatura também foi uma variável estudada diante do processo de biossolubilização de fósforo por Rinu e Pandey (2010) ao estudarem a biossolubilização de fósforo de amostras de solos coletadas de diferentes localizações da região do Himalaia indiano por algumas espécies de *Aspergillus*. Algumas espécies se destacaram variando a concentração de fósforo solúvel de 33 $\mu\text{g/mL}$ (de *A. fumigatus*) a 2354 $\mu\text{g/mL}$ (de *A. niger*) a 21°C , entre 93 $\mu\text{g/mL}$ (*A. fumigatus*) a 1452 $\mu\text{g/mL}$ (*A. niger*) a 14°C , entre 21 $\mu\text{g/mL}$ (*A. wentii*) para 83 $\mu\text{g/mL}$ (*A. Niger*) a 9°C e entre 374 $\mu\text{g/mL}$ (*A. candidus*) a 1394 $\mu\text{g/mL}$ (de *A. niger*) a 28°C . Esta última faixa de concentração de fósforo apresenta valores inferiores ao máximo valor de fósforo solúvel encontrado neste trabalho a 28°C .

Ao avaliar a solubilização de fósforo derivado de concentrado de rocha fosfática nas temperaturas de 28, 36 e $40 \pm 3^\circ\text{C}$, a maior concentração de fósforo disponível em meio foi igual a 210,6 ppm (645,81 ppm de fosfato) alcançado no quarto dia de operação de reator airlif empregando vazão volumétrica de ar igual a 0,5 VVM. Observou-se que com o tempo de processo hifas do fungo acumulavam-se na superfície do meio, formando uma camada filamentosa. Assim para proporcionar maior movimentação do fungo no meio, foram realizados experimentos com o reciclo do meio reativo, conforme será apresentado a partir do item 4.4.3.

A influência da temperatura é estudada em outros trabalhos podendo citar Barroso *et al.* (2006) ao relataram máxima solubilização por *A. niger* a 30°C . Algumas espécies como *A. candidus* (176 $\mu\text{g/15 mL}$) e *A. fumigatus* (212 $\mu\text{g/15 mL}$) foram anteriormente referenciadas para solubilização de fosfato. No trabalho de Rinu e Pandey (2010), a diminuição do pH para todas as espécies de *Aspergillus* mostrou-se dependente da temperatura. A diminuição máxima de pH ocorreu a 21 e 28°C , coincidindo com a solubilização máxima de fosfato. *A.*

nidulans e *A. sydowii* mostraram solubilização máxima de fosfato a 14°C. Em temperaturas mais elevadas (21 ou 28°C), após atingir a redução máxima de pH em 2-4 semanas de incubação, o novo aumento de pH não foi acompanhado pelo aumento na solubilização de fosfato, o que, segundo os autores, pode ser devido a morte celular e lise. Porém, para *A. niger* (a 21 e 14°C) e *A. glaucus* (a 28°C), a concentração de fosfato nos meios de fermentação, também aumentou, provavelmente devido à lise celular e liberação de fosfato na suspensão de cultura. Observações semelhantes em espécies *Penicillium* foram relatados por Illmer e Schinner (1992). Esses autores explicaram que o aumento inicial da concentração de fosfato seria devido à produção de ácidos e posteriormente devido à alteração do metabolismo devido a uma falta de carbono, o que poderia resultar na formação de um composto organofosforado. Neste trabalho este aumento pode ser observado até o quarto dia de processo de biossolubilização na Figura 4.13, em que após este período até o sexto dia, a concentração de fósforo solúvel se estabilizou.

4.4.3 Influência de reciclo do meio reacional em reator air-lift

A influência do reciclo do meio reacional no processo de biossolubilização de fósforo em reator tipo air-lift foi avaliado em taxas de 200 e 400 mL/min a $28 \pm 3^\circ\text{C}$, empregando concentração de glicose e de concentrado de rocha fosfática iguais a 5 g/L. Os resultados de concentração celular, consumo de glicose, concentração de fósforo e ácidos orgânicos são apresentados nas Figuras 4.14 – 4.17. Inicialmente foram testadas algumas vazões de reciclo em que ao empregar a vazão de reciclo de 200 mL/min, foi observada visualmente a movimentação do microrganismo no bioreator, portanto esta vazão foi adotada como sendo a mínima a ser utilizada no processo.

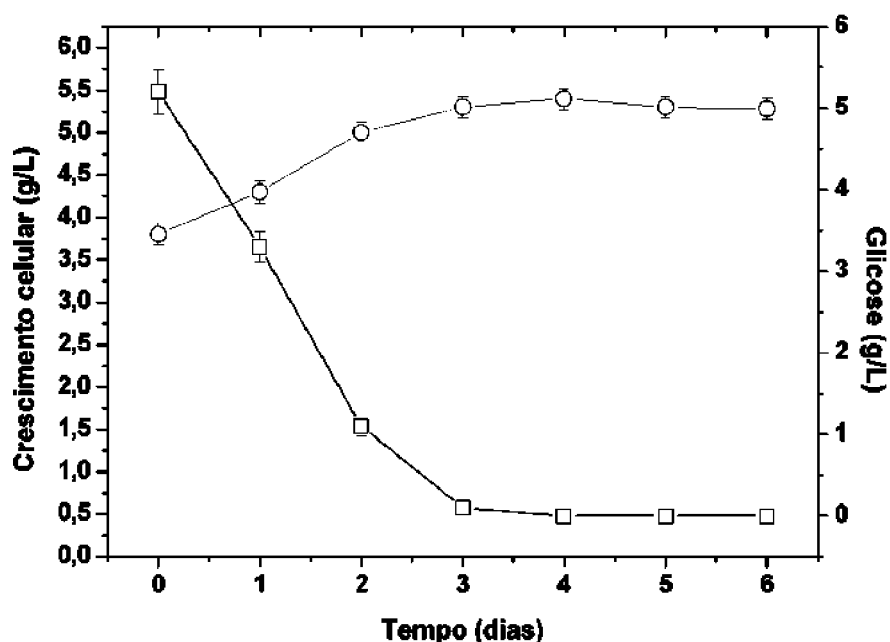


Figura 4.14 – Concentração celular ($\circ$) e consumo de glicose ($\square$) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, Concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM, Concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, reciclo do meio reacional: 200 mL/min)

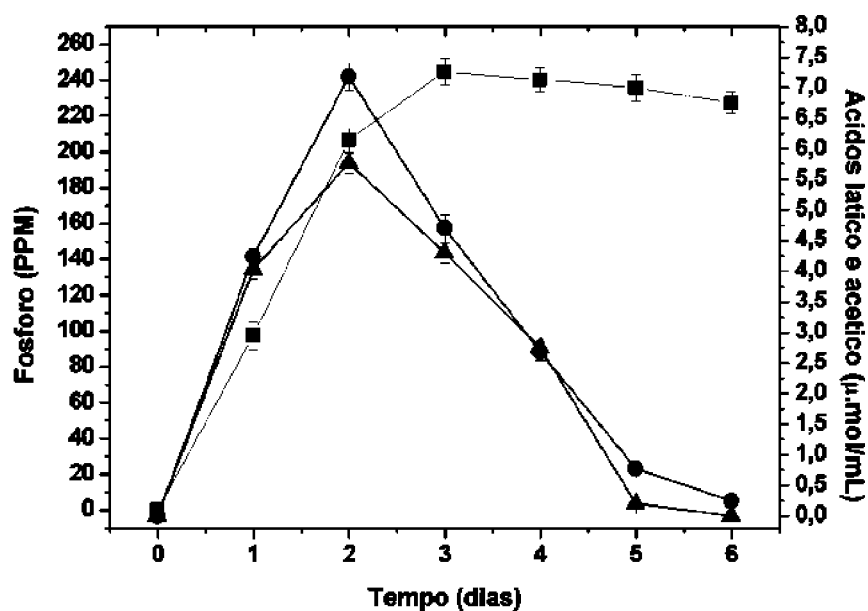


Figura 4.15 – Concentração de fósforo ($\blacksquare$) e ácidos orgânicos (ácido láctico: $\bullet$, ácido acético: $\blacktriangle$) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, reciclo do meio reacional: 200 mL/min)

Ao analisar a Figura 4.15 nota-se no terceiro dia de processo a máxima concentração de fósforo solúvel foi igual a 244,9 ppm, acompanhada também por uma máxima concentração total de ácidos orgânicos (9,01 $\mu\text{mol/mL}$, pH 4,87).

Os resultados empregando reciclo do meio reacional a 400 mL/min, concentração de glicose e oncentrado de rocha fosfática iguais a 5g/L, 0,5 VVM e concentração celular inicial igual a aproximadamente $3,8 \pm 0,5$ g/L são apresentados nas Figuras 4.16, 4.17 e 4.18.

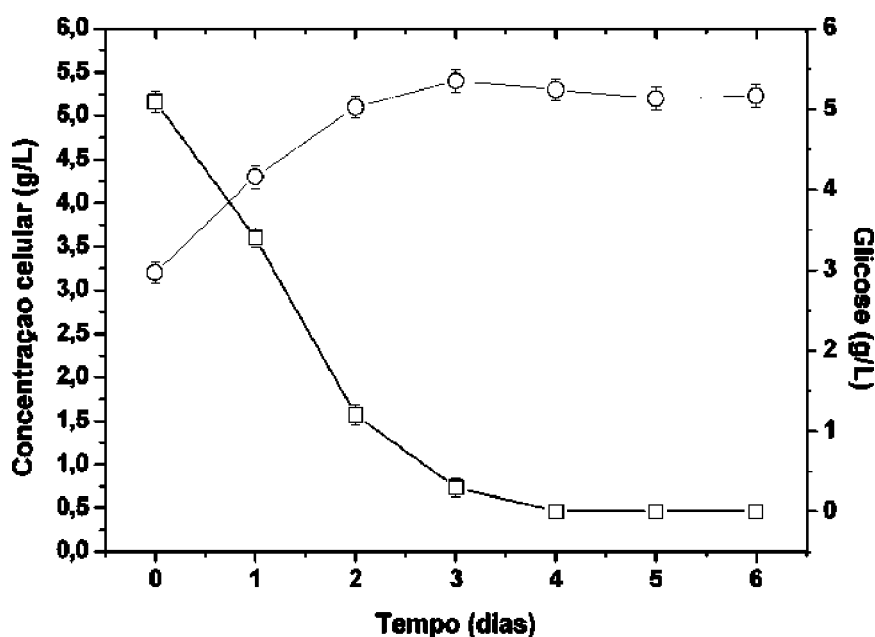


Figura 4.16 – Concentração celular ($\circ$) e consumo de glicose ($\square$) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM, Reciclo do meio reacional: 400 mL/min)

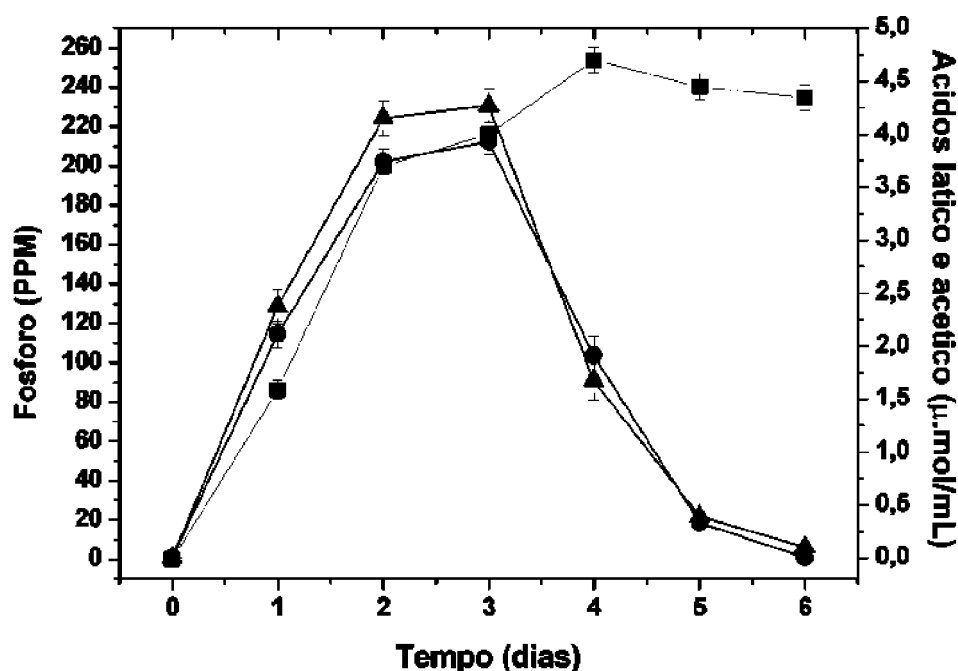


Figura 4.17 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM, Reciclo do meio reacional: 400 mL/min)

Ao comparar as Figuras 4.14 e 4.16 observa-se até o terceiro dia um consumo mais rápido do substrato e uma concentração celular superior (1,88%) ao empregar a taxa de reciclo igual a 400 mL/min. Ao avaliar a concentração de ácidos orgânicos para os dois processos (Figuras 4.15 e 4.17), observa-se uma concentração total de ácidos orgânicos (acético e láctico) igual a $8,2 \mu\text{mol/mL}$ e pH 5,08 no terceiro dia operando o reator com reciclo a 400 mL/min. Concentração esta inferior (8,99%) à alcançada para o mesmo período ao empregar a taxa de reciclo igual a 200 mL/min, bem como a concentração de fósforo assimilável, 11,76% inferior à concentração do macronutriente encontrada para o mesmo período empregando reciclo a 400 mL/min.

O processo de bio-solubilização de fósforo pode ser verificado pela avaliação de concentração de ácidos no meio reativo e pelo potencial hidrogeniônico. De acordo com o trabalho de Souchie *et al.* (2007) ao avaliar a solubilização de fosfato por microrganismos rizosféricos em diferentes classes de solo foi observada uma relação inversa entre o pH do meio e a quantidade de P solúvel. Alguns isolados de fungo elevaram os teores de P solúvel acima de 180 ppm com valores de pH abaixo de 2,0 enquanto algumas bactérias, apesar de

alguns isolados apresentarem alto potencial de acidificação do meio, reduzindo o pH a 3,0, solubilizaram o equivalente a apenas 1,8 e 9,0 ppm de P. Desses 15 isolados fúngicos identificados, 14 pertenceram ao gênero *Aspergillus* e um ao gênero *Penicillium*.

Os valores encontrados por Souchie *et al.* (2007) apresentaram-se inferiores aos encontrados no presente trabalho ao estudar as vazões de reciclo iguais a 200 mL/min (244,9 ppm) e 400 mL/min (216,1 ppm) até o terceiro dia de operação do reator air-lift, acompanhados pelas concentrações de ácidos orgânicos iguais a 4,71 $\mu\text{mol/mL}$ de ácido lático e 4,3 $\mu\text{mol/mL}$ de ácido acético (200 mL/min) e 3,93 $\mu\text{mol/mL}$ de ácido lático e 4,27 $\mu\text{mol/mL}$ de ácido acético (400 mL/min).

4.4.3.1 Influência da concentração celular no processo de biossolubilização empregando reciclo do meio reacional

O processo de biossolubilização em reator do tipo air-lift empregando reciclo a 200 mL/min foi avaliado utilizando concentração celular inicial igual a aproximadamente 3,8 g/L. A concentração celular no processo, empregando reciclo do meio reacional foi variada em 2,2 e $0,5 \pm 0,5$ g/L, conforme descrito no item 3.4.3.1. Os resultados de concentração celular, consumo de glicose, concentração de fósforo e ácidos orgânicos são apresentados nas Figuras 4.18, 4.19, 4.20 e 4.21.

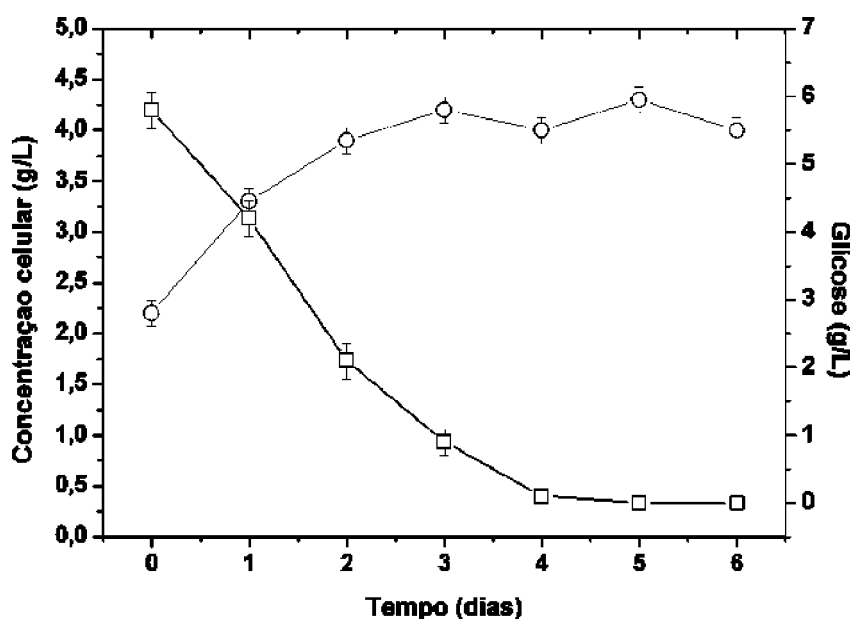


Figura 4.18 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, Concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM, Concentração celular inicial: 2,2 g/L, reciclo do meio reacional: 200 mL/min)

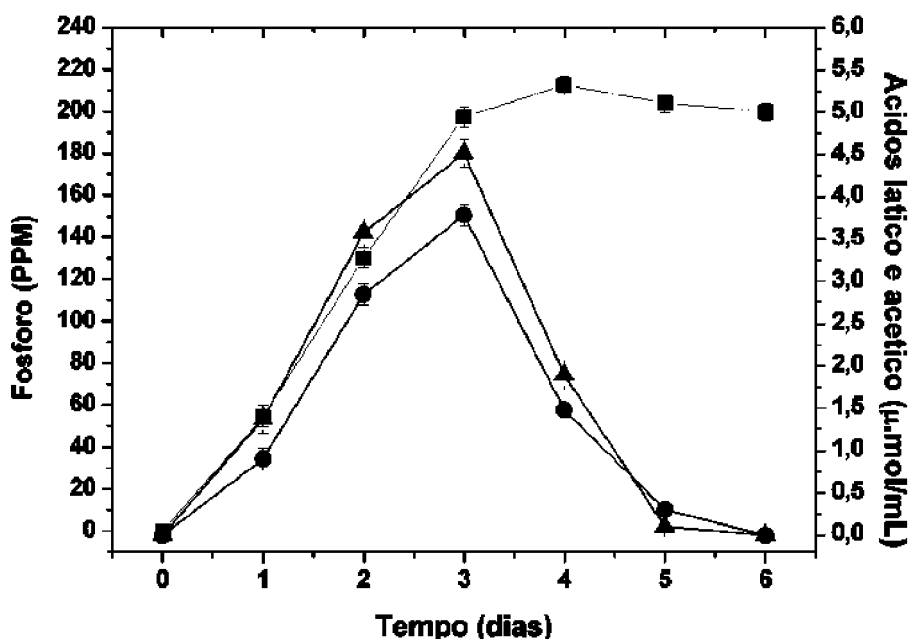


Figura 4.19 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, Concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM, Concentração celular inicial: 2,2 g/L, reciclo do meio reacional: 200 mL/min)

Ao estudar a biossolubilização de fósforo em reator air-lift com reciclo do meio reacional a 200 mL/min e concentração celular inicial igual a 3,8 g/L verificou-se um crescimento celular de 39,47% no terceiro dia de processo. Este crescimento foi de 81,82% ao início do processo com concentração celular igual a 2,2 g/L como indicado na Figura 4.18.

A concentração total de ácidos orgânicos no terceiro dia de processo (Figura 4.19) atingiu o valor de 8,29 $\mu\text{mol/mL}$ (pH 5,06), valor inferior ao observado ao iniciar o processo com a concentração celular igual a 3,8 g/L. Para o mesmo período a concentração de fósforo também mostrou-se inferior, como indicado na Figura 4.19.

Ao avaliar a influência da concentração celular inicial no processo de biossolubilização de fósforo em reator air-lift com reciclo do meio reacional a 200 mL/min, empregando a concentração igual a 0,5 g/L, obteve-se os resultados apresentados nas Figuras 4.20 e 4.21.

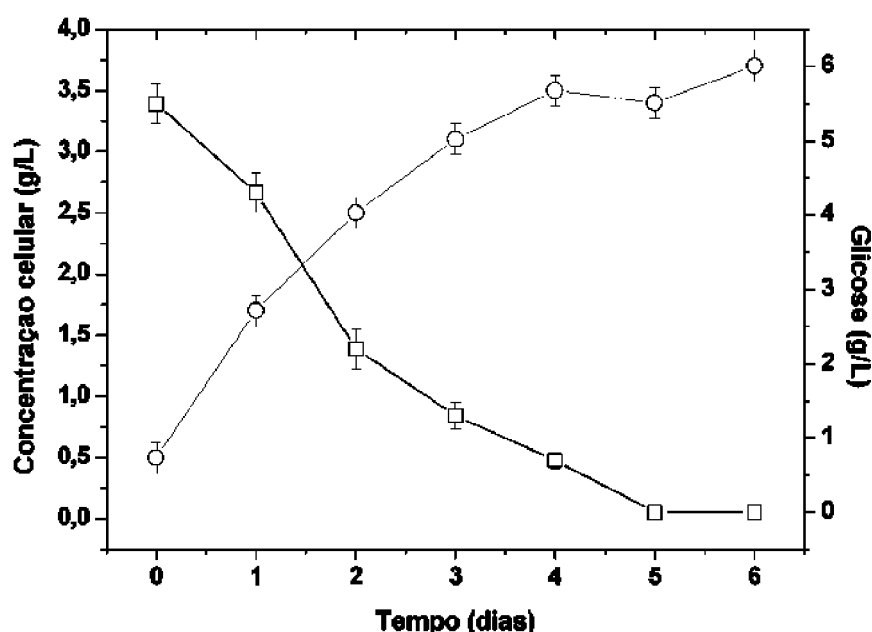


Figura 4.20 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, Concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM, Concentração celular inicial: 0,5 g/L, reciclo do meio reacional: 200 mL/min)

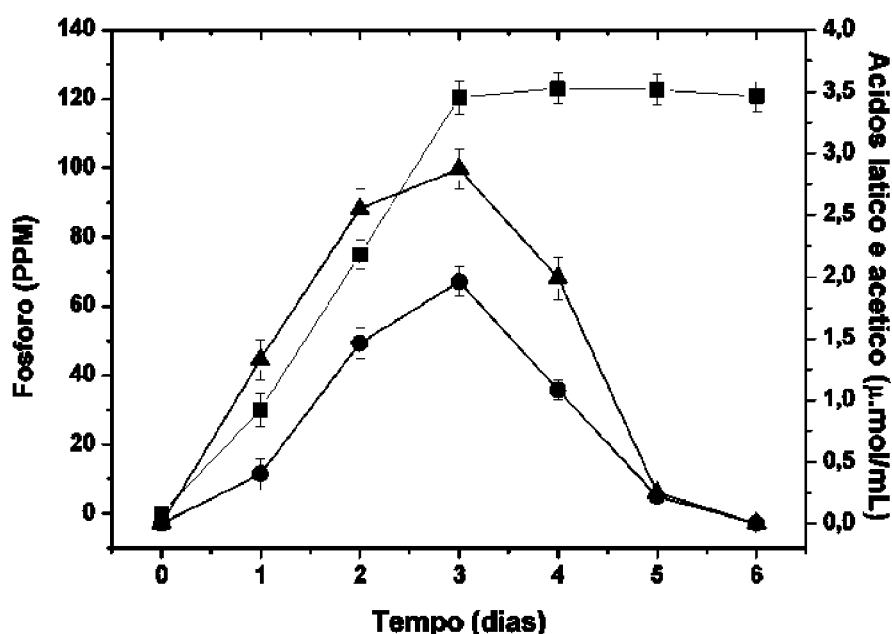


Figura 4.21 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, Concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM, Concentração celular inicial: 0,5 g/L, reciclo do meio reacional: 200 mL/min)

Ao observar as Figuras 4.20 e 4.21 verifica-se que a estabilização da concentração celular inicial acarretou uma estabilização na concentração de fósforo solúvel e ácidos orgânicos durante o processo de biossolubilização de fósforo. Ao avaliar o terceiro dia de processo nota-se que a concentração de fósforo e a concentração total de ácidos orgânicos apresentou-se 49,74% e 46,39% inferior (pH 5,67), respectivamente em relação aos valores obtido no processo com concentração celular inicial igual a 3,8 g/L.

4.4.4 Estudo da biossolubilização de fósforo diante da reposição de glicose em reator air-lift com reciclo de meio reacional

A reposição de glicose em reator air-lift com aeração a 0,5 VVM, reciclo do meio reacional igual a 200 mL/min e concentração celular inicial igual a 3,8 g/L, foi estudada como descrito no item 3.3.4. Os resultados de crescimento celular, metabólitos e fósforo são apresentados nas Figuras 4.22 a 4.31.

4.4.4.1 Influência conjunta da concentração e reposição de glicose e concentrado de rocha fosfática na biossolubilização de fósforo em reator do tipo air-lift

Ao avaliar o processo de biossolubilização de fósforo em reator do tipo air-lift, estudou-se inicialmente, a influência conjunta da concentração e reposição de glicose e concentrado de rocha fosfática durante os seis dias de processo. Os resultados são apresentados nas Figuras 4.22 a 4.31.

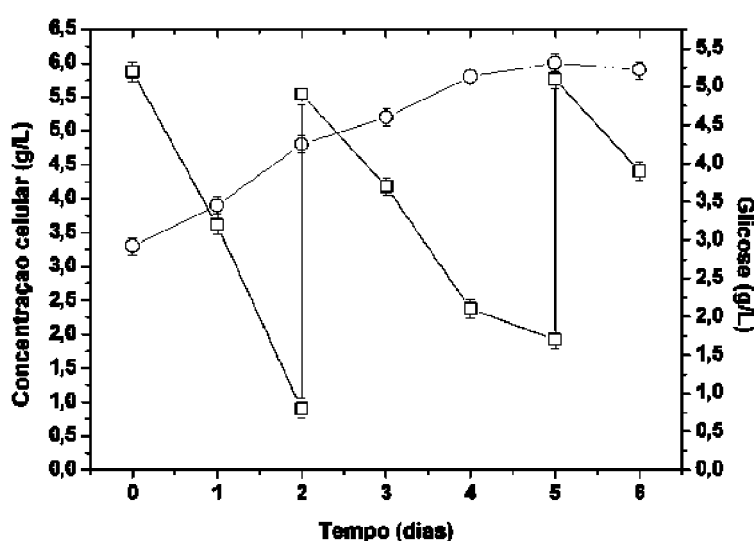


Figura 4.22 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM, reciclo do meio reacional: 200 mL/min, reposição de Glicose)

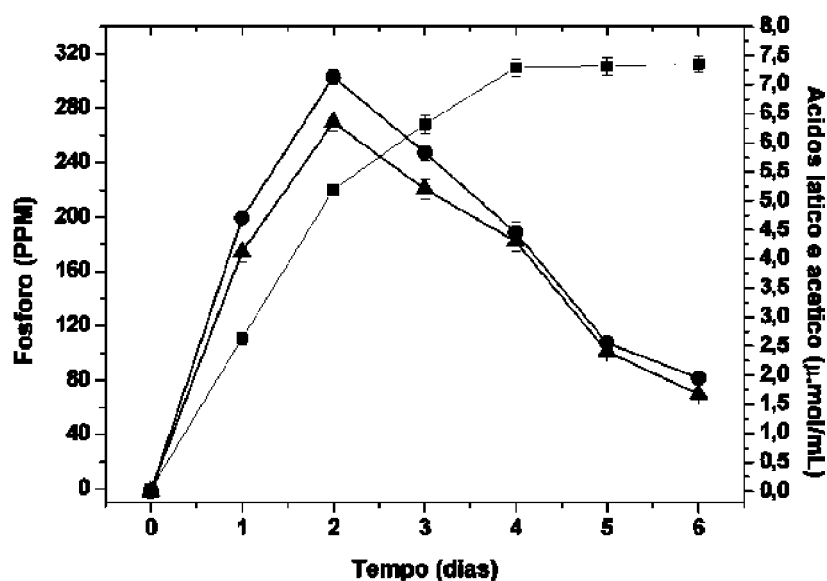


Figura 4.23 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM, reciclo do meio reacional: 200 mL/min, reposição de Glicose)

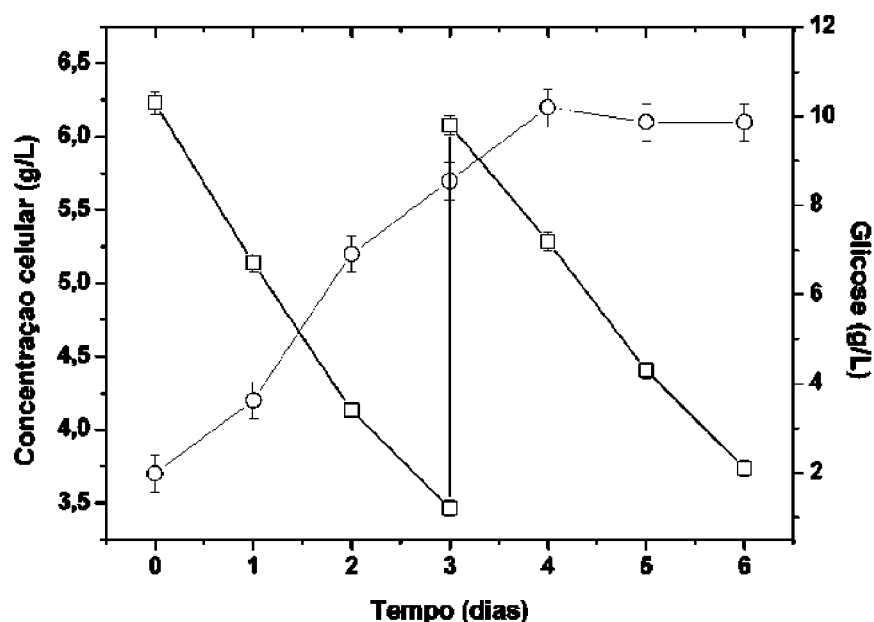


Figura 4.24 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM, reciclo do meio reacional: 200 mL/min, reposição de Glicose)

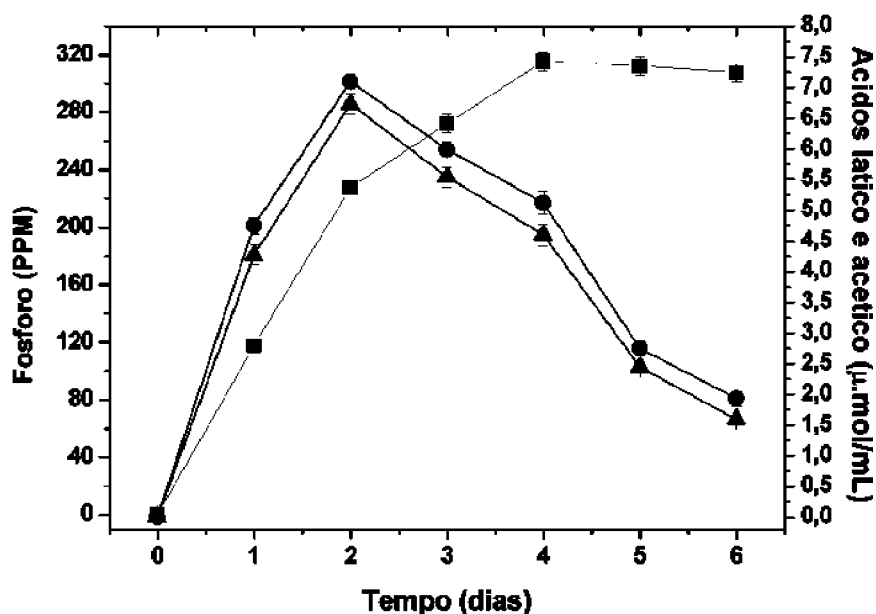


Figura 4.25 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, Concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM, reciclo do meio reacional: 200 mL/min, reposição de Glicose)

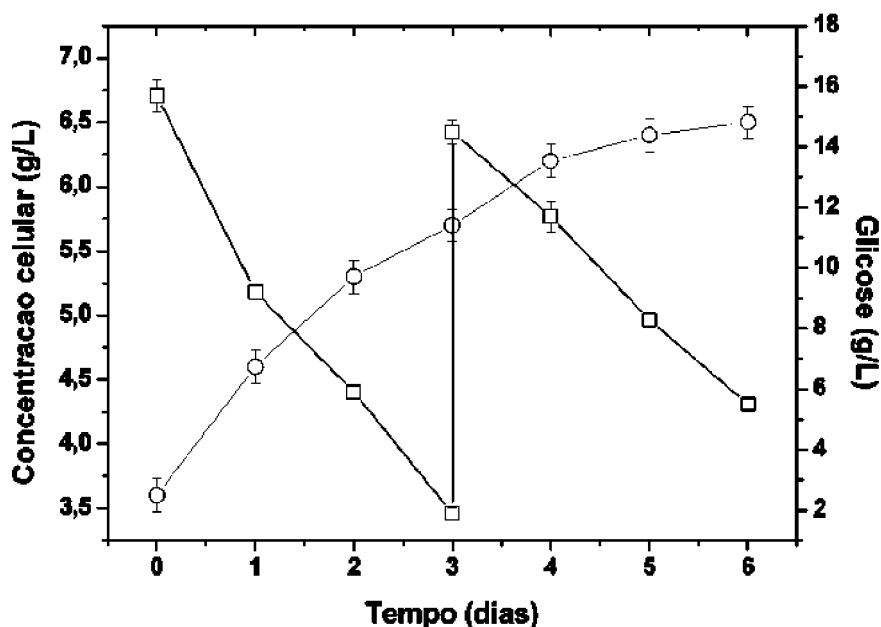


Figura 4.26 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 15 g/L, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM, reciclo do meio reacional: 200 mL/min, reposição de Glicose)

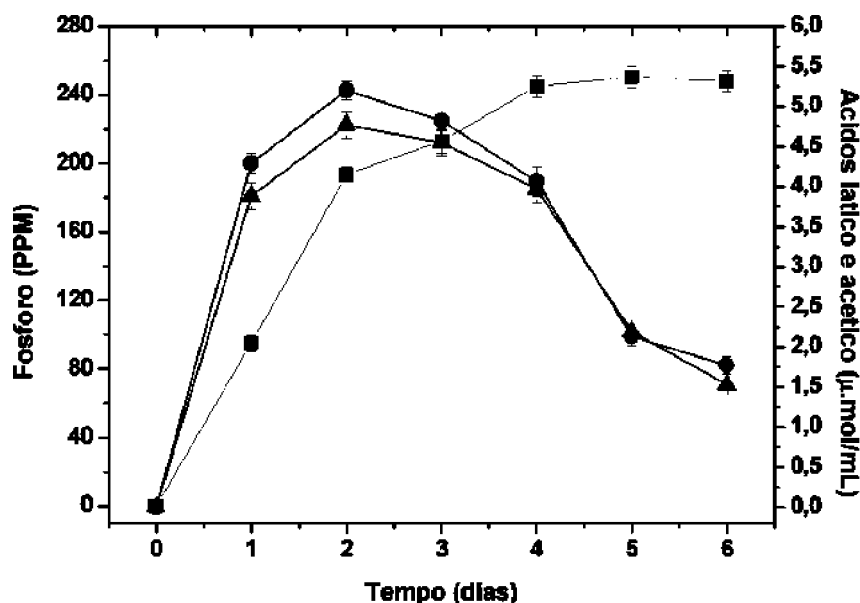


Figura 4.27 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 15 g/L, Cconcentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L, 0,5 VVM, reciclo do meio reacional: 200 mL/min, reposição de Glicose)

Ao avaliar as Figuras 4.22, 4.24 e 4.26 pode-se observar a influência do aumento da concentração de glicose em meio reacional mantendo a concentração de concentrado de rocha fosfática a 5g/L. A concentração celular apresentou um aumento no terceiro dia de 57,57%, 54,04% e 58,33% para as concentrações de 5, 10 e 15 g/L de glicose, respectivamente. Para este mesmo período a concentração de glicose sofreu queda de 88,35% (10 g/L) e 87,89% (15 g/L), sendo repostas no terceiro dia. Para a condição de 5 g/L de glicose a reposição do substrato ocorreu no segundo dia de processo, em que a queda foi de 84,61%. A máxima concentração total de ácidos ocorreu para as três condições no terceiro dia de processo, atingindo $11,03 \mu\text{mol/mL}$, $11,53 \mu\text{mol/mL}$ e $9,37 \mu\text{mol/mL}$, para as condições de 5, 10 e 15 g/L de glicose.

Estes resultados indicam que o aumento de glicose não ocasionou um aumento considerável na concentração de fósforo solúvel. Essa observação é reforçada pelas concentrações de fósforo solúvel alcançadas, 268,1 ppm, 272,3 ppm e 212,9 ppm, para a concentração de glicose de 5, 10 e 15 g/L, respectivamente, para o terceiro dia de processo indicadas nas Figuras 4.23, 4.25 e 4.27. No quarto dia de processo a concentração de fósforo solúvel foi um pouco superior, atingindo o máximo em 309,5; 315,4 e 244,8 ppm, para as concentrações de glicose de 5, 10 e 15 g/L, respectivamente. Pode ser observado que a partir

do quarto dia de processo não houve aumento na concentração de fósforo solúvel em meio. Estes valores correspondem a solubilização de fósforo e concentração de ácidos orgânicos de 39,7% e 8,75 $\mu\text{mol/mL}$, 40,46%, 9,72 $\mu\text{mol/mL}$ e 31,41%, 8,04 $\mu\text{mol/mL}$, respectivamente.

Para estas mesmas condições, no terceiro dia, apesar de uma menor porcentagem de solubilização de fósforo 34,4 e 34,9 % a concentração de ácido variou em 11,03, 11,53 e 9,37 $\mu\text{mol/mL}$, para 5, 10 e 15 g/L de glicose, respectivamente. Estas concentrações de ácidos orgânicos são expressivas e levam a reforçar a explicação da biossolubilização de fósforo pela presença de ácidos orgânicos no meio reativo. Mendes *et al.* (2014) afirmam que a concentração de ácidos orgânicos é a principal forma de libertação de P por fungos a partir de compostos inorgânicos insolúveis e do solo. Estes ácidos podem libertar P no solo, substituindo o P na superfície de óxidos metálicos através de reações de troca de ligantes, por dissolução de óxidos que adsorvem P e por complexação com metais na solução, evitando assim a precipitação de P com estes metais (NAGARAJAH *et al.* 1970; STUMM, 1986; FOX *et al.* 1990a,b; BOLAN *et al.* 1994; JONES, 1998).

Ao trabalhar com diferentes fontes de fosfato (AlPO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, e rocha fosfática de Catalão e Araxá) Mendes *et al.* (2014) obtiveram resultados expressivos com algumas espécies fúngicas. *Penicillium canescens* (FS23) produziu ácido glucônico em todos tratamentos e ácido cítrico em tratamentos com AlPO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, e rocha fosfática de Araxá. Concentrações entre os tratamentos variaram de 25 a 1.242 ppm de ácido glucônico, e de 25 a 813 mg/L de ácido cítrico. *Eupenicillium ludwigii* (FS27) e *Penicillium islandicum* (FS30) produziram apenas ácido glucônico. A produção de ácido glucônico foi parcialmente inibida no tratamento com FePO_4 para os dois isolados. Na presença de AlPO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, e as rochas fosfáticas, *E. ludwigii* (FS27) acumulou as maiores quantidades deste ácido entre todos os isolados, chegando a 3 g/L no tratamento com $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Mendes *et al.* (2014) encontraram ácidos orgânicos em concentrações consideráveis para diferentes fontes de fosfato diante de diferentes espécies fúngicas, as quais diferenciaram deste trabalho, podendo justificar os diferentes ácidos produzidos.

Após avaliar a influência da concentração e reposição de glicose mantendo-se a concentração de concentrado de rocha fosfática a 5g/L, avaliou-se a influência da concentração e reposição de glicose mantendo a concentração de concentrado de rocha fosfática a 10 g/L. Os resultados em concentração celular, consumo de glicose, concentração de fósforo e de ácidos orgânicos são apresentados nas Figuras 4.28, 4.29, 4.30 e 4.31.

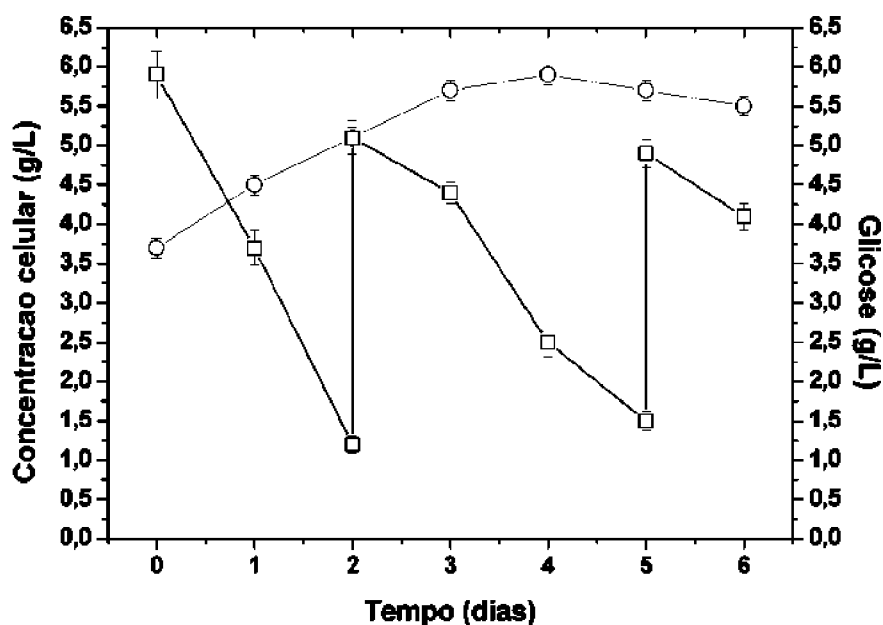


Figura 4.28 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 10 g/L, 0,5 VVM, reciclo do meio reacional: 200 mL/min, reposição de Glicose)

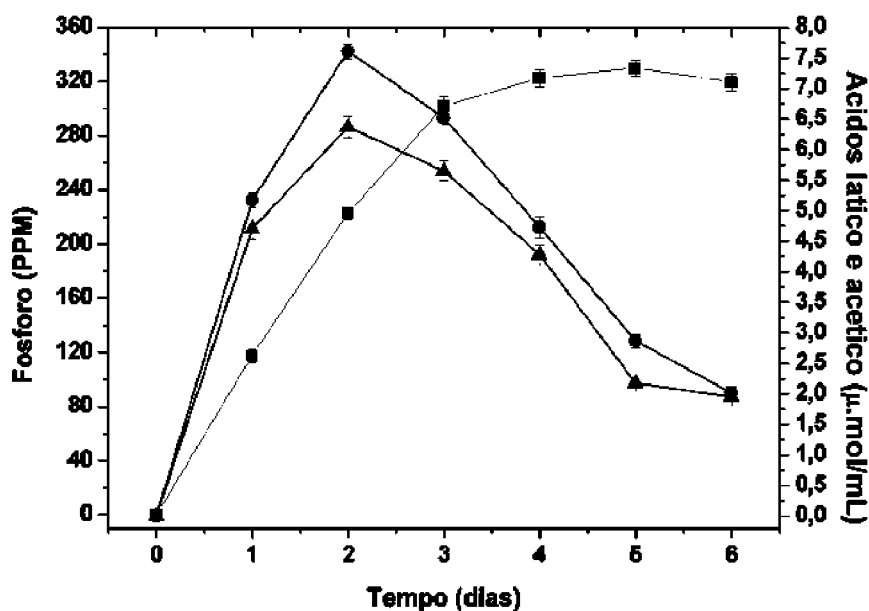


Figura 4.29 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 10 g/L, 0,5 VVM, reciclo do meio reacional: 200 mL/min, reposição de Glicose)

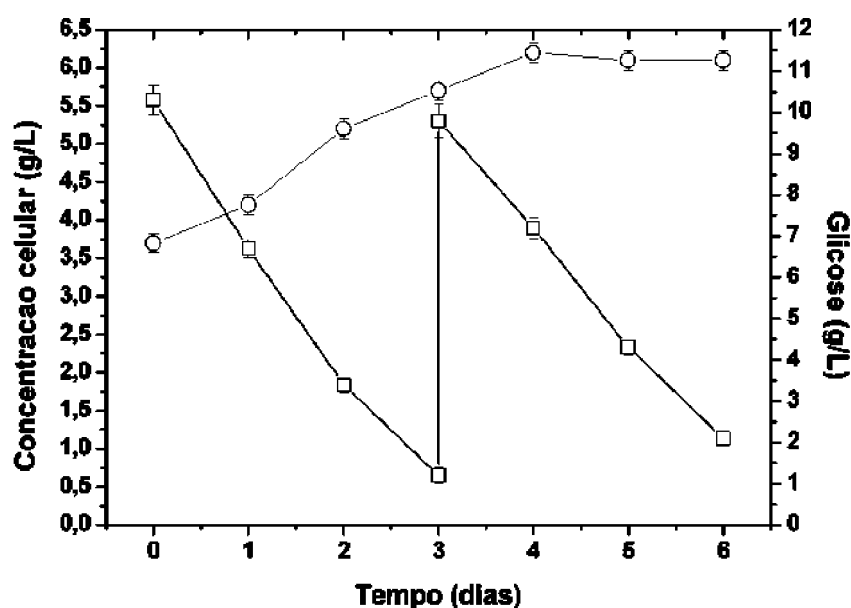


Figura 4.30 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 10 g/L, 0,5 VVM, reciclo do meio reacional: 200 mL/min, reposição de Glicose)

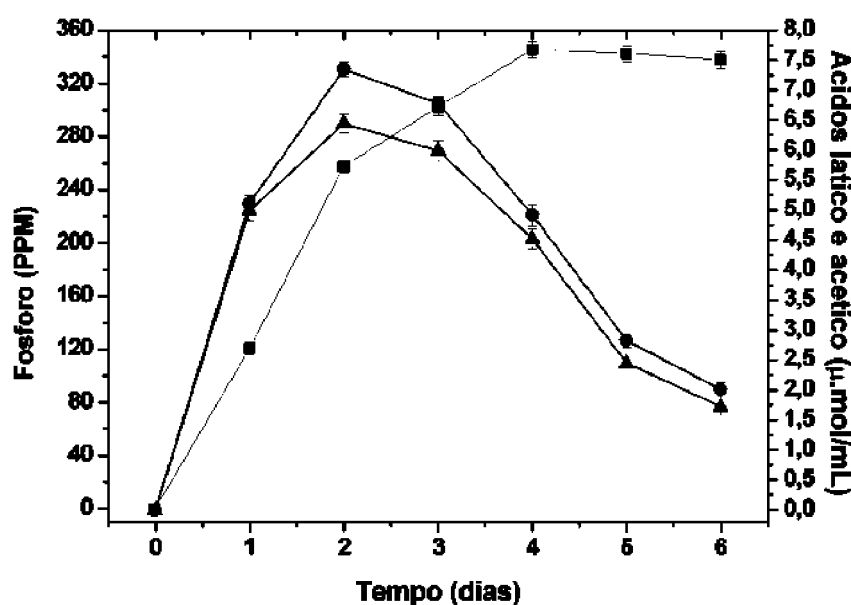


Figura 4.31 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,8 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 10 g/L, 0,5 VVM, reciclo do meio reacional: 200 mL/min, reposição de Glicose)

Ao avaliar a Figura 4.28 observa-se que no segundo dia de processo a concentração de glicose reduziu em 79,66% em relação a concentração inicial (5 g/L), sendo realizada a reposição do substrato. Observando ainda a Figura 4.29, verifica-se que no terceiro dia de processo houve a máxima produção de ácidos, 12,17 $\mu\text{mol/mL}$, acompanhado de um crescimento celular igual a 54,05%.

Ao aumentar a concentração de concentrado de rocha fosfática para 10 g/L, como pode ser observado nas Figuras 4.29 a 4.31, para o quarto dia de processo, observa-se uma solubilização de fósforo e concentração de ácidos orgânicos de 41,39% , 9,01 $\mu\text{mol/mL}$ e 22,16%, 9,44 $\mu\text{mol/mL}$, para as concentrações de 5 e 10 g/L de glicose, respectivamente. Ao operar o reator air-lift com glicose a 10 g/L (Figura 4.25), observa-se no quarto dia de processo a máxima solubilização (de 40,47%) ao empregar concentrado de rocha fosfática a 5 g/L. Para o mesmo período de operação do reator air-lift ao aumentar a concentração de concentrado fosfático para 10g/L mantendo o substrato em 10 g/L observa-se pela Figuras 4.31 a máxima solubilização de 22,16% (45,24% do valor encontrado ao utilizar concentrado de rocha fosfática a 5g/L).

Este comportamento mostra que mesmo com a redução da acidez do meio, a solubilização do fósforo teve uma pequena elevação, o que indica que o meio ainda dispunha de íons capazes de promover a liberação de fósforo através da formação de novas ligações. Após este período observou-se que não houve solubilização do fósforo e que a sua concentração manteve-se estável. Este comportamento pode estar relacionado à produção de metabólitos que impediram uma maior solubilização do fósforo e também a redução que ocorreu na concentração dos ácidos produzidos indicando que os mesmos foram consumidos ou convertidos em outros compostos pelas enzimas produzidas pelo microrganismo.

4.5 Combinação entre reator do tipo air-lift e reatores cônicos de bancada

4.5.1 Biossolubilização contínua em reator do tipo air-lift e reatores cônicos de bancada

4.5.1.1 Influência da concentração celular e concentrado de rocha fosfática na biossolubilização de fósforo em reatores cônicos de bancada

Como descrito no item 3.5.1.1 estudou-se a solubilização de fósforo em reatores cônicos de bancada, empregando meio reacional ácido produzido em reator air-lift. Como discutido no item 4.4, ao operar o biorreator air-lift com glicose e oncentrado de rocha fosfática a 5g/L obteve-se resultados expressivos em termos de biossolubilização e

concentração de ácidos orgânicos comparados com as outras condições. Sendo assim empregou-se em reatores cônicos de bancada o meio reacional produzido no quarto dia de processo do reator air-lift contendo 309,7 ppm de fósforo solúvel, 5,7 g/L de concentração celular e 8,75 $\mu\text{mol/mL}$ de ácidos orgânicos, como apresentado nas Figuras 4.22 e 4.23. Na etapa de solubilização em reatores cônicos adicionou-se apenas glicose no meio fermentado retirado do bioreator air-lift.

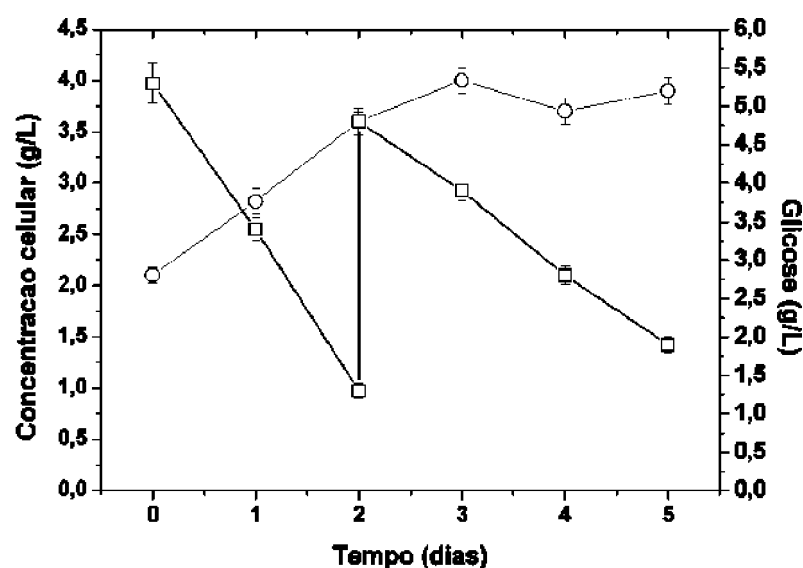


Figura 4.32 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos de bancada **sem adição extra de inóculo e concentrado de rocha fosfática** (Concentração de glicose: 5g/L) empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L)

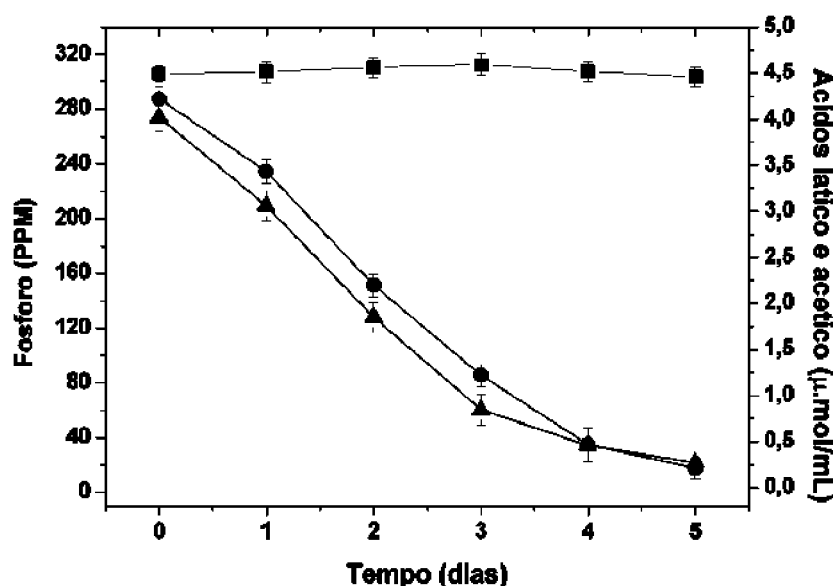


Figura 4.33 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos de bancada **sem adição extra de inóculo e concentrado de rocha fosfática** (Concentração de glicose: 5g/L) empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L)

Nos resultados apresentados nas Figuras 4.32 e 4.33, a concentração de fósforo solúvel foi igual a 312,4 ppm (corresponde a solubilização de 40,09 % do fósforo total e um aumento solubilização de 0,37% do fósforo total) no terceiro dia de processo em reatores cônicos de bancada, acompanhada por 2,07 $\mu\text{mol/mL}$ (pH 6,02) de ácidos orgânicos. A redução nos ácidos orgânicos indica que o microrganismo pode ter utilizado os mesmos como fonte de carbono e que a glicose ou outras fontes de carbono foram utilizadas para manutenção da cepa e crescimento celular que aumentou em 71,42% em três dias. A menor concentração celular inicial nos reatores cônicos de bancada foi devido à coleta do meio fermentativo apenas com cepas suspensas e não coleta de hifas presentes no meio, já que estas ficavam na forma de grânulos ao longo do reator e uma parte na superfície do reator. Este procedimento foi adotado para obter um meio inicial nos reatores cônicos de bancada mais homogêneo em relação à concentração celular.

Para os experimentos apresentados nas Figuras 4.34 e 4.35, foram adicionados nos reatores cônicos 5g/L de glicose e 5 g/L de concentrado de rocha fosfática no meio proveniente do air-lift.

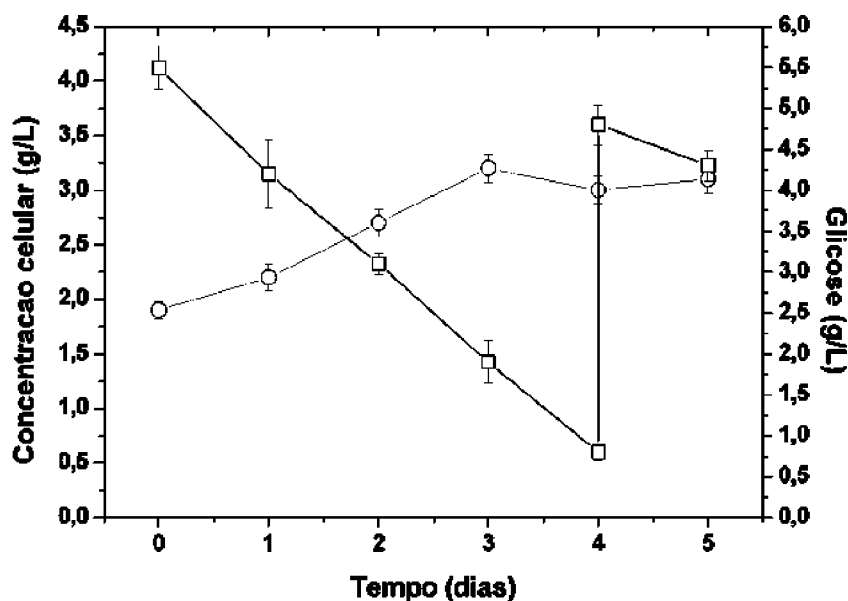


Figura 4.34 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos de bancada **sem adição extra de inóculo** (Concentração de glicose: 5g/L, concentrado de rocha fosfática: 5g/L) empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, Concentrado de rocha fosfática: 5 g/L)

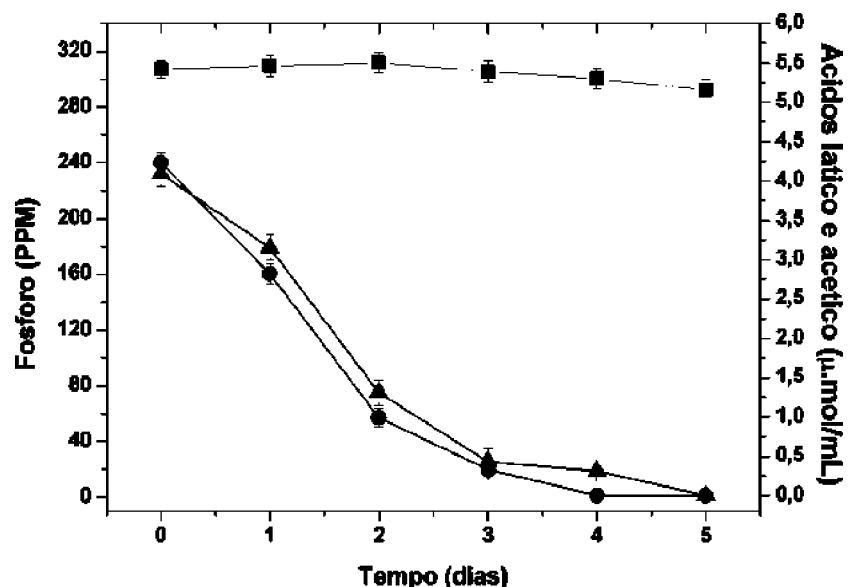


Figura 4.35 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos de bancada **sem adição extra de inóculo** (Concentração de glicose: 5g/L, concentrado de rocha fosfática: 5g/L) empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L)

No segundo dia de processo a máxima solubilização de fósforo foi observada (311,8 ppm), correspondendo a 40,02% de solubilização total do fósforo equivalente a 0,29% de

aumento de solubilização do fósforo total. Este aumento foi acompanhado pela concentração de ácidos orgânicos igual a $2,3 \mu\text{mol/mL}$ (pH 5,99). Este comportamento mostra que, como o experimento anterior, nos reatores cônicos de bancada houve predominantemente crescimento celular.

Finalmente avaliou-se a adição extra de inóculo (concentração final igual a $3,1 \text{ g/L}$) e glicose a 5 g/L ao meio reacional contendo $309,7 \text{ ppm}$ de fósforo solúvel proveniente do air-lift. Os resultados são apresentados nas Figuras 4.36 e 4.37.

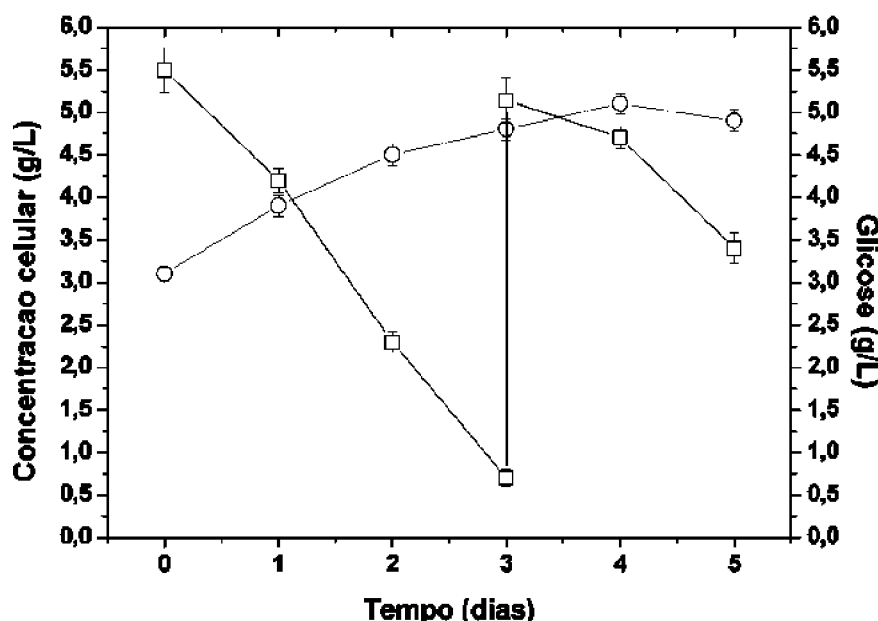


Figura 4.36 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos de bancada **sem adição de concentrado de rocha fosfática** (Concentração de glicose: 5 g/L , concentração celular inicial: $3,1 \pm 0,5 \text{ g/L}$) empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L , concentrado de rocha fosfática: 5 g/L)

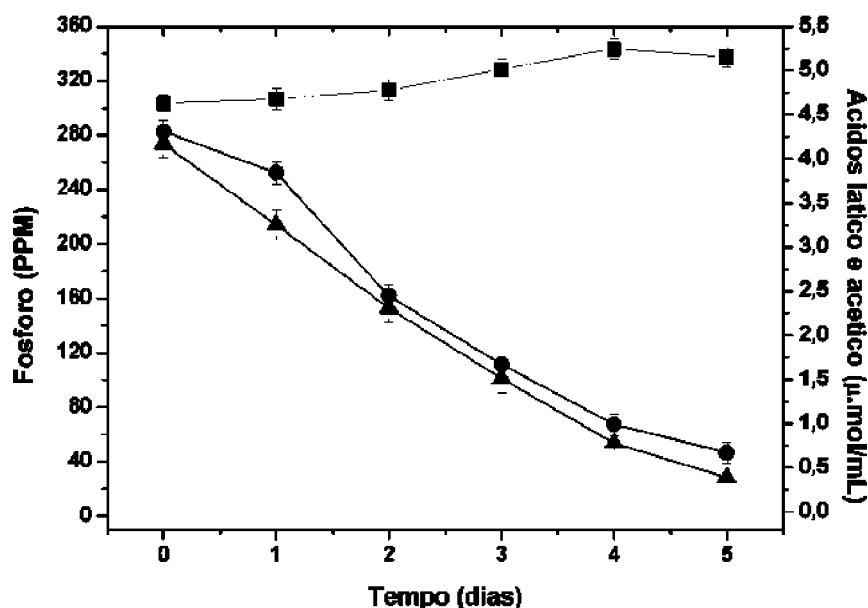


Figura 4.37 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos de bancada **sem adição de concentrado de rocha fosfática** (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,1 \pm 0,5$ g/L) empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L)

No terceiro dia de processo, como pode ser observado na Figura 4.37, houve uma solubilização de 43,43% de fósforo total, a qual inicialmente foi de 39,74% (aumento de 3,54%) e ainda uma produção de 3,18 $\mu\text{mol/mL}$ de ácidos orgânicos (pH 5,57). Resultados estes que sugerem uma influência positiva de adição de inóculo e glicose ao meio reacional produzido em reator air-lift como opção para a sequência da biossolubilização de fósforo em reatores cônicos de bancada. Este fato pode estar relacionado à presença de metabólitos tóxicos que foram produzidos no air-lift durante os quatro dias de processo.

Outro ponto a ser destacado é que apesar da queda na concentração de ácido ter ocorrido nos três experimentos, neste último, esta queda foi menor comparando os primeiros 3 dias de processo, o que justifica uma pequena melhora na solubilização do fósforo. De acordo com os resultados anteriores nota-se que a adição de concentrado de rocha fosfática ao meio reativo não influenciou positivamente o processo de biossolubilização de fósforo, observação esta que foi feita no trabalho de Mendes *et al.* (2014). Ao trabalhar com rochas fosfáticas como fonte de fosfato Mendes *et al.* (2014) observaram uma forte redução na produção de ácidos. Além de conter P, as rochas fosfáticas contêm outros elementos (Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Zn), sendo possível que a redução na concentração de ácidos

orgânicos tenha sido causada pela libertação de algum elemento químico, tais como Mn, Zn, Fe e Cu, mesmo em baixas concentrações (SHU e JOHNSON 1948; GADD, 1999; PAPAGIANNI, 2007).

Possível explicação para a diminuição ocorrida no presente trabalho na produção de ácidos no terceiro dia de processo ao adicionar concentrado de rocha fosfática ao meio reacional produzido em reator air-lift (Figura 4.35), atingindo o valor de $0,76 \mu\text{mol/mL}$ (ácidos láctico e acético), já que a fonte de fósforo é concentrado de rocha fosfática.

4.5.1.2 Influência do tempo reacional em reator do tipo air-lift, da concentração de glicose e de concentrado de rocha fosfática na biossolubilização de fósforo em reatores cônicos de bancada

Após avaliar os resultados obtidos no item anterior, observou-se que a adição de inóculo e glicose ao meio reacional produzido em air-lift influencia positivamente a concentração de ácidos orgânicos e a disponibilização de fósforo. Assim estudou-se conjuntamente a influência do tempo de reação em reator air-lift, as concentrações de glicose e concentrado de rocha fosfática no processo de biossolubilização em reatores cônicos de bancada. Os resultados são apresentados nas Figuras 4.38 a 4.43.

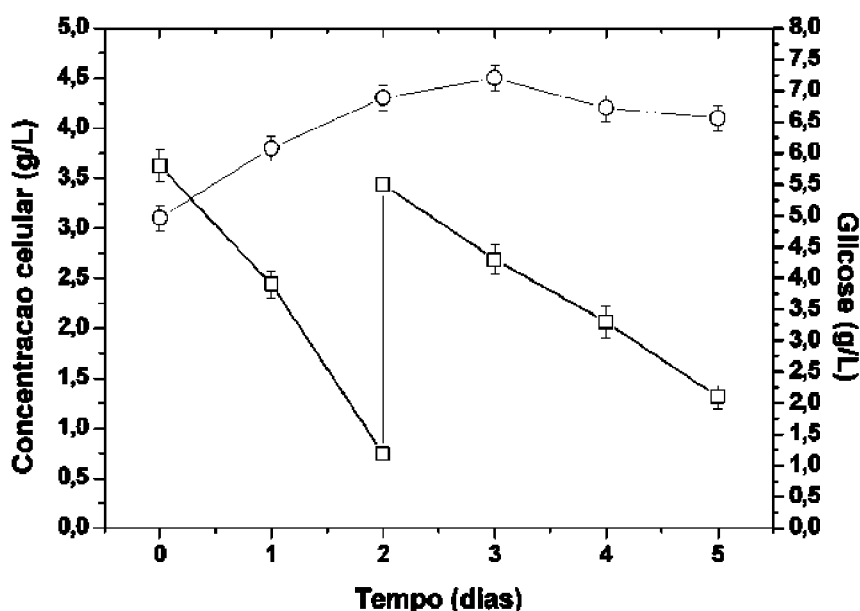


Figura 4.38 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos de bancada com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no quarto dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L)

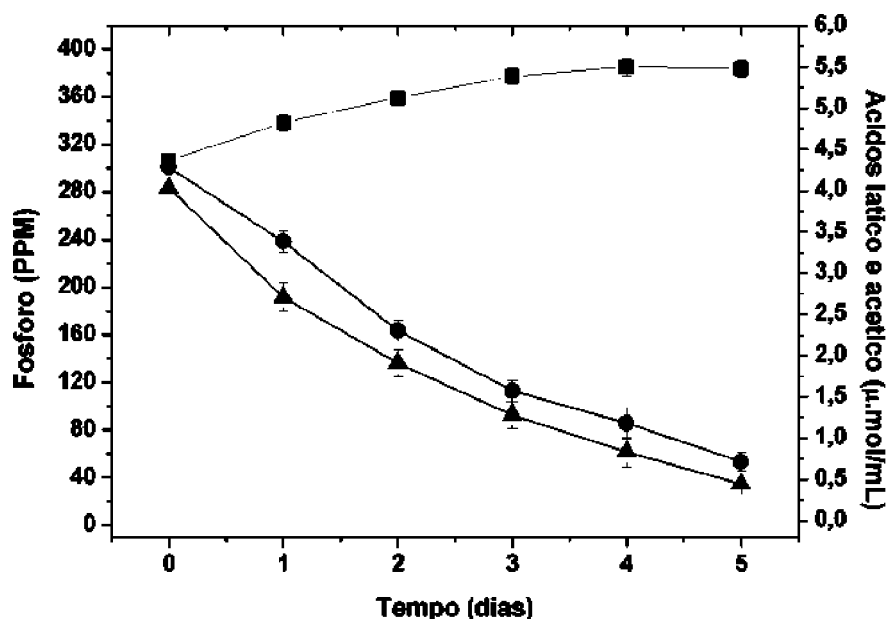


Figura 4.39 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos de bancada com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no quarto dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L)

Ao retirar do meio reacional ácido do reator air-lift no quarto dia de processo contendo 309,7 ppm de fósforo solúvel e adicionar concentrado de rocha fosfática e glicose a 5g/L e inóculo (3,1 g/L) em reator cônico de bancada nota-se um crescimento celular de 45,16% no terceiro dia de processo acompanhado pela solubilização de 24,20% (377 ppm) do fósforo total e concentração de ácidos igual a $2,85 \mu\text{mol/mL}$ (pH 5,68) .

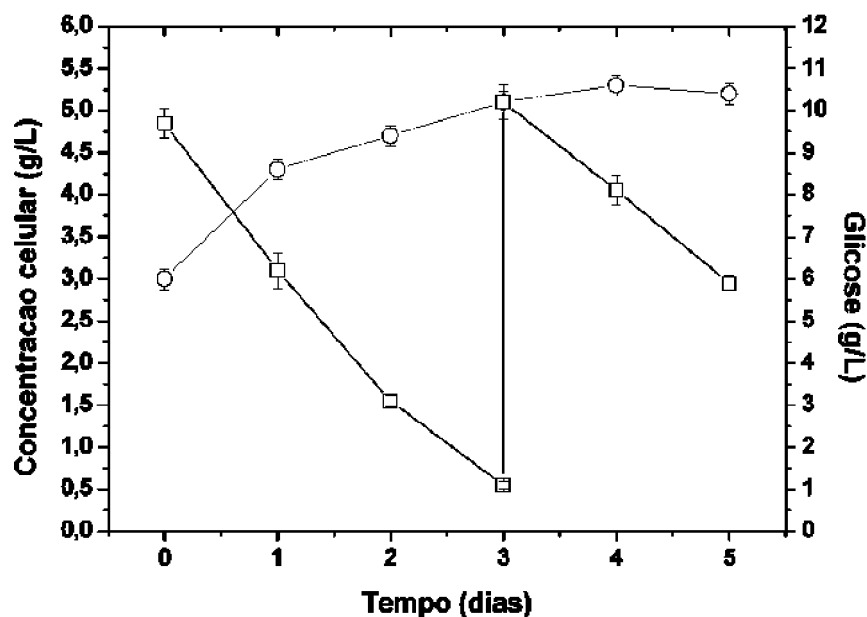


Figura 4.40 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos de bancada com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no quarto dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L)

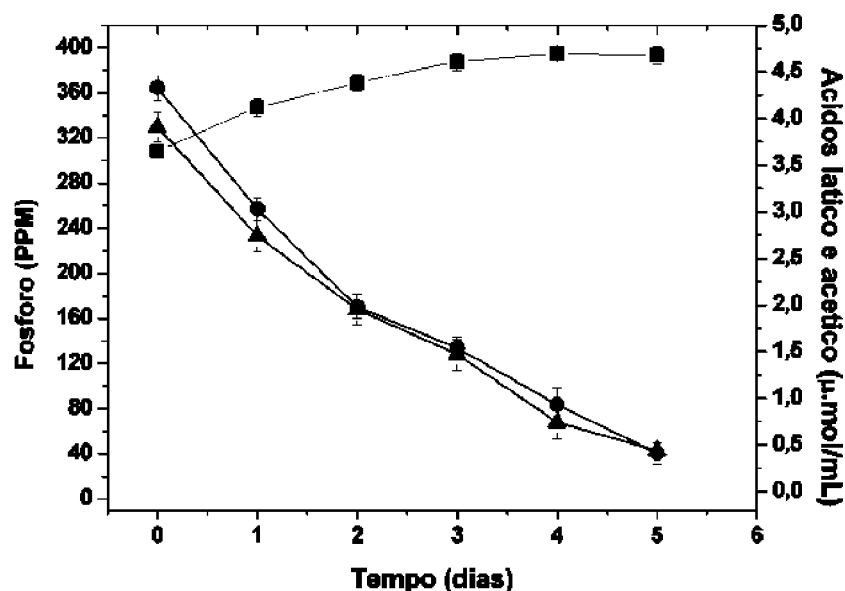


Figura 4.41 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos de bancada com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no quarto dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L)

Ao aumentar a adição de glicose ao meio produzido no quarto dia de processo para 10g/L, observa nas Figuras 4.40 e 4.41 uma solubilização de 24,89% (387,9 ppm) de fósforo total acompanhada por 3,01 $\mu\text{mol/mL}$ de ácidos orgânicos (pH 5,61) e crescimento celular de 70% até o terceiro dia de processo. A solubilização verificada foi próxima à alcançada para o mesmo período ao empregar glicose a 5 g/L em meio ácido, como apresentado na Figura 4.39.

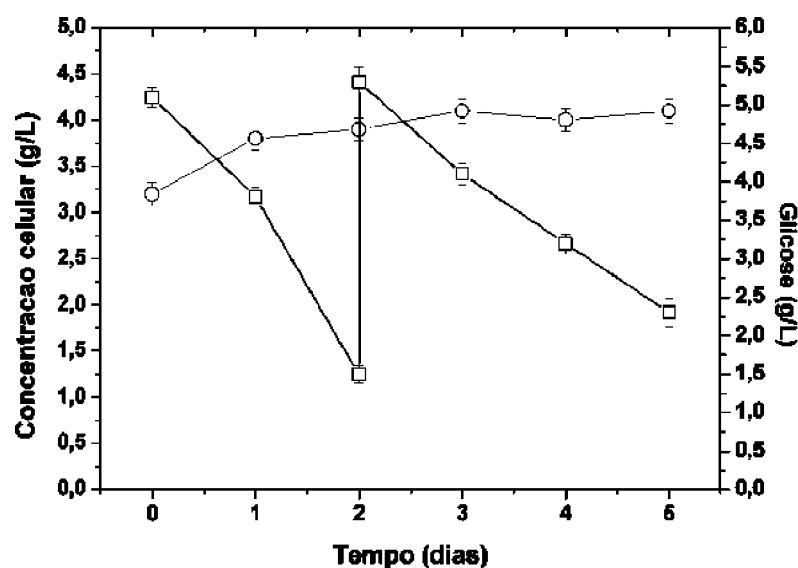


Figura 4.42 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos de bancada com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no quarto dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 10 g/L)

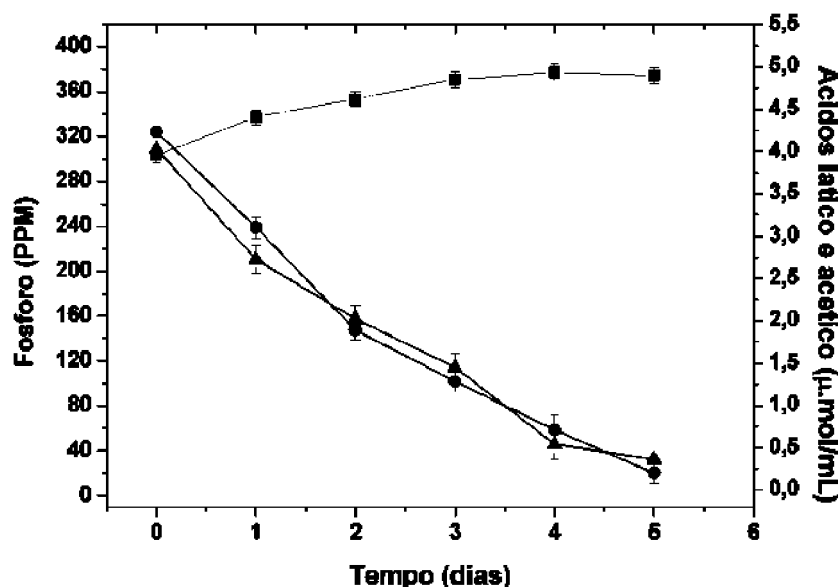


Figura 4.43 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos de bancada com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no quarto dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 10 g/L)

Ao aumentar a concentração de concentrado de rocha fosfática para 10 g/L e mantendo a concentração de glicose em 5 g/L (Figuras 4.42 e 4.43) adicionado ao meio ácido produzido no quarto dia de reator air-lift, obtém-se uma concentração de fósforo assimilável igual a 370,8 ppm (15,86% de solubilização em relação ao fósforo total) no terceiro dia de processo, atingindo 2,73 $\mu\text{mol/mL}$ de ácidos orgânicos (pH 5,82) e crescimento celular de 28,12%, ao iniciar o mesmo com uma concentração celular igual a 3,2 g/L.

Avaliou-se o processo de solubilização de fósforo empregando meio ácido produzido no quarto dia de processo em air-lift diante com adição de concentrado de rocha fosfática e glicose a 10 g/L. Os resultados estão apresentados nas Figuras 4.44 e 4.45.

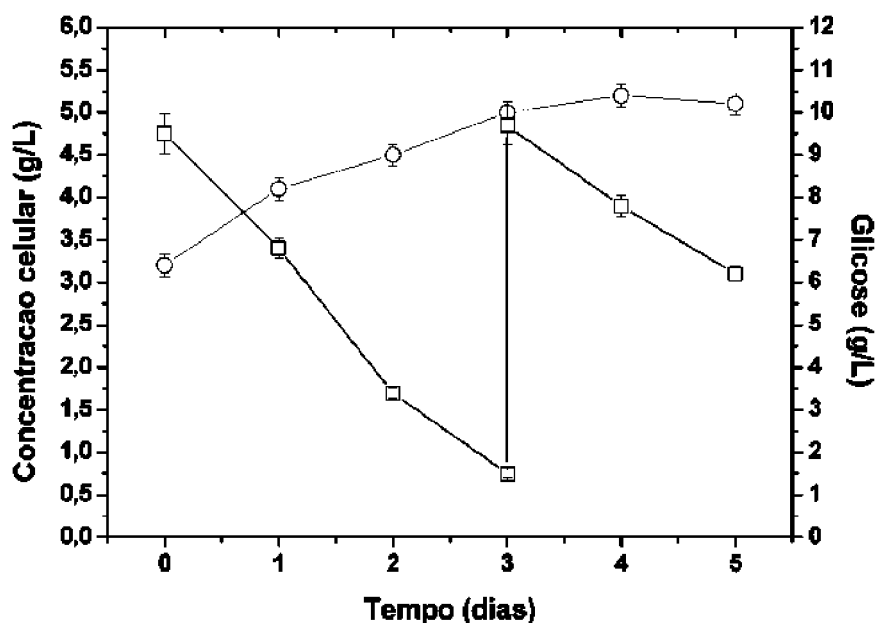


Figura 4.44 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos de bancada com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no quarto dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 10 g/L)

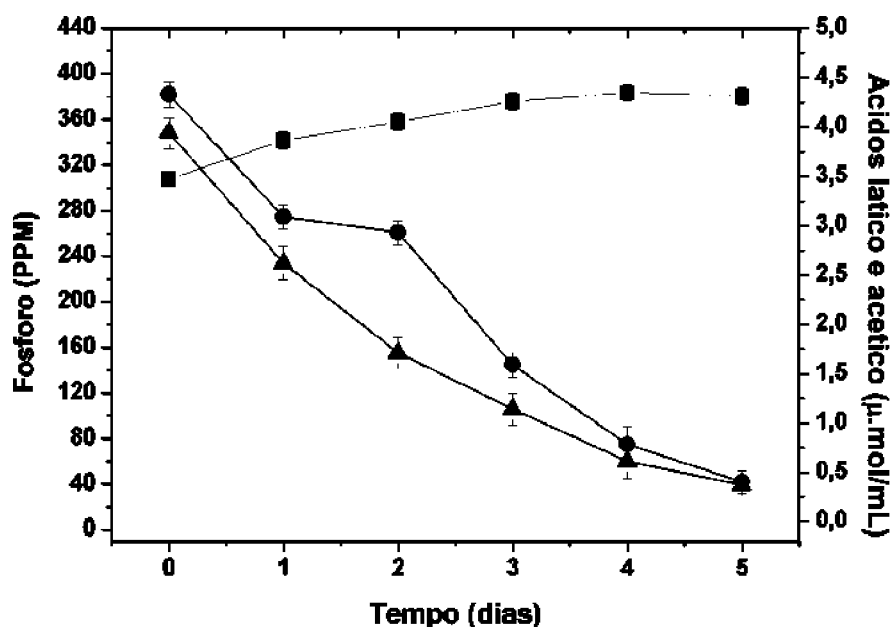


Figura 4.45 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos de bancada com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no quarto dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 10 g/L)

No terceiro dia de processo, em reatores cônicos de bancada, a concentração de fósforo foi de 375,8 ppm, valor próximo ao obtido anteriormente, indicando uma solubilização baixa de fósforo total (16,07 %) e crescimento celular de 56,25%. Estes resultados mostram que a adição de 10g/L de rocha nos reatores cônicos de bancada reduziu significativamente a solubilização do fósforo total, já que a concentração de fósforo solúvel no reator foi igual ou inferior a alcançada ao adicionar concentrado de rocha fosfática a 5 g/L.

Por outro lado, verificou-se que, em relação ao fósforo solúvel inicial em reatores cônicos de bancada (309,7 ppm), houve um aumento na concentração de fósforo solúvel final de 21,79%, 25,52% para a adição de 5 g/L de concentrado de rocha fosfática e 5 e 10 g/L de glicose, respectivamente, e de 19,73 e 21,34 %, para a adição de 10g/L de concentrado de rocha fosfática e 5 e 10 g/L de glicose, respectivamente em reatores cônicos de bancada no terceiro dia de processo. O aumento da concentração de concentrado de rocha fosfática no meio reativo não foi acompanhado pelo aumento da concentração percentual de fósforo solúvel como observado nos resultados obtidos anteriormente.

A concentração de rocha fosfática é conhecida por afetar a concentração final de P solúvel e a taxa de solubilização (XIAO *et al.* 2008; MENDES *et al.* 2013). De acordo com Mendes *et al.* (2014) a concentração de rocha fosfática pode explicar a menor percentagem de solubilização ao empregá-la como fonte de fosfato, em que concentrações elevadas de rocha fosfática provavelmente tem um efeito inibidor na solubilização.

Neste trabalho ao aumentar a concentração do concentrado de rocha fosfática para 10 g/L observou-se nas Figuras 4.43 e 4.45, concentrações inferiores de fósforo solúvel iguais a 370,8 e 375,8 ppm no terceiro dia de processo, acompanhadas pelas concentrações totais de ácidos orgânicos também inferiores iguais a 2,71 e 1,98 $\mu\text{mol/mL}$, respectivamente.

Mendes *et al.* (2014) ainda explicaram que as constantes de estabilidade ($\log K$) mostram que há uma forte interação entre estes ácidos e Al^{3+} (ácido cítrico: 7,98; ácido glucônico: 1,98 (Motekaitis e Martell (1984)); ácido glucônico: 7,29 (Furia (1972))). Assim, estes ácidos orgânicos podem aumentar a concentração de P solúvel por reações de troca de ligantes ou por complexação de íons metálicos liberados para a solução, assim, impedir a precipitação de P com esses íons e abaixando o estado de saturação da solução (STUMM 1986; JONES 1998; FOX *et al.* 1990a). A produção de ácido cítrico e, em maior proporção, ácido oxálico por *Aspergillus niger* FS1 explica a solubilização de AlPO_4 .

Diante destes resultados e como para o tempo de 3 dias em reator air-lift a concentração de ácidos orgânicos foi maior (11,03 $\mu\text{mol/mL}$). Foram realizados experimentos em reatores cônicos de bancada retirando meio fermentativo no terceiro dia de processo no

air-lift, adicionando ao reator cônico 5 g/L de concentrado de rocha fosfática e 5 e 10 g/L de glicose. Estes resultados estão apresentados nas Figuras 4.46 a 4.49.

Como mencionado anteriormente, empregou-se o meio líquido produzido no terceiro dia de operação do reator air-lift contendo 268,1 ppm de fósforo solúvel, 5,2 de concentração celular e 11,03 $\mu\text{mol/mL}$ de ácidos orgânicos. Os resultados a partir da adição de inóculo, glicose e concentrado de rocha fosfática são apresentados nas Figuras 4.46 a 4.49.

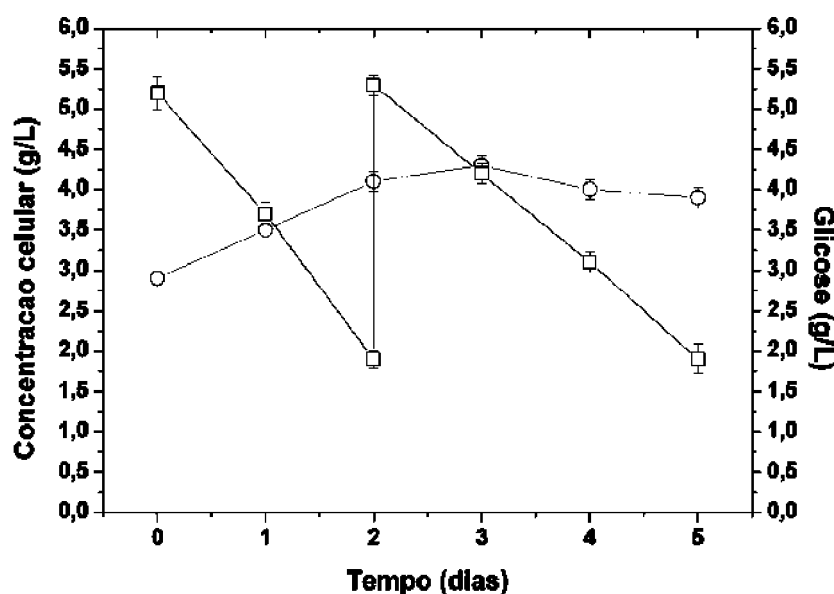


Figura 4.46 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos de bancada com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no terceiro dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,0 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L)

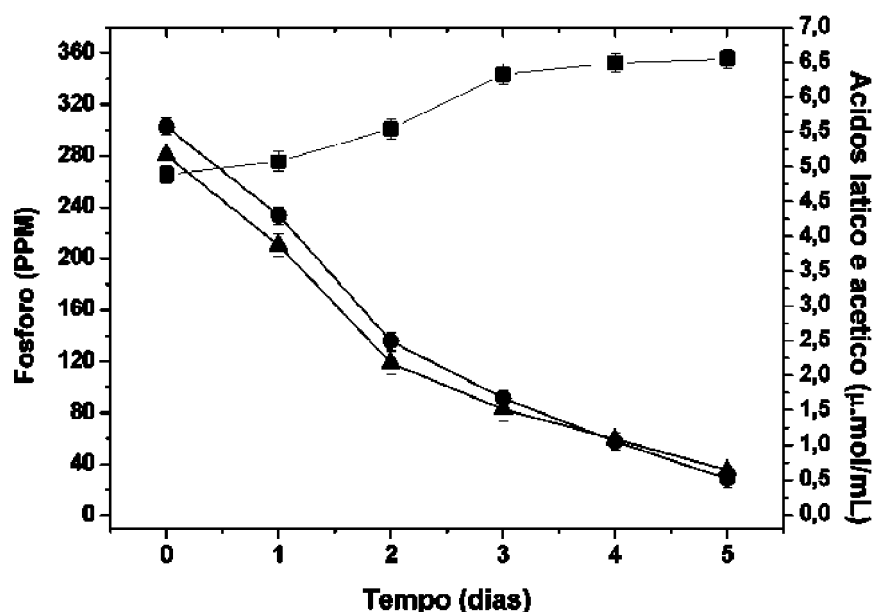


Figura 4.47 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos de bancada com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no terceiro dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,0 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L)

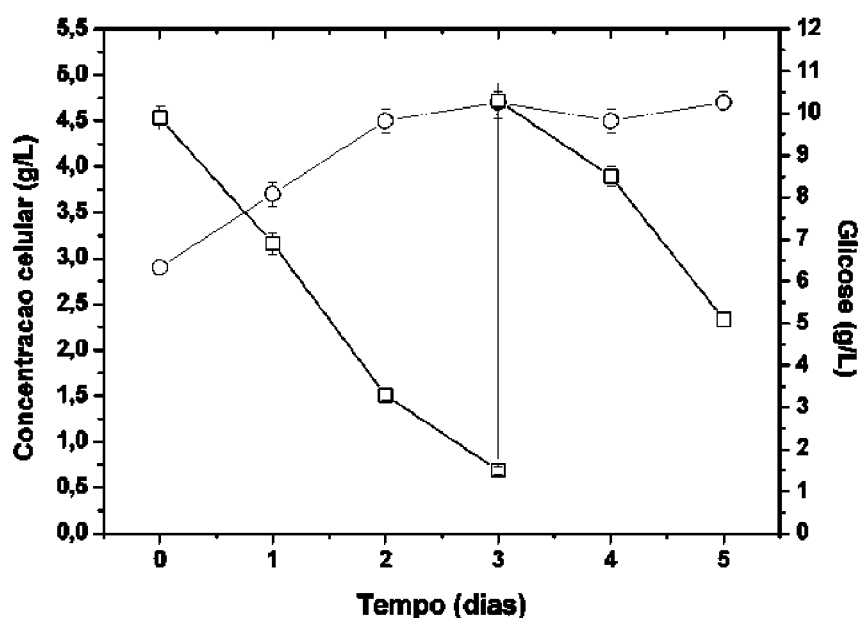


Figura 4.48 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos de bancada com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no terceiro dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, Concentrado de rocha fosfática: 5 g/L)

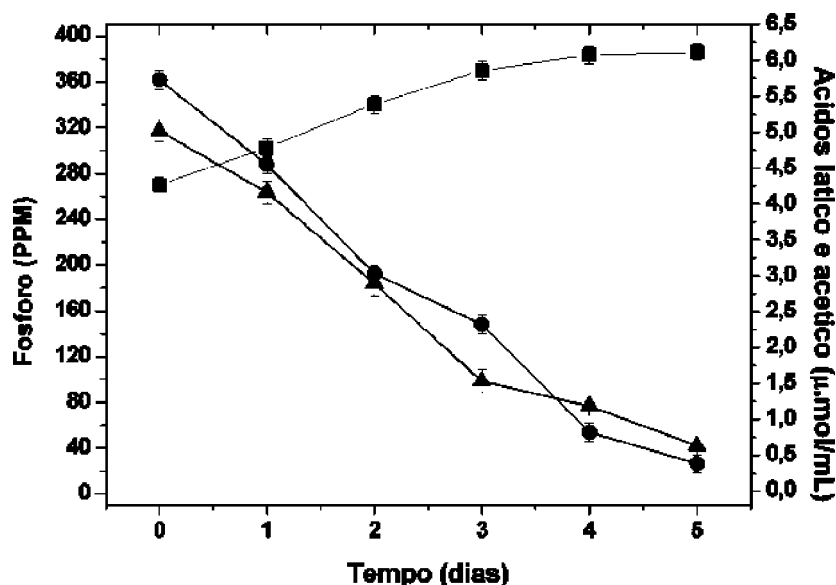


Figura 4.49 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos de bancada com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no terceiro dia de processo a $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, Concentrado de rocha fosfática: 5 g/L)

Ao avaliar as Figuras 4.46 a 4.49 observa-se que a adição de concentrado de rocha fosfática e glicose a 5g/L ao meio reacional produzido em reator air-lift no terceiro dia provocou no terceiro dia de operação dos reatores cônicos de bancada uma solubilização de 22,01% em relação ao fósforo total acompanhada pela produção de 3,18 $\mu\text{mol/mL}$ de ácidos orgânicos (pH 5,59). A solubilização e a concentração de ácidos orgânicos aumentaram para 23,72% e 3,85 $\mu\text{mol/mL}$ (pH 5,37) também no terceiro dia ao adicionar glicose a 10 g/L e concentrado de rocha fosfática a 5g/L.

Em relação ao aumento do fósforo solúvel inicial (268,1 ppm) houve um aumento de 27,93% e de 37,90% para a concentração de fósforo solúvel no terceiro dia de processo em reatores cônicos de bancada para 5 e 10 g/L de glicose, respectivamente. Estes valores foram superiores ao empregar o meio produzido no quarto dia de operação de air-lift (21,79% e 25,25% de aumento para 5 e 10 g/L de glicose, respectivamente), mostrando que a maior concentração inicial de ácidos orgânicos favoreceu o processo de solubilização em relação à concentração de fósforo solúvel inicial presente nos reatores cônicos de bancada.

Por outro lado, ao comparar com o fósforo total inicial os valores de 22,01 % e 23,72 % para a concentração de glicose de 5 e 10 g/L, respectivamente, apresentaram-se inferiores aos obtidos anteriormente (24,21 e 24,88 %). Isto ocorreu devido à maior concentração de

fósforo solúvel no início do processo em reatores cônicos de bancada para o meio retirado no quarto dia do air-lift.

Apesar de se obter menor valor de fósforo solúvel em relação ao total, o procedimento de retirada do meio do air-lift no terceiro dia de processo pode ser favorável, já que a diferença foi de 2,20 % e 1,16% e ainda houve a redução de 1 dia de processo no total.

Faz-se então necessária a comparação dos seguintes processos de solubilização de fósforo:

- **P1:** processo de biossolubilização apenas reator air-lift (concentrado de rocha fosfática: 5 g/L e glicose: 10g/L) no quarto dia: 315,15 ppm de fósforo solúvel, solubilização total de 40,47%, concentração de ácidos orgânicos: 9,72 $\mu\text{mol/mL}$;

- **P2:** processo de biossolubilização em air-lift (concentrado de rocha fosfática: 5 g/L e glicose: 5 g/L) com retirada do meio no terceiro dia conjugado com biossolubilização em reatores cônicos de bancada (concentrado de rocha fosfática: 5 g/L e glicose: 10 g/L) no terceiro dia de processo: 369,7 ppm de fósforo solúvel, solubilização total de 23,72%, concentração de ácidos orgânicos: 3,85 $\mu\text{mol/mL}$;

No processo P1 o crescimento celular foi de 67,65% (quarto dia) e no processo P2 foi de 62,07% (terceiro dia). Apesar de o crescimento celular ter se apresentado mais acelerado no processo P2, a partir do terceiro dia a concentração celular no mesmo estabilizou não atingindo assim a concentração alcançada no quarto dia de processo em P1. Ainda comparando os processos P1 e P2 nota-se que o meio final do processo P2 apresenta uma maior quantidade de fósforo insolúvel. Assim, a solubilização total de fósforo foi superior para o processo P1 acompanhada pelo consumo de glicose igual a 11,7 g/L, valor inferior ao consumo de substrato em P2 igual a 15,8 g/L. Porém, mesmo que a concentração final de fósforo solúvel tenha sido maior no processo P2, o processo P1, conforme análise anterior é economicamente mais viável e ambientalmente mais favorável, diante principalmente do menor tempo de processo empregado.

Com objetivo de avaliar a concentração de ácidos orgânicos pelo microrganismo fúngico de estudo deste trabalho, operou-se o reator air-lift isento de concentrado de rocha fosfática.

4.5.2 Produção de ácidos orgânicos em reator air-lift e biossolubilização de fósforo em reatores cônicos de bancada

Com objetivo de estudar o processo de solubilização em série, avaliou-se a produção de ácidos orgânicos em reator air-lift isento de concentrado de rocha fosfática seguida pela solubilização de fósforo derivado de concentrado de rocha fosfática em reatores cônicos de bancada empregando meio reacional produzido em reator air-lift.

4.5.2.1 Influência da concentração de glicose no meio reacional produzido em biorreator do tipo air-lift

Inicialmente, avaliou-se a concentração de ácidos orgânicos em reator air-lift diante da concentração de glicose igual 5 e 10g/L. Os resultados obtidos durante 5 dias de operação são apresentados nas Figuras 4.50 a 4.53.

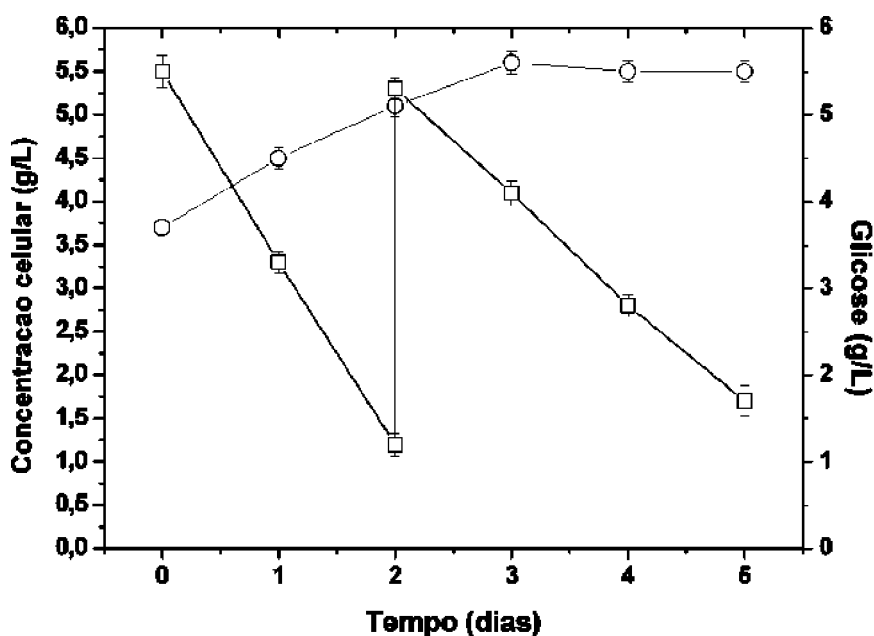


Figura 4.50 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,5 \pm 0,5$ g/L, 0,5 VVM, reciclo: 200 mL/min, reposição de glicose)

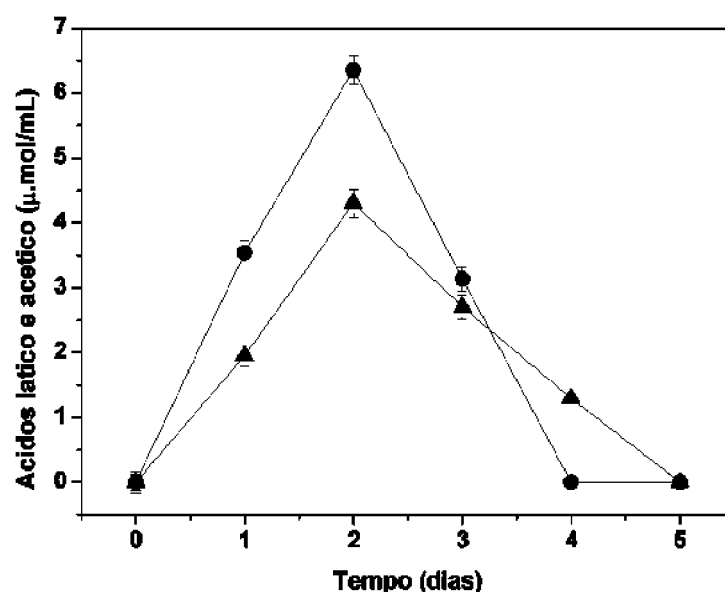


Figura 4.51 – Concentração de ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,5 \pm 0,5$ g/L 0,5 VVM, reciclo: 200 mL/min, reposição de glicose)

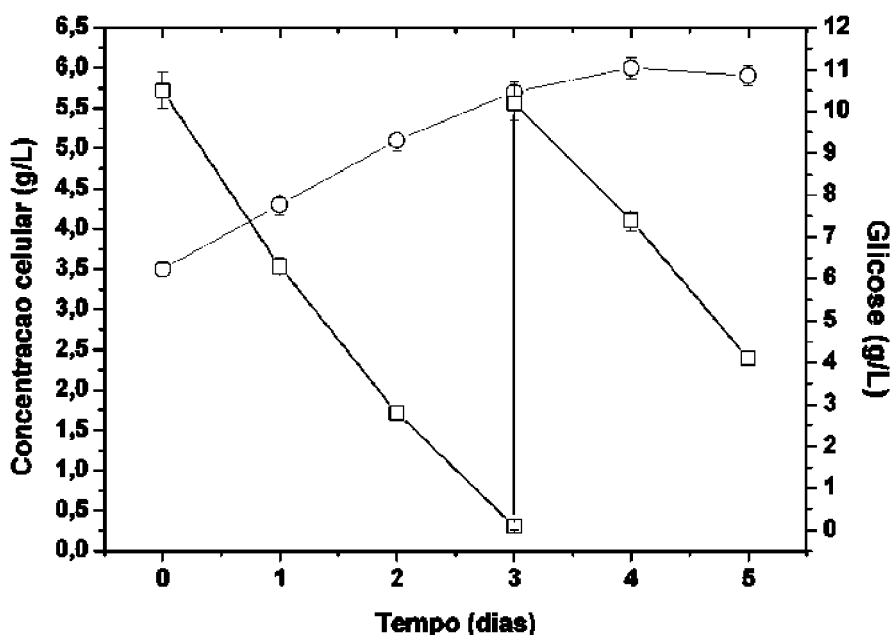


Figura 4.52 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,5 \pm 0,5$ g/L, 0,5 VVM, reciclo: 200 mL/min, reposição de glicose)

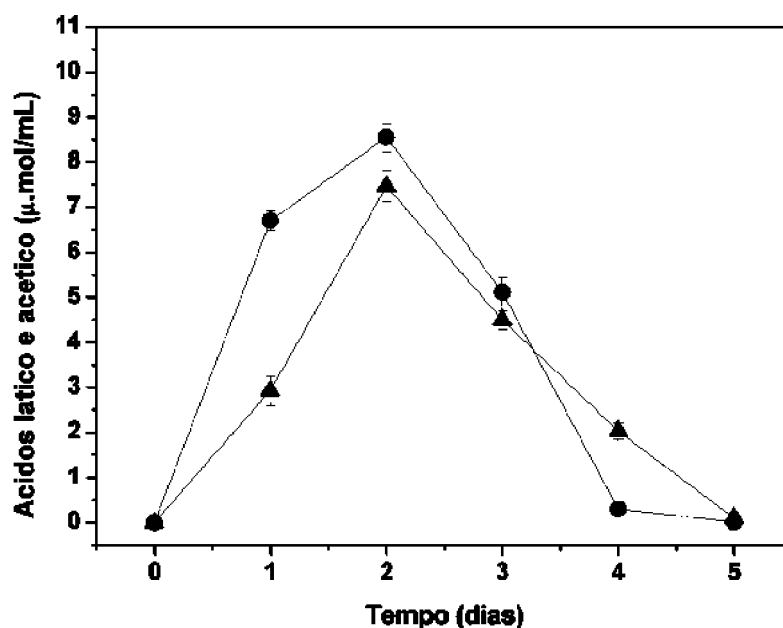


Figura 4.53 – Concentração de ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator tipo air-lift a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,5 \pm 0,5$ g/L, 0,5 VVM, reciclo: 200 mL/min, reposição de glicose)

Ao avaliar as Figuras 4.50 a 4.53 nota-se que para a concentração de glicose igual a 5 g/L, no segundo dia de operação do reator air-lift isento de concentrado de rocha fosfática houve um crescimento celular de 37,84% acompanhado pela concentração de ácidos orgânicos igual a $10,65 \mu\text{mol/mL}$ (pH 4,32), em que a reposição de glicose foi realizada neste período. Já para a concentração de glicose igual a 10 g/L a reposição do substrato ocorreu no terceiro dia de processo, sendo que a máxima concentração de ácidos orgânicos igual a $16,02 \mu\text{mol/mL}$ (pH 3,99) ocorreu no segundo dia de processo acompanhada por um crescimento celular igual a 45,71%.

Ao avaliar em conjunto a concentração de ácidos orgânicos e o potencial hidrogeniônico do meio reativo observa-se, como citado por Silva (2012) que estas variáveis são normalmente uma medida da habilidade do microrganismos em solubilizar os cristais do composto insolúvel. Silva (2012) fez esta observação ao estudar e selecionar oito bactérias de abacaxi capazes de solubilizar fosfato insolúvel dos compostos $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$. Os ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias quelam os cátions, principalmente Ca^{2+} , ligados ao fosfato, por meio dos seus grupos carboxílicos, convertendo-os em formas solúveis (KPOMBLEKOU E TABATABAI, 1994). Entre os isolados bacterianos, foram identificados os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* e *Burkholderia*. Naz e Bano (2010)

demonstraram que o isolado de *Pseudomonas* pode ser utilizado como bioinoculante na proteção contra o estresse salino em milho, atuando como promotor do crescimento pela absorção de P para a planta.

Neste estudo, após avaliar a produção de ácidos diante da variação da concentração de glicose, avaliou-se a influência da adição extra de inóculo na biossolubilização de fósforo em reatores cônicos de bancada, empregando meio reacional produzido no segundo dia de operação do reator air-lift com concentração de substrato igual a 10 g/L.

4.5.2.2 Avaliação da adição extra de novo inóculo ao meio reacional produzido em biorreator do tipo air-lift no segundo dia de processo

Os resultados obtidos para a avaliação da influência da não adição extra e da troca seguida pela adição de um novo inóculo ao meio produzido no segundo dia de operação do reator air-lift isento de concentrado de rocha fosfática são apresentados nas Figuras 4.54 a 4.57.

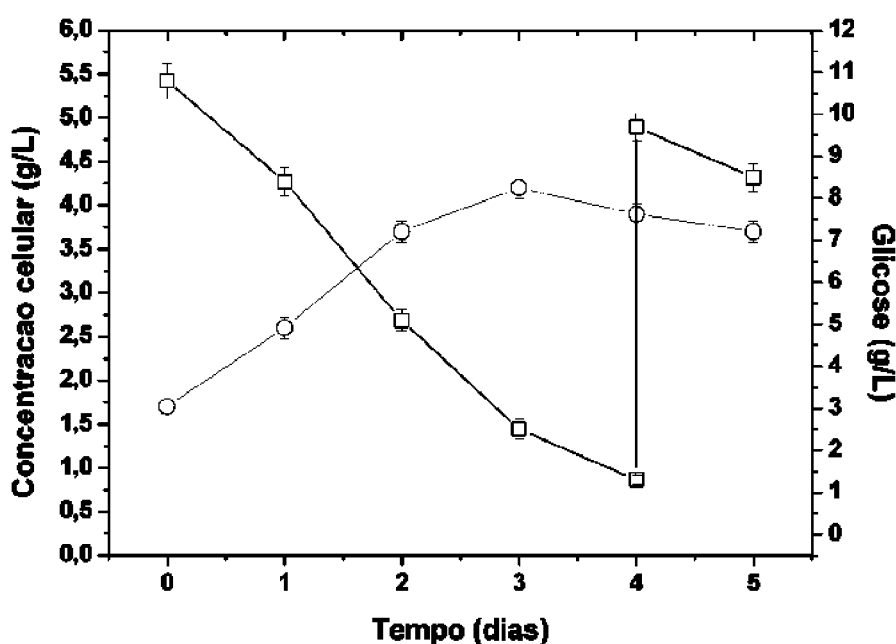


Figura 4.54 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos de bancada sem adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no segundo dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $1,5 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5g/L)

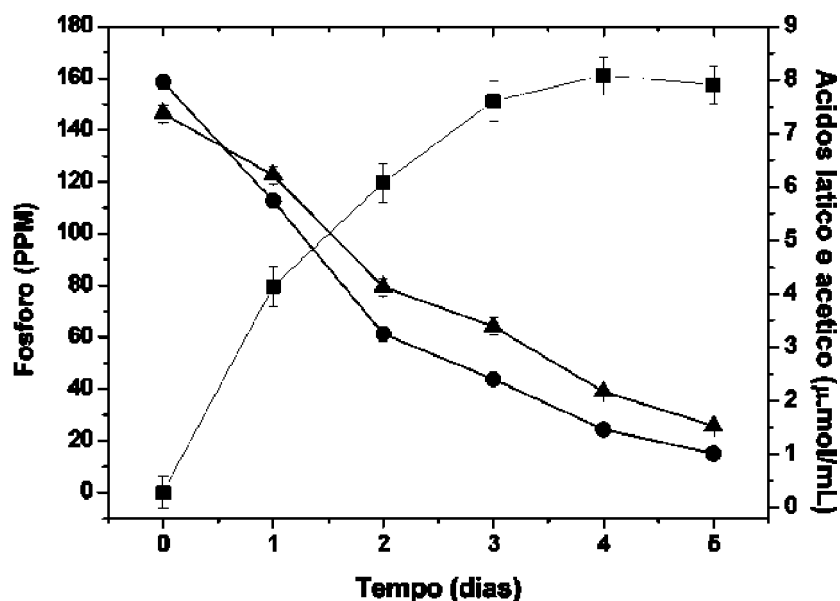


Figura 4.55 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos de bancada sem adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no segundo dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $1,5 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5g/L)

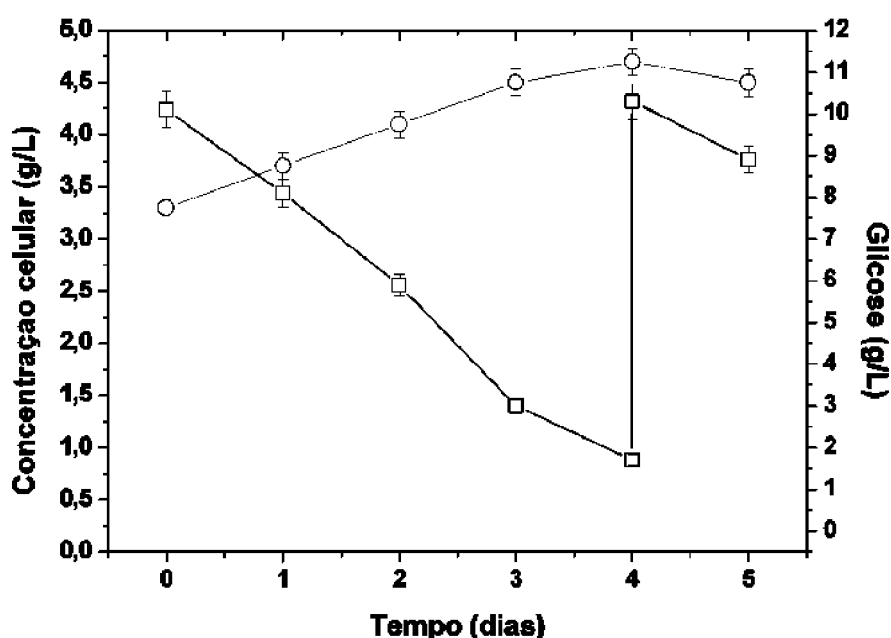


Figura 4.56 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos de bancada com troca de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no segundo dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5g/L)

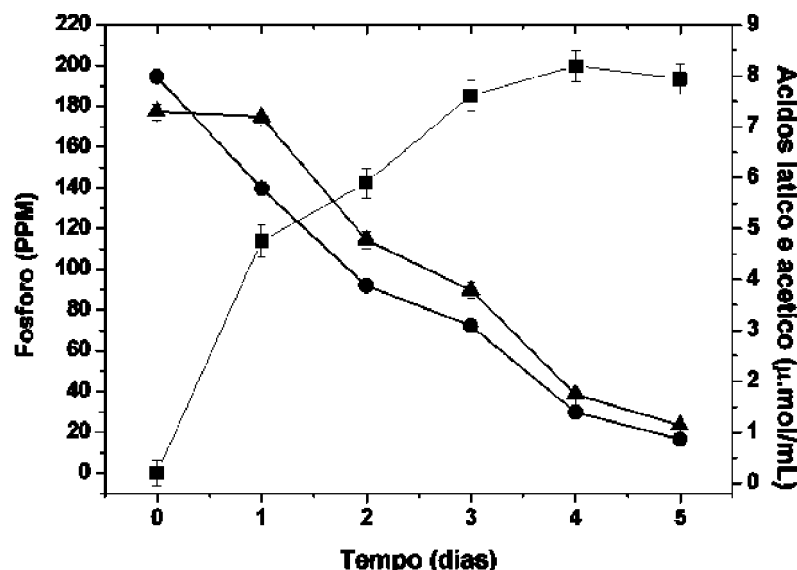


Figura 4.57 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos de com troca de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no segundo dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5g/L)

Ao avaliar as Figuras de 4.54 a 4.57 observa-se que ao trocar o inóculo do meio produzido no segundo dia de operação do reator air-lift, após a centrifugação do meio original, tem-se uma solubilização no terceiro dia de operação em reatores cônicos de bancada igual a 23,78% acompanhada por um crescimento celular igual a 36,37% e 6,88 $\mu\text{mol/mL}$ de ácidos orgânicos (pH 5,13). Quando a troca e renovação das células não foram realizadas o crescimento celular para o mesmo período foi de 147,06% (concentração celular inicial: 1,7 g/L), a solubilização foi de 19,40% e a concentração de ácidos orgânicos igual a 7,38 $\mu\text{mol/mL}$ (pH 5,34).

Como sequência dos experimentos estudou-se a influência conjunta da concentração de glicose e concentrado de rocha fosfática no processo de biossolubilização em reatores cônicos de bancada empregando meio ácido produzido no segundo dia de operação do reator air-lift.

4.5.2.3 Influência da concentração de glicose e de concentrado de rocha fosfática na biossolubilização de fósforo em meio reacional produzido no segundo dia de processo do biorreator do tipo air-lift

Os resultados para concentração celular, consumo de glicose, concentração de fósforo e ácidos orgânicos diante da variação da concentração de substrato e concentrado de rocha

fosfática com adição extra de inóculo ao meio produzido no segundo dia do reator air-lift são apresentados nas Figuras 4.58 a 4.65.

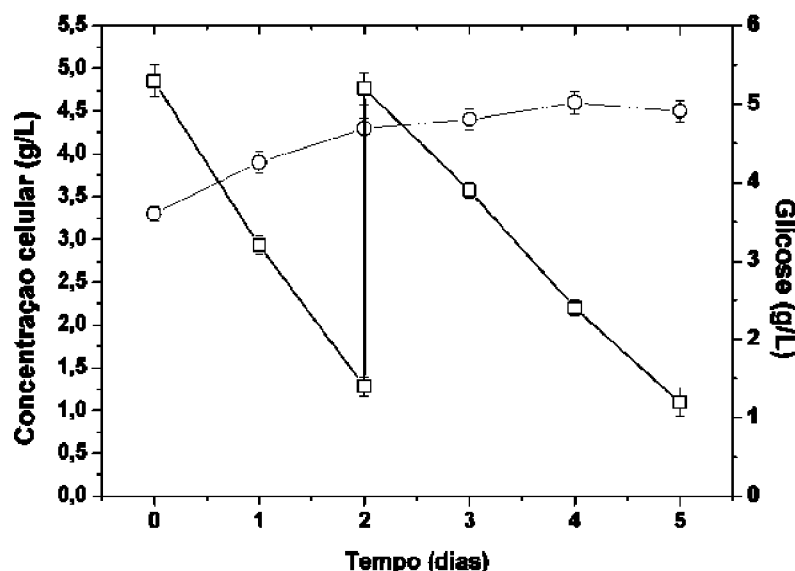


Figura 4.58 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no segundo dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5g/L)

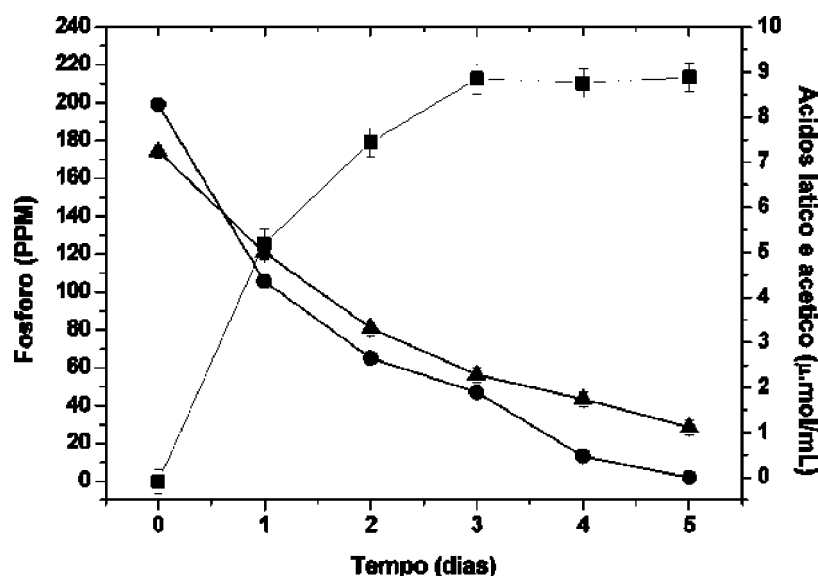


Figura 4.59 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no segundo dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5g/L)

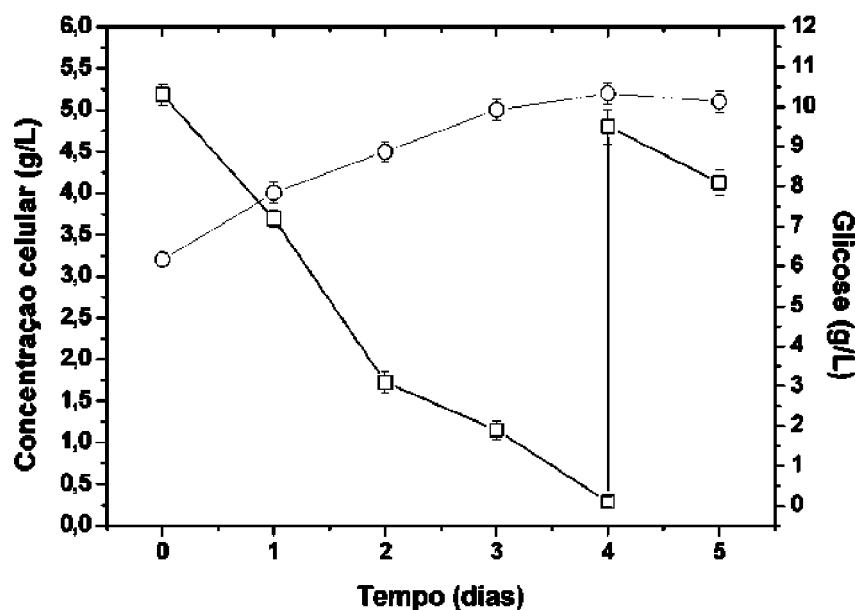


Figura 4.60 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no segundo dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5g/L)

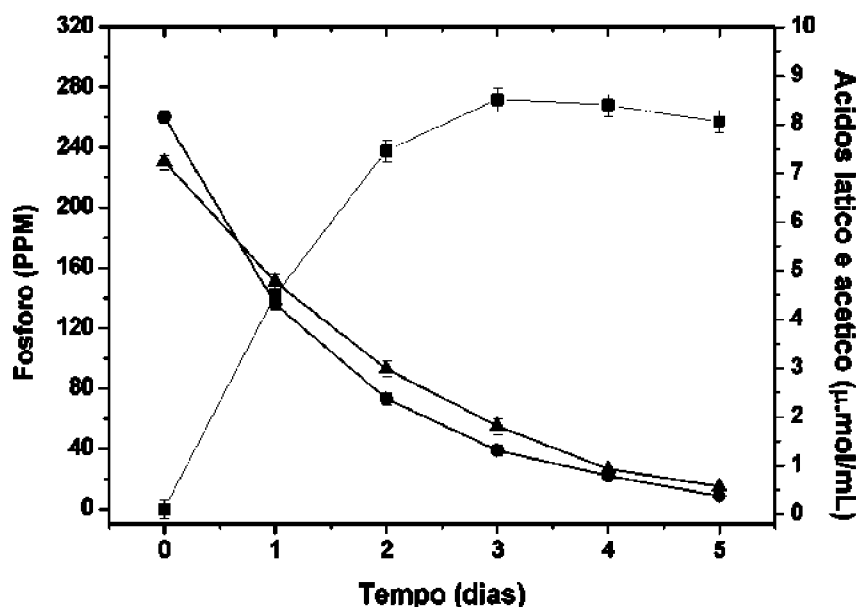


Figura 4.61 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no segundo dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5g/L)

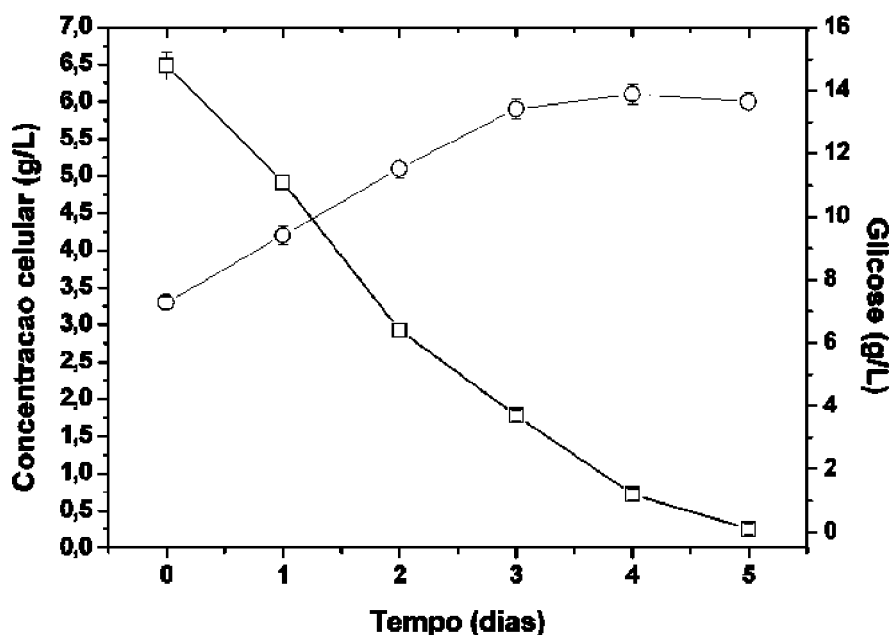


Figura 4.62 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no segundo dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 15 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5g/L)

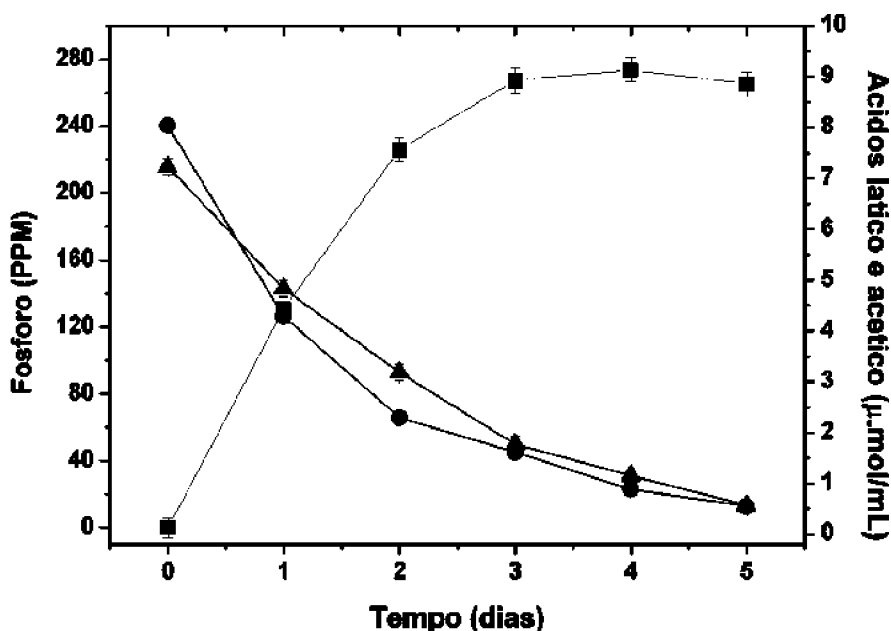


Figura 4.63 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no segundo dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 15 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5g/L)

Ao adicionar inóculo extra em reatores cônicos de bancada (concentração inicial: $3,2 \pm 1$ g/L), concentrado de rocha fosfática a 5 g/L e glicose em diferentes concentrações ao meio reacional produzido no segundo dia de operação do reator air-lift, observa-se valores de solubilização de fósforo e concentração de ácidos orgânicos iguais a 27,3% e $3,17 \mu\text{mol/mL}$ (pH 5,54) e crescimento celular de 24,5% para a concentração de glicose igual a 5 g/L; 34,88 % e $4,12 \mu\text{mol/mL}$ (pH 5,28) e crescimento celular de 63,5% para a concentração de glicose igual a 10 g/L; 34,3% e $3,38 \mu\text{mol/mL}$ (pH 5,47) e crescimento de 84,8% para a concentração de glicose igual a 15 g/L. Todos valores obtidos para o terceiro dia de operação de reatores cônicos de bancada.

Ao aumentar a concentração de concentrado de rocha fosfática para 10 g/L, mantendo a concentração de glicose igual a 10 g/L os resultados apresentados nas Figuras 4.64 e 4.65 foram obtidos.

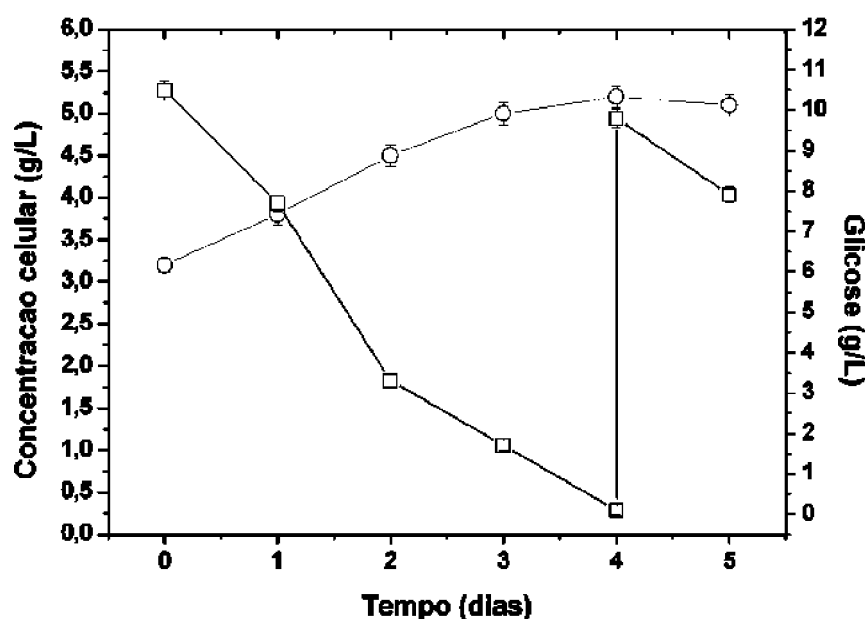


Figura 4.64 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no segundo dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 10 g/L)

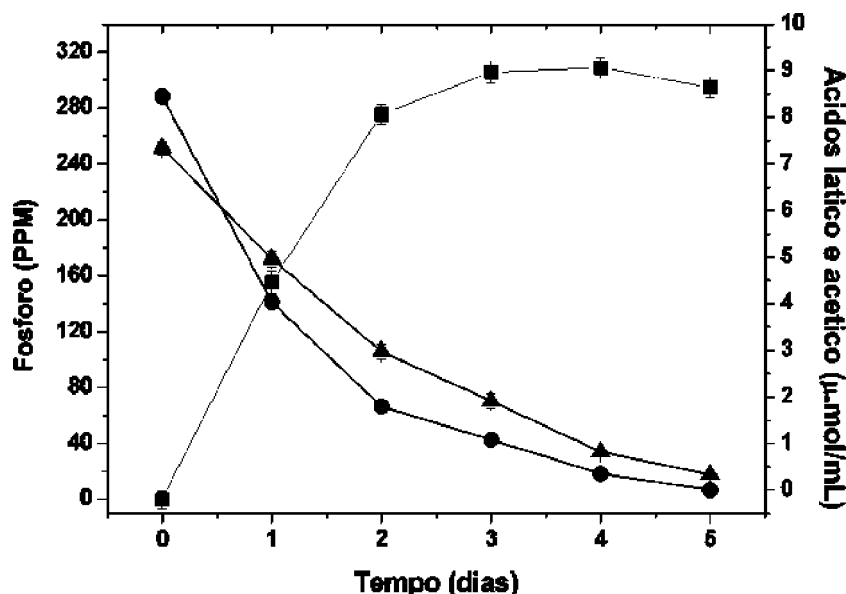


Figura 4.65 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no segundo dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 10 g/L)

No terceiro dia de processo, Figuras 4.64 e 4.65, em reatores cônicos de bancada atingiu-se 19,60% de solubilização do fósforo total derivado do concentrado de rocha fosfática, acompanhado pela redução de 88,80% de glicose e da produção de 3,62 $\mu\text{mol/mL}$ de ácidos orgânicos, pH 5,41 (láctico e acético) e crescimento celular de 65,6%. Ao comparar estes valores com os obtidos no terceiro dia de operação de reatores cônicos de bancada (concentração de glicose e concentrado de rocha fosfática iguais a 10 e 5 g/L, respectivamente) e empregando meio reativo produzido no segundo dia de reator air-lift (concentração de glicose e concentrado de rocha fosfática iguais a 10 e 5 g/L, respectivamente), observa-se que o aumento da concentração de concentrado de rocha fosfática não favoreceu a solubilização total do fósforo.

Chamou-se então de **P3** o processo que apresentou resultados superiores em termos de solubilização total de fósforo (34,88% de solubilização, 4,12 $\mu\text{mol/mL}$ de ácidos orgânicos,). Estes valores correspondem ao terceiro dia de processo de reatores cônicos de bancada (concentração de glicose e concentrado de rocha fosfática iguais a 10 e 5 g/L, respectivamente) empregando meio reativo produzido no segundo dia de reator air-lift (concentração de glicose e concentrado de rocha fosfática iguais a 10 e 5 g/L, respectivamente).

Ao avaliar a concentração de ácidos orgânicos em meio reativo no processo de biossolubilização de fósforo, a quelação de cátions pelos mesmos apresenta-se como o principal mecanismo de disponibilização do fósforo. Este mecanismo este bastante citado por Illmer e Schinner (1992) ao sugeriram que o aumento e diminuição na concentração de fósforo podem ser causados pela formação e a solubilização secundária de complexos orgânicos de P. Estes complexos podem ser utilizados como fontes de nutrientes ou energia, quando a composição do meio é alterada.

A solubilização de fósforo inorgânico por microrganismos tem sido atribuída a processos que envolvem reações de acidificação, de quelação e reações de trocas com o ambiente de crescimento (SPERBER, 1958; MOLLA e CHOWDHURY, 1984; RAPER e THORN, 1968; ROOS e LUCKNER, 1984). Sperber (1958) identificou metabólitos de ácidos orgânicos como o principal meio de solubilização de P inorgânico por *Aspergillus niger* e um *Penicillium* não identificado. Vários processos podem funcionar em conjunto com os outros, ou seja, ácidos orgânicos podem atuar como agentes quelantes e tem um efeito de acidificação direta sobre o meio ambiente circundante. (GAUR *et al.* 1973; SURANGE, 1985).

Sequencialmente estudou-se o processo de biossolubilização em reatores cônicos de bancada empregando meio ácido produzido no terceiro e primeiro dias de operação do reator air-lift, variando ainda a concentração de glicose.

3.5.3.4 Influência da concentração de glicose na biossolubilização de fósforo em meio reacional produzido no terceiro e primeiro dias de processo do biorreator do tipo air-lift

Os resultados para a disponibilização de fósforo em reatores cônicos de bancada empregando glicose a 5 e 10 g/L e concentrado de rocha fosfática a 5 g/L ao utilizar meio produzido no terceiro e primeiro dias de processo do reator ai-rlift isento de concentrado de rocha fosfática, são apresentados nas Figuras 4.66 a 4.69.

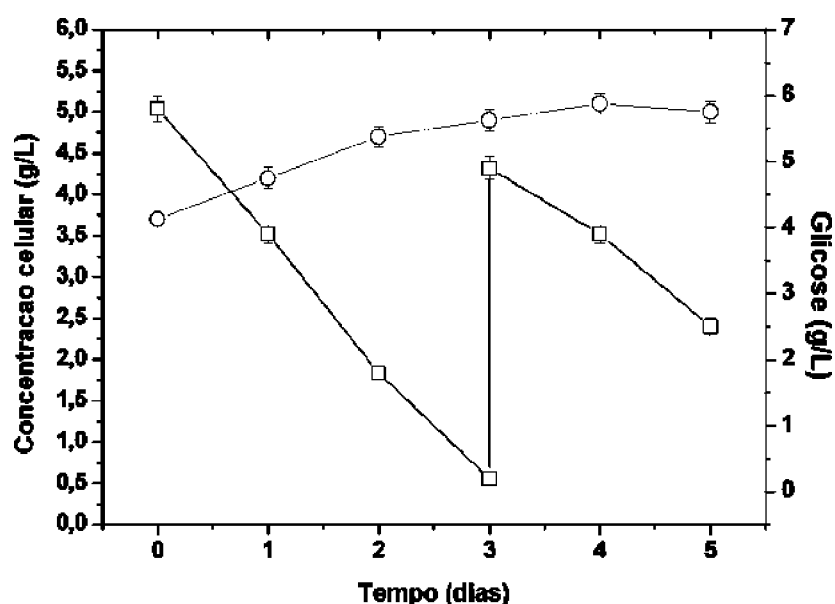


Figura 4.66 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no terceiro dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L)

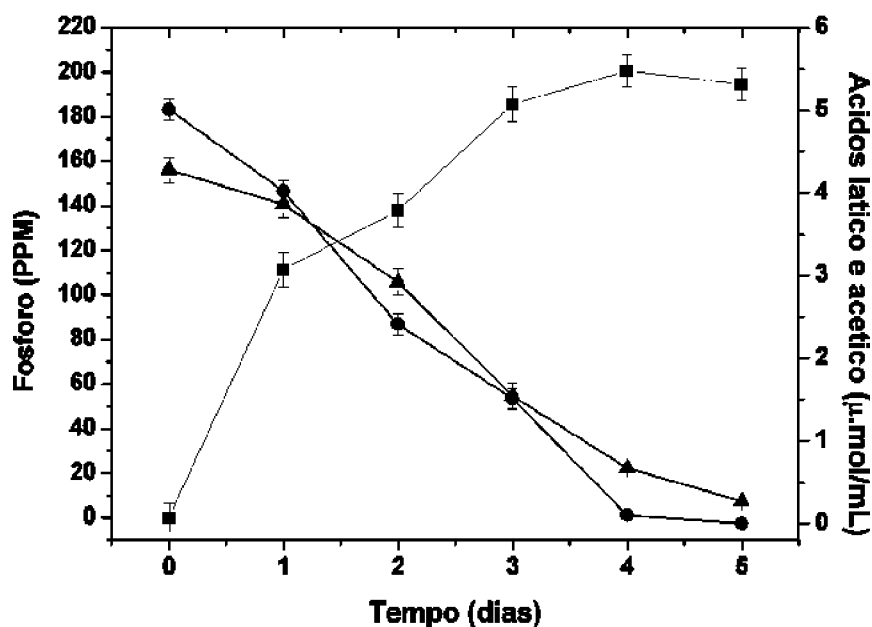


Figura 4.67 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no terceiro dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 5 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L)

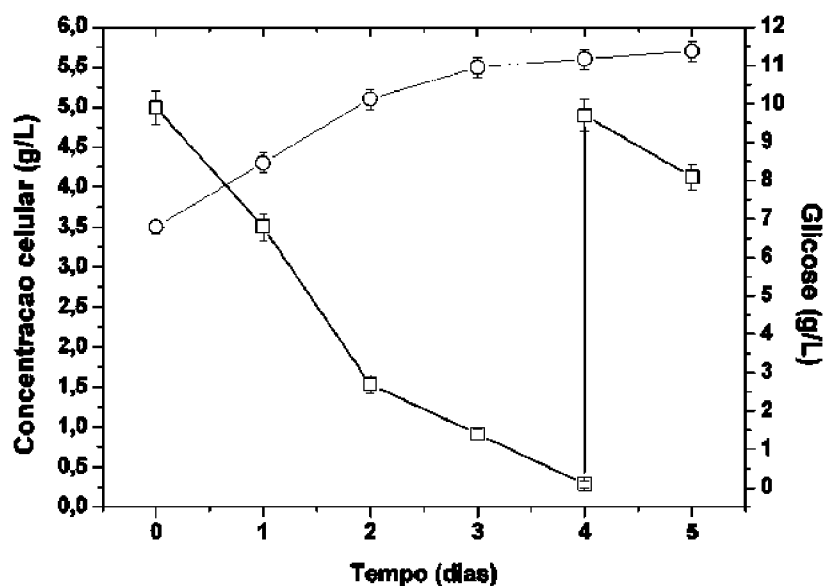


Figura 4.68 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reatores cônicos com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no terceiro dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L)

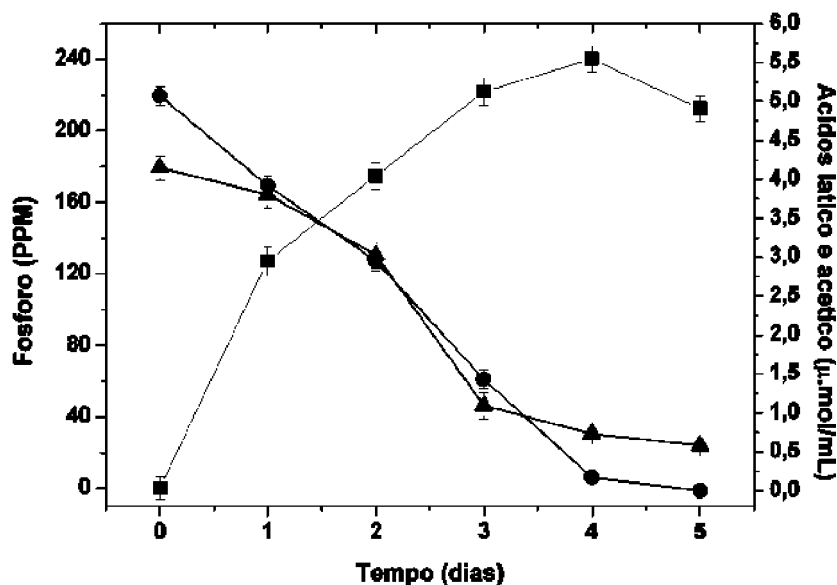


Figura 4.69 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reatores cônicos com adição extra de inóculo empregando meio reacional produzido em reator tipo air-lift no terceiro dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L)

Ao avaliar as Figuras 4.66 a 4.69 observa-se que ao adicionar concentrado de rocha fosfática e glicose a 5 g/L obtém-se 23,8% de solubilização total e 3,04 $\mu\text{mol/mL}$ (pH 5,46) no terceiro dia em reatores cônicos de bancada empregando meio ácido produzido no terceiro dia de operação do reator air-lift. Ao adicionar glicose a 10 g/L estes valores aumentam respectivamente para 28,5% e 3,33 $\mu\text{mol/mL}$ (pH 5,27), também para o terceiro dia em reatores cônicos de bancada. Os resultados apresentados para o meio retirado do air-lift no primeiro dia foram próximos aos obtidos para o terceiro dia e, portanto não foram apresentados.

Ao empregar meio ácido produzido no segundo dia de operação do reator air-lift e terceiro dia no reator cônico de bancada, adicionando glicose e concentrado de rocha fosfática a 10 e 5 g/L, respectivamente a biossolubilização de fósforo apresentou-se superior aos resultados obtido nos experimentos em que foram retiradas amostras no primeiro e terceiro dia do reator air-lift.

Os ácidos orgânicos quantificados em meio reativo ao longo deste trabalho foram os ácidos láctico e acético, provavelmente ácidos característicos do *Trichoderma harzianum*, sendo que inúmeros outros ácidos foram encontrados e relacionados ao processo de biossolubilização de fósforo. ácido cítrico, ácido láctico, ácido glucônico, ácido succínico, ácido propiônico e três ácidos desconhecidos, quantificados em HPLC por Chen *et al.* (2006) ao estudar 33 isolados. *Arthrobacter sp.* (CC-BC03) e *S. marcescens* (CC-BC12, CC-BC14 e CCBC16) sintetizaram ácidos orgânicos acompanhados por uma queda máxima no pH (4,9) e por maiores níveis de solubilização de P. Além disso, todos os cinco isolados de *S. marcescens* (CCBC12-CC-BC16) sintetizaram ácido cítrico em combinação com outros ácidos, resultando em uma queda máxima no pH e níveis mais elevados de fósforo solúvel no meio de cultura. Entre os 33 isolados, o ácido propiônico foi produzido somente pelo *B. megaterium* (CC-BC26 para CCBC30).

Comparando os resultados obtidos no processo P1 (solubilização total: 40,47 %) e P3 (solubilização total: 34,88 %), observa-se que o processo de concentração de ácidos orgânicos em reator air-lift apresentou uma queda de solubilização de 5,59 % , acompanhada pela queda de 13,85 % na concentração de fósforo solúvel (315,5 ppm e 271,8 ppm).

No processo P3 houve maior concentração de fósforo insolúvel ao final do processo e o tempo do processo P1 foi de 4 dias (biossolubilização de fósforo em air-lift) e no processo P3 (biossolubilização de fósforo em air-lift conjugada com biossolubilização em reatores cônicos de bancada) foi de 5 dias (2 dias de concentração de ácidos orgânicos em reator air-lift e 3 dias de biossolubilização de fósforo em reatores cônicos de bancada). Portanto o

processo P1 mostrou-se mais eficiente quando comparado ao processo com a produção de ácido em separado empregando reator air lift.

Entretanto apesar de inferiores, os resultados mostraram que é possível solubilizar o fósforo empregando o meio ácido produzido previamente. Estes resultados são importantes do ponto de vista prático porque a presença de microrganismos no processo dificulta o funcionamento do reator em termos de transferência de massa, contaminação e utilização de condições mais agressivas tais como: temperatura, pH e outras.

4.6 Reatores do tipo tambor rotativo

4.6.1 Influência da relação massa de biomassa/volume de meio sintético líquido no processo de biossolubilização de fósforo em reatores do tipo tambor rotativo

Inicialmente, ao estudar a biossolubilização de fósforo em reator do tipo tambor rotativo, avaliou-se a influência da relação massa de biomassa (bagaço de cana de açúcar)/volume de meio reacional líquido, adotando as condições otimizadas anteriormente em reator air-lift e reatores cônicos de bancada. O primeiro teste realizado empregou-se 39,53 g de bagaço de cana de açúcar e 100 mL de meio reacional líquido contendo 10 g/L de glicose e 5 g/L de concentrado fosfático. Os resultados em concentração celular, consumo de glicose, concentração de fósforo e ácidos orgânicos são apresentados nas Figuras 4.70 – 4.75.

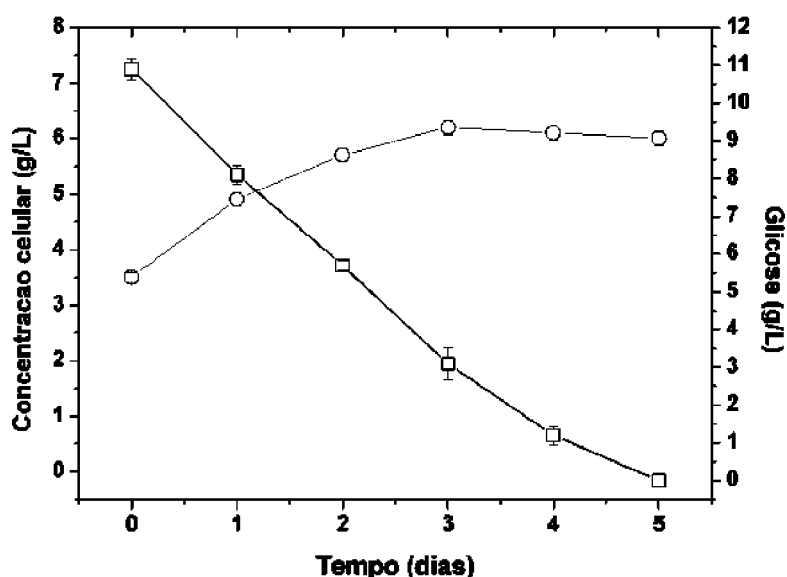


Figura 4.70 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator do rotativo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa: 39,53 g; volume de meio líquido: 100 mL; rotação: 1RPM)

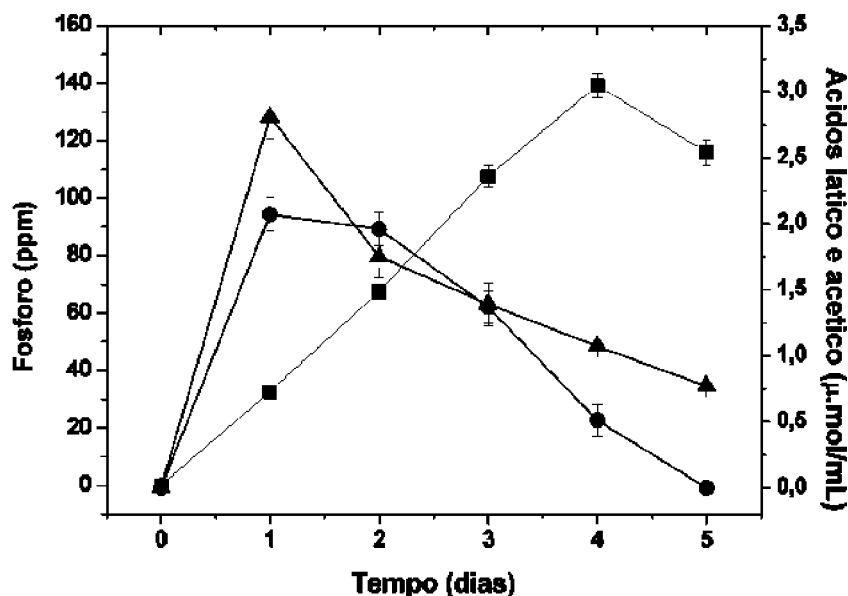


Figura 4.71 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em tambor rotativo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa: 39,53 g; volume de meio líquido: 100 mL; rotação: 1RPM)

Ao observar as Figuras 4.70 e 4.71 nota-se que no quarto dia de operação do reator tipo tambor rotativo o consumo de glicose foi de 88,99% seguido pelo crescimento celular de 74,28%. Neste período a concentração máxima de fósforo solúvel foi igual a 139,25 ppm (17,87% de solubilização) ao produzir 1,58 $\mu\text{mol/mL}$ de ácido total (pH 4,09), sendo 1,07 $\mu\text{mol/mL}$ de ácido acético e 0,51 $\mu\text{mol/mL}$ de ácido láctico. No terceiro dia a quantidade de ácido total foi de 2,76 $\mu\text{mol/mL}$.

Mantendo-se o volume de meio reacional líquido igual a 100 mL diminuiu-se a biomassa de bagaço de cana de açúcar empregada para 28,62 g. Os resultados são apresentados nas Figuras 4.72 e 4.73.

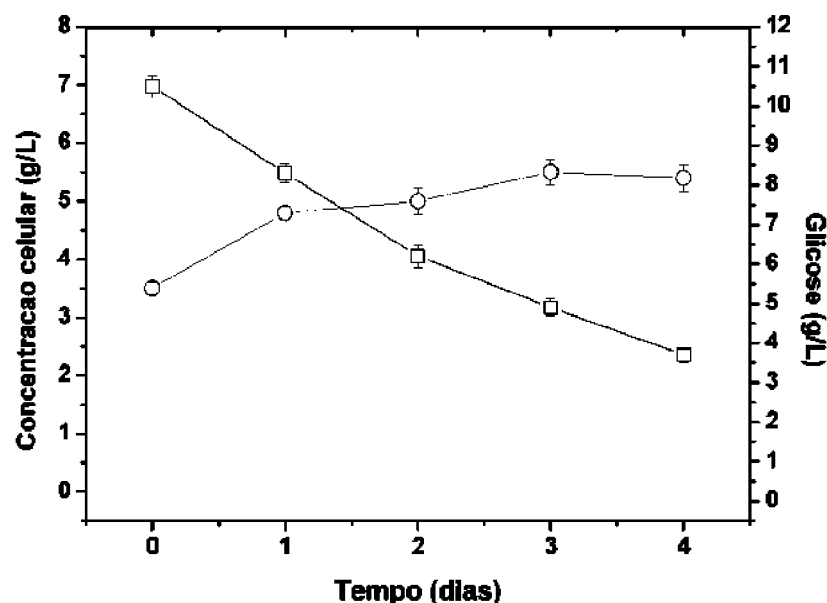


Figura 4.72 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator do rotativo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa: 28,52 g; volume de meio líquido: 100 mL; rotação: 1RPM)

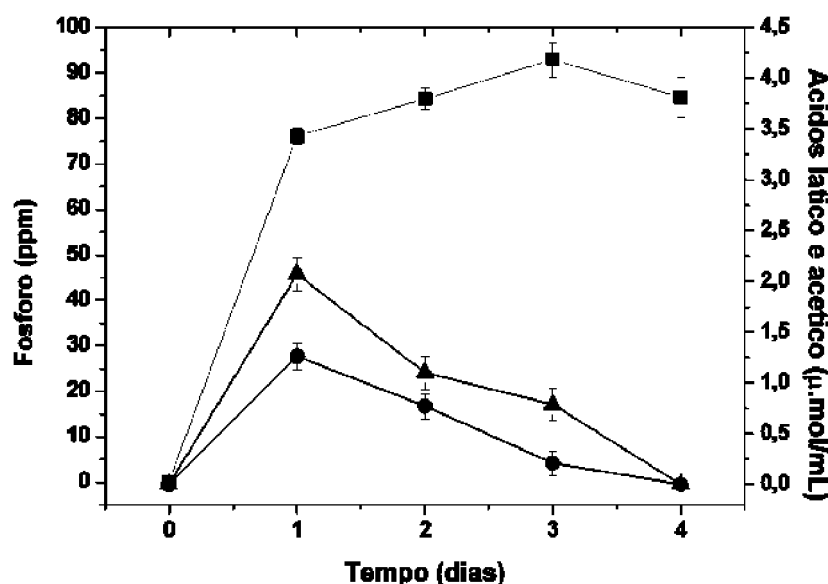


Figura 4.73 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em tambor rotativo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa: 28,52 g; volume de meio líquido: 100 mL; rotação: 1RPM)

Com a diminuição da biomassa de bagaço de cana de açúcar no sistema ocorreu uma redução no consumo de glicose, na concentração celular e na produção de ácidos. Observou-

se o consumo de 64,76% de glicose (no quarto dia o consumido de glicose foi de 81,90%), crescimento celular de 65,71% (no quarto dia não houve crescimento celular) e concentração de ácidos orgânicos de 1,87 $\mu\text{mol/mL}$ (pH 4,17) no terceiro dia, e uma queda na concentração de fósforo solúvel em meio, atingindo a concentração de 92,91 ppm (11,94% de solubilização) no terceiro dia (Figura 4.72 e 4.73).

Ao observar a queda na concentração de fósforo assimilável diante da diminuição da biomassa bagaço de cana no sistema, a massa de 39,53 g de bagaço de cana de açúcar foi testada novamente com 80 mL de meio sintético líquido, como mostrado nas Figuras 4.78 e 4.79. A menor quantidade de bagaço de cana de açúcar no reator favoreceu o tombamento da biomassa, o que pode ter influenciado na quebra das hifas do fungo e consequentemente no seu concentração celular, consumo de glicose, produção de ácidos e na solubilização do fósforo.

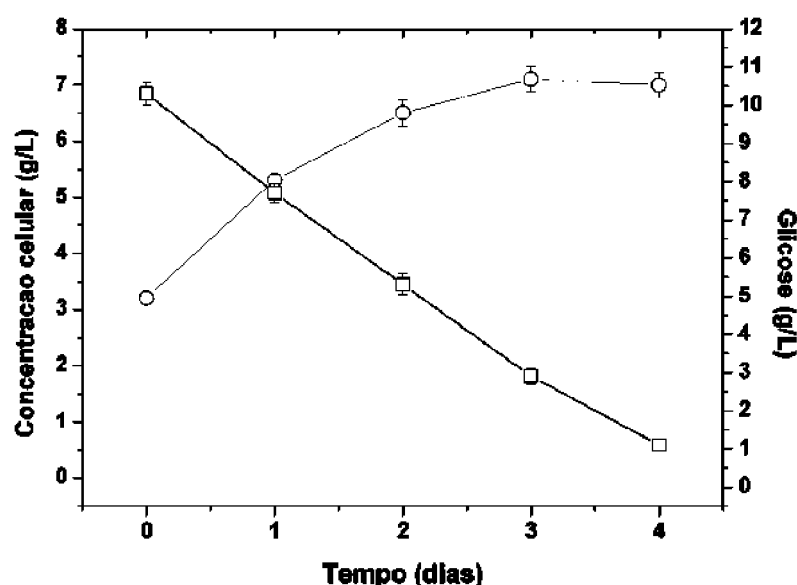


Figura 4.74 – Concentração celular ($\circ$) e consumo de glicose ($\square$) em reator do rotativo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa: 39,53 g; volume de meio líquido: 80 mL; rotação: 1 RPM)

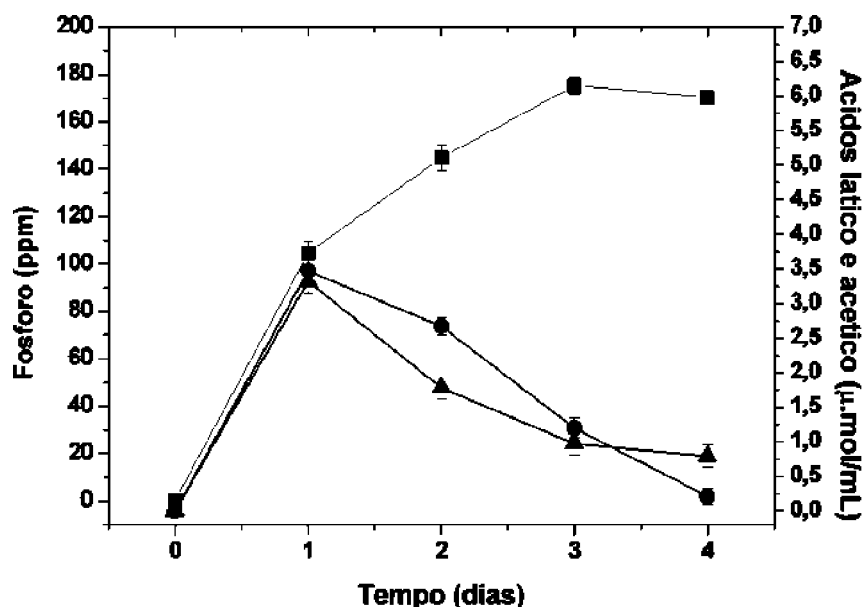


Figura 4.75 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em tambor rotativo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa: 39,53 g; volume de meio líquido: 80 mL; rotação: 1 RPM)

Ao avaliar as Figuras 4.74 e 4.75 verifica-se que a máxima solubilização ocorreu no terceiro dia de processo, atingindo 22,5% de disponibilização de fósforo total em meio reacional, acompanhada pela concentração total de ácidos orgânicos de $4,45 \mu\text{mol/mL}$ (pH 4,92). Neste período a glicose foi consumida em 71,84%, acompanhado por um crescimento celular igual a 121,8 %. Estes resultados indicam a possível influência da umidade do meio no processo de biossolubilização, sugerindo que a diminuição da umidade tem efeito positivo no metabolismo do microrganismo. Seguindo este raciocínio diminui-se ainda mais o volume de meio reacional líquido (50 mL), em que os resultados são apresentados nas Figuras 4.76 e 4.77.

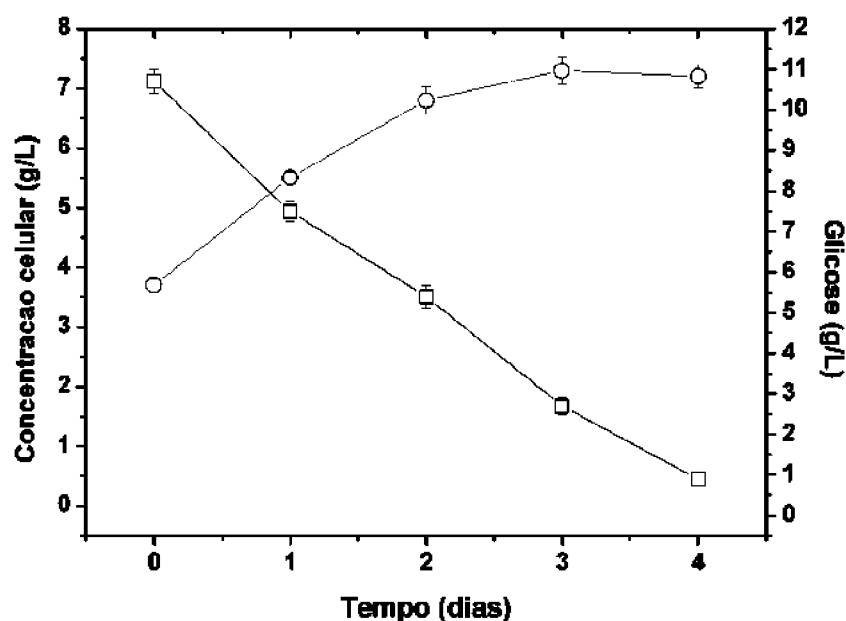


Figura 4.76 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator do rotativo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa: 39,53 g; volume de meio líquido: 50 mL; rotação: 1 RPM)

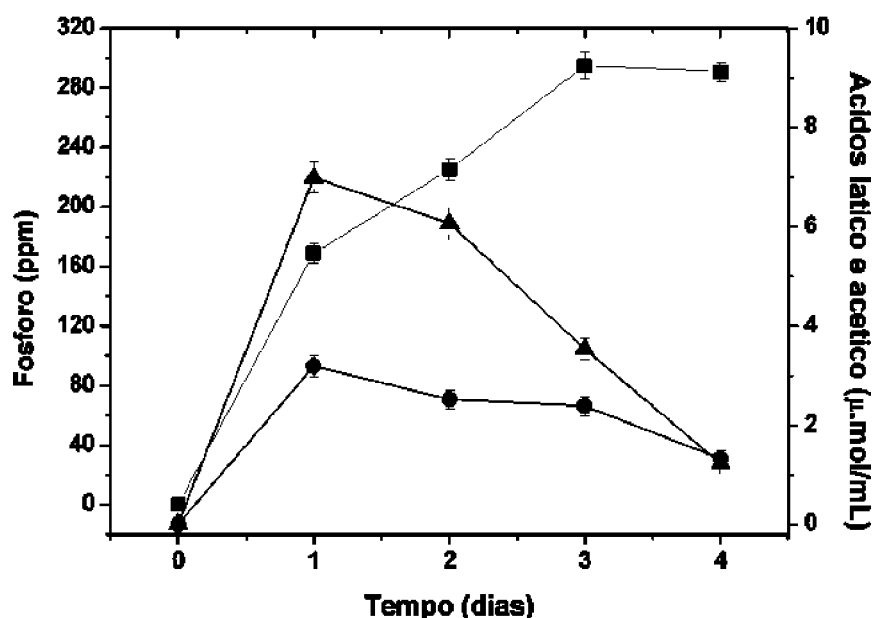


Figura 4.77 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em tambor rotativo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L, concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa: 39,53 g; volume de meio líquido: 50 mL; rotação: 1 RPM)

Ao observar as Figuras 4.76 e 4.77 notas-se que o emprego de 50 mL de meio reacional líquido em 39,53 g de bagaço de cana de açúcar favoreceu o processo de solubilização, alcançando no terceiro dia de processo a concentração de 294,81 ppm de fósforo assimilável (37,83% de solubilização). Este aumento também foi acompanhado pelo aumento na concentração total de ácidos orgânicos, produzindo neste período 8,59 $\mu\text{mol/mL}$ (pH 5,53), seguido pelo consumo de 74,77% de glicose e 97,29% de crescimento celular. Assim, foi reduzido ainda mais a umidade do meio fermentativo com a adição de 20 mL de meio líquido em 39,53 g de bagaço de cana de açúcar conforme mostra as figuras 4.78 e 4.79.

Ao diminuir a umidade do meio reacional em reator rotativo através da diminuição do volume de meio líquido (20 mL), os resultados obtidos (Figuras 4.78 e 4.79) indicam maior solubilização de fósforo no terceiro dia de processo (15,37%), acompanhada pela concentração de ácidos orgânicos igual a 3,74 $\mu\text{mol/mL}$ (pH 4,57), crescimento celular igual a 80,56% e consumo de glicose de 68,57%. Observa-se assim o quanto a umidade é uma variável importante no processo de biossolubilização de fósforo proveniente de concentrado de rocha fosfática concentração celular e concentração de ácidos orgânicos em fermentação sólida.

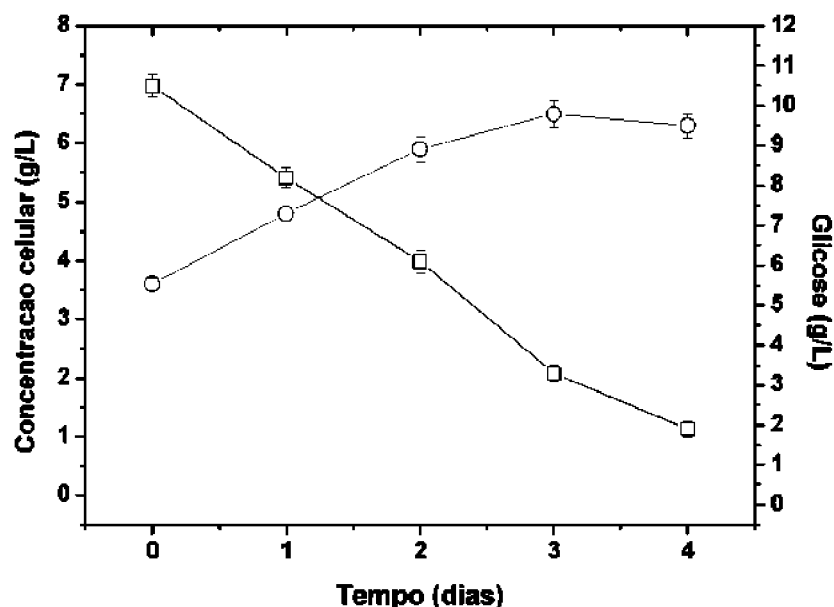


Figura 4.78 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator do rotativo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L; concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa: 39,53 g; volume de meio líquido: 20 mL; rotação: 1 RPM)

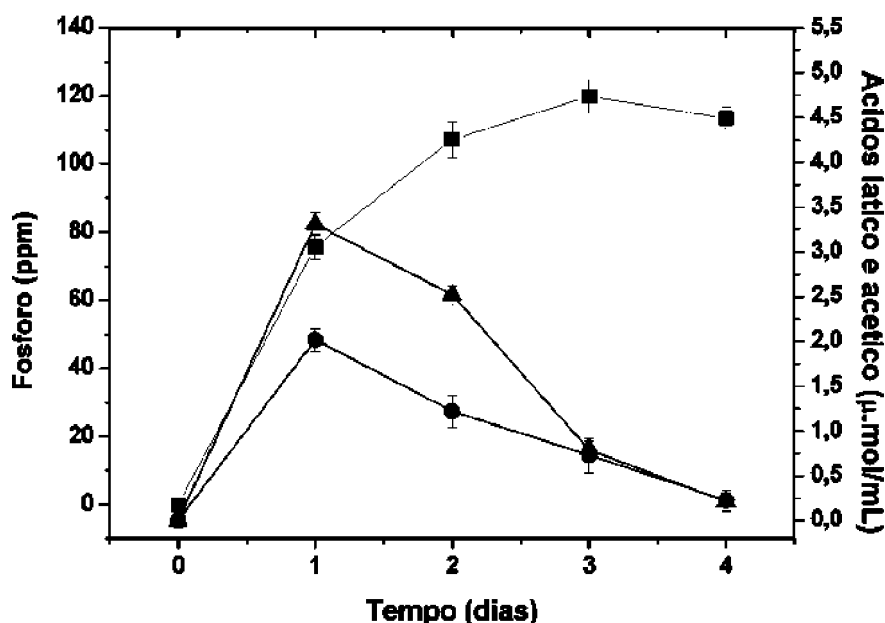


Figura 4.79 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em tambor rotativo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L; concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa: 39,53 g; volume de meio líquido: 20 mL; rotação: 1 RPM)

Ao avaliar todas as relações massa de biomassa/volume de meio reacional líquido estudadas a que apresentou resultados superiores de solubilização foi a relação de 39,53 g de biomassa/50 mL de meio reacional líquido.

4.6.2 Influência do nível aeração úmida no processo de biossolubilização de fósforo em reatores rotativos

As Figuras de 4.80 a 4.85 apresentam os resultados da influência do nível de aeração úmida no processo de biossolubilização de fósforo em reator rotativo, empregando a relação de 39,53 g de biomassa e 50 mL de meio reacional líquido com concentrado de rocha fosfática a 5 g/L e glicose a 10 g/L. Nestas figuras foram utilizadas as vazões volumétricas de ar comprimido úmido por minuto iguais a 2,88 VVM (0,7 m/s); 8,06 VVM (1,4 m/s) e 11,52 VVM (2,0 m/s), respectivamente.

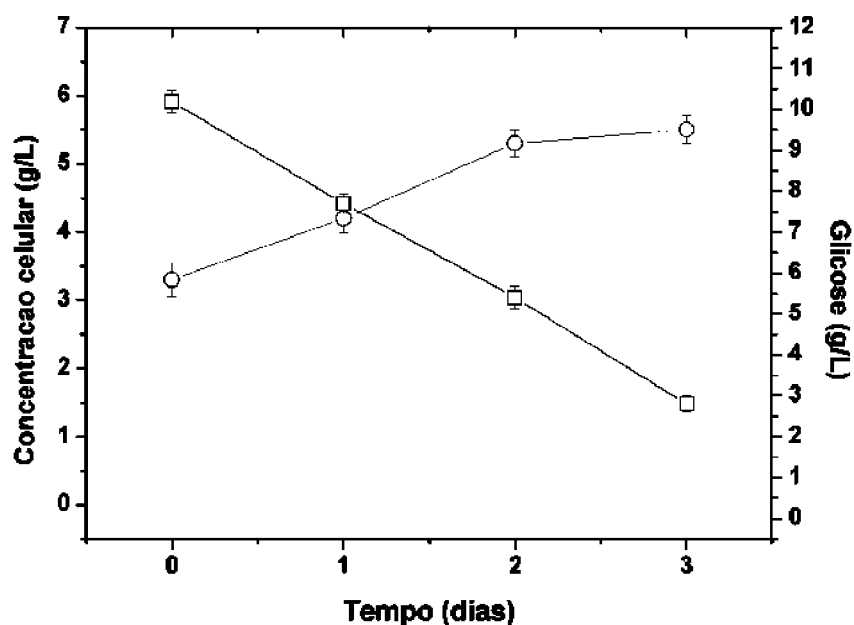


Figura 4.80 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator do rotativo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L; concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; Massa de biomassa: 39,53 g; volume de meio líquido: 50 mL; rotação: 1 RPM; aeração úmida: 2,88 VVM)

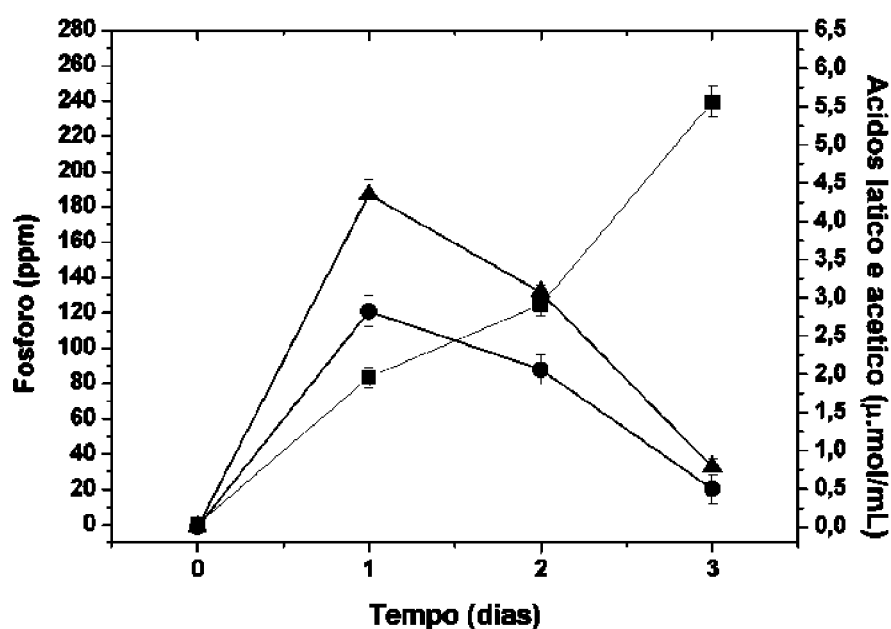


Figura 4.81 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator do rotativo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L; concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa: 39,53 g; volume de meio líquido: 50 mL; rotação: 1 RPM; aeração úmida: 2,88 VVM)

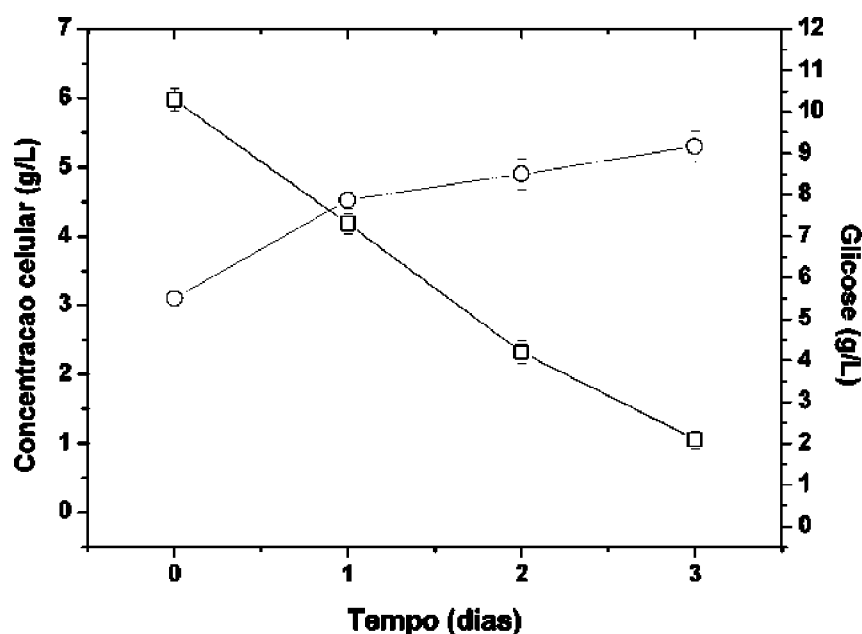


Figura 4.82 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator do rotativo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L; concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa: 39,53 g; volume de meio líquido: 50 mL; rotação: 1 RPM; aeração úmida: 8,06 VVM)

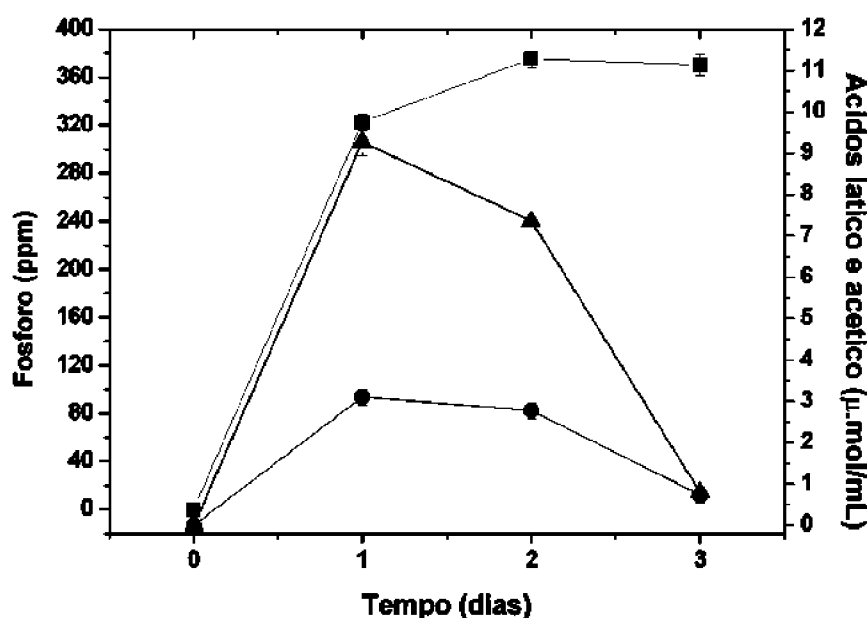


Figura 4.83 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ●, ácido acético: ▲) em reator do rotativo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L; concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa: 39,53 g; volume de meio líquido: 50 mL; rotação: 1 RPM; aeração úmida: 8,06 VVM)

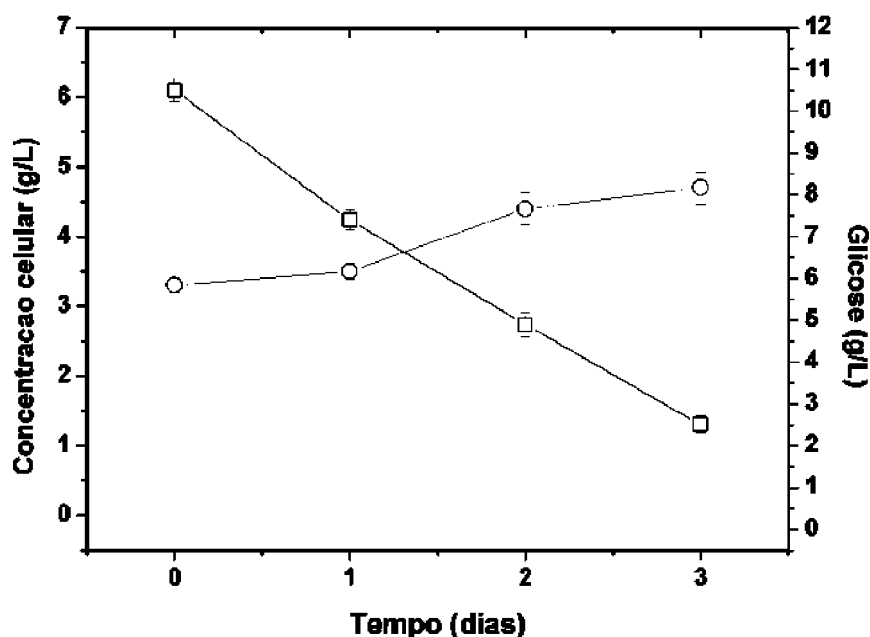


Figura 4.84 – Concentração celular (○) e consumo de glicose (□) em reator do rotativo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L; concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa: 39,53 g; volume de meio líquido: 50 mL; rotação: 1 RPM; aeração úmida: 11,52 VVM)

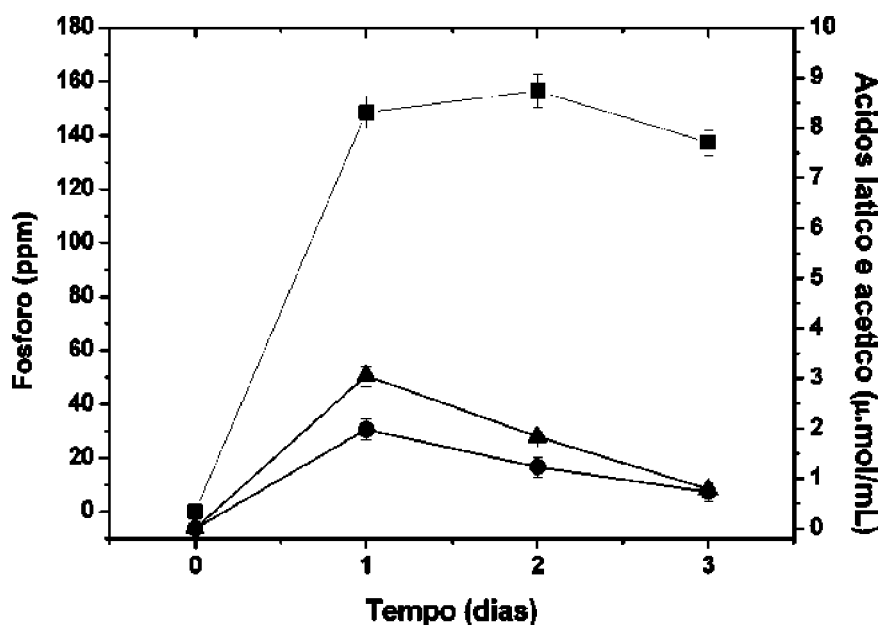


Figura 4.85 – Concentração de fósforo (■) e ácidos orgânicos (ácido láctico: ● ácido acético: ▲) em reator do rotativo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ (Concentração de glicose: 10 g/L, concentração celular inicial: $3,2 \pm 0,5$ g/L; concentrado de rocha fosfática: 5 g/L; massa de biomassa: 39,53 g; volume de meio líquido: 50 mL; rotação: 1 RPM; aeração úmida: 11,52 VVM)

Ao avaliar as Figuras de 4.80 a 4.85 observa-se que para as vazões volumétricas de ar comprimido úmido por minuto iguais a 2,88; 8,064 e 11,52 VVM obteve-se máxima solubilização de fósforo em reator rotativo iguais a 30,7%, 48,16%, e 20,1%, respectivamente, sendo que com a vazão volumétrica de ar de 2,88 VVM a maior solubilização do fósforo ocorreu no terceiro dia e para as outras vazões foi no segundo dia. Portanto os valores mencionados a seguir para estes experimentos foram para o terceiro dia para a vazão volumétrica de ar de 2,88 VVM e para o segundo dia para os ensaios com vazões de 11,52 VVM. O crescimento celular e concentração de ácidos orgânicos foram respectivamente, 60,60% e 5,13 $\mu\text{mol/mL}$ (pH 5,08); 58,06% e 12,37 $\mu\text{mol/mL}$ (pH 5,23); 33,33% e 5,03 $\mu\text{mol/mL}$ (pH 5,02). Isso indica que a concentração de ácidos orgânicos e a disponibilização de fósforo foram superiores para a vazão volumétrica de ar comprimido úmido por minuto igual a 8,06 VVM. Ao trabalhar com diferentes vazões volumétricas de ar comprimido úmido no processo de biossolubilização em reatores rotativos calculou-se a umidade de acordo com o item 3.6.2 mantendo a umidade em $14,58 \% \pm 0,3$ (8,06 VVM), $14,73\% \pm 0,6$ (11,52 VVM) e $14,92\% \pm 0,4$ (2,88 VVM).

Ao avaliar o processo de biossolubilização de fósforo proveniente de concentrado de rocha fosfática em reator do tipo rotativo obtiveram-se os seguintes resultados em solubilização de fósforo para o terceiro dia de operação: 15,37 % (Massa de biomassa: 39,53 g; Volume de meio líquido: 20 mL), 37,87 % (Massa de biomassa: 39,53 g; Volume de meio líquido: 50 mL); 22,50% (Massa de biomassa: 39,53 g; Volume de meio líquido: 80 mL); 17,87 % (Massa de biomassa: 39,53 g; Volume de meio líquido: 100 mL) e 11,94% (Massa de biomassa: 28,52 g; Volume de meio líquido: 100 mL).

Ao empregar esta relação de massa de biomassa/volume de meio líquido igual a 39,53g / 100 mL e aeração úmida com vazão volumétrica de ar igual a 8,06 VVM obteve-se no segundo dia de processo a solubilização de 48,16 % de fósforo. Indicando assim que a umidade apresentou influência positiva no processo de biossolubilização de fósforo em reator rotativo.

Compararam-se então dois processos de biossolubilização de fósforo: segundo dia de processo de operação em reator rotativo empregando a relação massa de biomassa/volume de meio líquido igual a 39,53g / 100 mL e aeração úmida com vazão volumétrica de ar comprimido por minuto igual a 8,06 VVM (48,16% de solubilização; 375,32 ppm de fósforo solúvel; 10,13 $\mu\text{mol/mL}$ de ácidos orgânicos; 58,06% de crescimento celular) com a melhor condição encontrada ao operar o reator air-lift no quarto dia de processo (P1) (40,47 % de solubilização; 315,15 ppm de fósforo solúvel; 9,72 $\mu\text{mol/mL}$ de ácidos orgânicos; 67,56%

de crescimento celular) processo de biossolubilização apenas em reator air-lift (concentrado de rocha fosfática: 5 g/L e glicose: 10g/L).

Ao avaliar os resultados observa-se que a maior solubilização de fósforo encontrada foi de 48,16 % (375,32 ppm de fósforo solúvel) ao operar o reator rotativo no segundo dia, acompanhada ainda pela maior concentração de ácidos orgânicos. A máxima solubilização alcançada em um menor tempo de processo (segundo dia) juntamente com o uso de bagaço de cana de açúcar como biomassa destacam os resultados alcançados no processo de biossolubilização em reator rotativo por *Trichoderma harzianum*.

A consolidação dos resultados realizados em reatores do tipo air-lift, cônicos de bancada e do tipo tambor rotativo são apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Consolidação dos resultados obtidos neste trabalho empregando diferentes configurações de biorreatores

Configuração do reator	Condições operacionais	Composição do meio fermentativo	Tempo total de processo	Biossolubilização de fósforo total	Concentração total de ácidos orgânicos
Air-lift	- Aeração: 0,5 VVM - Temperatura: $28 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	- Glicose: 5 g/L - Concentrado de rocha fosfática: 5g/L	5 dias	27,23 %	1,25 $\mu\text{mol/mL}$
	- Aeração: 0,5 VVM - Reciclo do meio reativo: 200 mL/min - Temperatura: $28 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	- Glicose: 10 g/L - Concentrado de rocha fosfática: 5 g/L	4 dias	40,47 %	9,72 $\mu\text{mol/mL}$
Cônicos de bancada	- Glicose: 5g/L - Sem adição extra de concentrado de rocha fosfática - Temperatura: $28 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ - Rotação: 100 RPM	Meio reacional produzido no quarto dia de operação do reator air-lift contendo concentrado de rocha fosfática e glicose a 5 g/L	7 dias	43,43 %	4,69 $\mu\text{mol/mL}$
	- Glicose: 5g/L - Concentrado de rocha fosfática: 10g/L - Temperatura: $28 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ - Rotação: 100 RPM	Meio reacional produzido no terceiro dia de operação do reator air-lift contendo concentrado de rocha fosfática e glicose a 5 g/L	6 dias	23,72 %	3,85 $\mu\text{mol/mL}$
	- Glicose: 10 g/L - Centrifugação e renovação do inóculo	Meio reacional produzido no segundo dia de operação do reator air-lift isento de	5 dias	23,78 %	6,88 $\mu\text{mol/mL}$

	- Temperatura: $28 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ - Rotação: 100 RPM	concentrado de rocha fosfática contendo glicose a 10 g/L			
	- Glicose: 10 g/L - Concentrado de rocha fosfática: 5 g/L - Temperatura: $28 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ - Rotação: 100 RPM	Meio reacional produzido no segundo dia de operação do reator air-lift isento de concentrado de rocha fosfática contendo glicose a 10 g/L	5 dias	34,88 %	4,12 $\mu\text{mol/mL}$
Rotativo	- Sem aeração úmida - Rotação: 1RPM - Temperatura: $28 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	- Glicose: 10g/L - Concentrado de rocha fosfática: 5g/L - Massa de bagaço de cana de açúcar: 39,53 g Volume de meio reacional líquido: 50 mL	3 dias	37,87 %	8,59 $\mu\text{mol/mL}$
	- Vazão volumétrica de ar úmido por minuto: 8,06 VVM - Umidade: 14,58 % $\pm 0,3$ - Rotação: 1RPM - Temperatura: $28 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	- Glicose: 10g/L - Concentrado de rocha fosfática: 5g/L - Massa de bagaço de cana de açúcar: 39,53 g Volume de meio reacional líquido: 50 mL	2 dias	48,16%	12,37 $\mu\text{mol/mL}$

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

- A partir da avaliação preliminar da capacidade de biossolubilização foram selecionados entre as 16 amostras de microrganismos 4 isolados fúngicos, coletadas na Vale Fertilizantes, em Araxá. Ao final de testes que avaliaram a influência da concentração de inóculo, glicose e concentrado de rocha fosfática no processo de solubilização de fósforo, um isolado se destacou. Este foi identificado como *Trichoderma harzianum* e empregado nos testes subsequentes;
- A biossolubilização de fósforo por *Trichoderma harzianum* em reator air-lift apenas com aeração ascendente (0,5 VVM) apresentou máximo de solubilização igual a 27,23%, no quinto dia de processo a $28 \pm 3^\circ\text{C}$, acompanhado pela produção de 0,5 $\mu\text{mol/mL}$ de ácido láctico e 0,73 $\mu\text{mol/mL}$ de ácido acético;
- Ao empregar reciclo do meio reacional a vazão de 200 mL/min em reator air-lift com aeração igual a 0,5 VVM a $28 \pm 3^\circ\text{C}$, obteve-se no quarto dia de processo 315,41 ppm (40,47% de solubilização) de fósforo solúvel e 9,72 $\mu\text{mol/mL}$ de ácidos orgânicos empregando inóculo com concentração inicial igual a 3,7 g/L, concentrado de rocha fosfática a 5 g/L e glicose a 10 g/L, realizando a reposição do substrato;
- O processo sequencial de solubilização de fósforo por *Trichoderma harzianum* em reatores cônicos de bancada solubilizou no terceiro dia de processo 43,43% do fósforo total ao adicionar inóculo com concentração inicial de 3,1 g/L e glicose de 5 g/L ao meio reacional produzido no quarto dia de operação do reator air-lift contendo concentrado de rocha fosfática;
- A sequência da solubilização de fósforo por *Trichoderma harzianum* empregando meio produzido em air-lift (concentrado de rocha fosfática: 5 g/L e glicose: 5 g/L) com retirada do meio no terceiro dia conjugado com biossolubilização em reatores cônicos de bancada (concentrado de rocha fosfática: 5 g/L e glicose: 10 g/L) no terceiro dia de processo implicou em 369,7 ppm de fósforo solúvel, solubilização total de 23,72%, concentração de ácidos orgânicos: 3,85 $\mu\text{mol/mL}$;
- Ao trocar o inóculo do meio produzido no segundo dia de operação do reator air-lift, através da centrifugação do meio original, atingiu-se a solubilização no terceiro dia de operação em reatores cônicos de bancada igual a 23,78% (crescimento celular igual a

- 36,37% e 6,88 $\mu\text{mol/mL}$ de ácidos orgânicos (pH 5,13)). Quando a troca e renovação das células não são realizadas a solubilização foi de 19,40% (crescimento celular igual a 147,06% e 7,38 $\mu\text{mol/mL}$ de ácidos orgânicos (pH 5,34)).
- Ao estudar o processo em série de concentração de ácidos orgânicos no segundo dia em reator air-lift seguido pelo processo de solubilização de fósforo em reatores cônicos de bancada por *Trichoderma harzianum*, 34,88 % do fósforo total foi disponibilizado no terceiro dia de processo ao empregar glicose e concentrado de rocha fosfática a 10 e 5 g/L, respectivamente;
 - Ao avaliar o processo de biossolubilização por *Trichoderma harzianum* de fósforo proveniente de concentrado de rocha fosfática em reator do tipo rotativo sem aeração úmida os seguintes resultados em solubilização de fósforo para o terceiro dia de operação a máxima solubilização foi de 37,87% (Massa de biomassa: 39,53 g; Volume de meio líquido: 50 mL);
 - Ao estudar a influência da aeração úmida no processo de biossolubilização em reatores rotativos por *Trichoderma harzianum* empregando 39,53 g de bagaço de cana de açúcar e 50 mL de meio reacional líquido (glicose a 10 g/L e concentrado de rocha fosfática a 5 g/L) a máxima solubilização igual a 48,16% foi encontrada empregando a vazão volumétrica de ar comprimido por minuto igual a 8,06 VVM, mantendo-se a umidade em $14,58 \% \pm 0,3$

CAPÍTULO 6

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudo da produção da enzima fosfatase pelo microrganismo *Trichoderma harzianum* no processo de biossolubilização de fósforo;
- Avaliação da temperatura no processo de biossolubilização de fósforo proveniente de concentrado de rocha fosfática em reator tipo tambor rotativo;
- Estudo da influência da rotação do tambor rotativo na biossolubilização de fósforo proveniente de concentrado de rocha fosfática;
- Avaliação do emprego de diferentes biomassas bem como da relação de suas massas com o volume de meio líquido em reator rotativo;
- Estudo detalhado deverá ser realizado com a presença de outros ácidos orgânicos produzidos por outros microrganismos (sem utilização de co-culturas no processo devido a problemas de inibição).
- Estudos de processos empregando a concentração dos ácidos produzidos, tal como a utilização de rotaevaporador para avaliação da solubilização do fósforo.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDLWARETH, A.A.; XIE, G.L.; TIAN, W.X.; XU, L.H.; ZHANG, G.Q.; MUHAMMAD, I. Characterization and evaluation of *Bacillus* isolates for their potencial plant growth and biocontrol activities against tomato bacterial wilt. *African Journal of Biotechnology*, v. 11, n. 28, p. 7193-7201, 2012.

ACEVEDO, E.; GALINDO-CASTAÑEDA, T.; PRADA, F.; NAVIA, M.; ROMERO, H. M. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with therhizosphere of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Colombia Applied Soil Ecology*. v. 80, p. 26–33, 2014.

ADESEMOYE, A.; KLOEPPER, J. Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 85, p. 1–12, 2009a.

ADESEMOYE, A.O.; TORBERT, H.A.; KLOEPPER, J.W. Plant growthpromoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial Ecology*. v. 58, p. 921-929, 2009b.

AGNIHOTRI, V. P. Solubilization of insoluble phosphates by some fungi isolated from nursery seedbeds. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 16, p. 877-880, 1970.

ALEXANDER, M. Introduccion a la Microbiología del suelo. México: AGT, p. 491, 1980.

ALVES, G. F. Solubilização do fosfato de rocha por *Aspergillus niger*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2012.

ALVES, L.; OLIVEIRA, V.L.; SILVA FILHO, G.N. Utilization of rocks and ectomycorrhizal fungi to promote growth of eucalypt. *Brazilian Journal os Microbiology*, v. 41, p. 676-684, 2010.

ANDRADE, G.; NOGUEIRA, M. A. Bioindicadores para uma análise de risco ambiental: organismos geneticamente modificados e grupos funcionais de microrganismo do solo. *Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento*, n. 34, p. 11-19, 2005.

ANTIBUS, R.K.; LESICA, P. Root surface acid phosphatase activities of vascular epiphytes of a Costa Rican rain forest. *Plant and Soil*, v. 128, n. 2, p. 233-240, 1990.

APHA – AWWA – WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. Washington, D. C.: Americam Public Health Association , 1998. – part 4000 Inorganic nonmetallic constituents, 4500-P Phosphorus.

AQUINO, A. M.; CORREIA, M. E. F. Invertebrados edáficos e o seu papel nos processos do solo. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 201). 52 p. 2005.

ARBIETO, E.A.M. Biodisponibilização de nutrientes de rochas por microorganismos do solo. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis - SC, 2005.

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, 2006.

ASHLEY, V.M.; MITCHELL, D.A.; HOWES, T. Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, v. 3, n. 2, p. 141–150, 1999.

ASTM E 871-82 (2006) Standard Test Method for Moisture Analysis of Particulate Wood Fuels.

Balanço Mineral Brasileiro - 2001 (Fosfato) Ano: 2001 por DNPM última modificação em 18/02/2015 20h30
https://sistemas.dnpm.gov.br/publicacao/mostra_imagem.asp?IDBancoArquivoArquivo=4003
Acesso em 24/04/2016

BAREA, J.M.; POZO, M.J.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, v. 56, p. 1761–1778, 2005.

BARROSO, C.B.; PEREIRA, G.T.; NAHAS, E. Solubilization of CaHPO_4 and AlPO_4 by *Aspergillus niger* in culture media with different carbon and nitrogen sources. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 37, p. 434–438, 2006.

BARROTI, G.; NAHAS, E. População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.35, n.10, p.2043-2050, 2000.

BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J.; SANGOI, L. Changes in soil organic matter fractions under subtropical no-till cropping systems. *Soil Science Society of America Journal*, v. 65, p. 1473–1478, 2001

BEHERA B.C.; SINGDEVSACHAN S.K.; MISHRA R.R.; DUTTA S.K.; THATOI H.N. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising Microorganism in mangrove - A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 3, p. 97–110, 2014.

BESFORD, R.T. Phosphorus nutrition and acid phosphatase activity in the leaves of seven plant species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.30, n.3, p. 281-285, 1979.

BIANCO, C.; DEFEZ, R. Improvement of phosphate solubilization and medicago plant yield by na indole-3-acetic acid-overproducing strain of *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 14, p. 4626–4632, 2010.

BOJINOVA, D.; VELKOVA, R.; GRANCHAROV, I.; ZHELEV, S. The bioconversion of Tunisian phosphorite using *Aspergillus niger*. *Nutrient Cycling Agroecosystems*, v. 47, p. 227–232, 1997.

BOLAN, N.S.; NAIDU, R.; MAHIMAIRAJA, S.; BASKARAN, S. Influence of low molecular-weight organic acids on the solubilization of phosphates. *Biology and Fertility of Soils*. v. 18, p. 311-319, 1994.

- BOLAN, N.S.; NAIDU, R.; MAHIMAIRAJA, S.; BASKARAN, S. Influence of low molecular-weight organic acids on the solubilization of phosphates. *Biology and Fertility of Soils*. v. 18, p. 311-319, 1994.
- BRANCO, S.M.; MURGEL, P. H.; CAVINATTO, V. M. Compostagem: solubilização biológica de rocha fosfática na produção de fertilizante organomineral. *Engenharia sanitária e ambiental*, v. 6, n. 3, 2001.
- CARNEIRO, R.G.; MENDES, I.C.; LOVATO, P.E.; CARVALHO, A.M.; VIVALDI, L.J. Indicadores biológicos associados ao ciclo do fósforo em solos de cerrado sob plantio direto e plantio convencional. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.39, n.7, p.661-669, 2004.
- CERETI, C.F.; ROSSINI, F.; FEDERICI, F.; QUARANTINO, D.; VASSILEV, N.; FENICE, M. Reuse of microbially treated olive mill wastewater as fertilizer for wheat (*Triticum durum* Desf.). *Bioresour Technol* 91, 135–140, 2004.
- CERRI, M. O. Avaliação de transferência de calor e massa de um biorreator airlift de circulação interna de bancada para a produção de ácido clavulânico. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos–SP, 2005.
- CERRI, M.O.; FUTIWAKI, L.; JESUS, C.D.F.; CRUZ, A.J.G.; BADINO, A.C. Average shear rate for non-Newtonian fluids in a concentric-tube airlift bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 39, p. 51-57, 2008.
- CHABOT, R.; BEAUCHAMP C. J.; KLOEPPER, J. W.; ANTOUN H. Effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 30, n. 12, p. 1615-1618, 1998.
- CHABOT, R.; ANTOUN, H.; CESCAS, M.P. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Plant and Soil*, v. 184, p. 311-321, 1996.
- CHAVES, A. P. Rotas tecnológicas convencionais e alternativas para obtenção de fertilizantes. In: *Congresso Brasileiro de Rochagem*, 1., 2010, Brasília. *Anais do I Congresso de Rochagem*. EMBRAPA CERRADOS, p.313-321, 2010.
- CHAVES, A. P.; OBA, C. A. I. Crítica ao modelo brasileiro de fertilizantes de alta solubilidade. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 11p., 2004. (Coletânea fertilizantes, VI).
- CHEN, Y. P.; REKHA, P.D.; ARUN, A.B.; SHEN, F.T.; LAI, W.A.; YOUNG, C.C. Phosphate solubilizing bacteria form subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*. v. 34, p. 33-41, 2006.
- CHISTI, M. Y.; MOO-YOUNG, M. Airlift reactors: characteristics, applications and design considerations. *Chemical Engineering Communications*. v. 60, p. 195-242, 1987.
- CHISTI, M.Y. *Air-Lift Bioreactors*, Elsevier, New York, 1989.

- CHUANG, C.C.; KUO, Y.L.; CHAO, C.C.; CHAO, W.L. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biology and Fertility of Soils*, v. 43, p. 575–584, 2007.
- CLARHOLM, M. Microbial biomass P, labile P, and acid phosphatase activity in the húmus layer of a spruce forest, after repeated additions of fertilizers. *Biology and Fertility of Soils*, v. 16, n. 4, p. 287-292, 1993.
- CLARK, F.E.; PAUL, E.A. *Soil Microbiology and Biochemistry*. San Diego: Academic Press, p. 275, 1988.
- COLA, G. P. A.; SIMÃO, J.B.P. Rochagem como forma alternativa de suplementação de Potássio na agricultura agroecológica. *Revista Verde*, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2012.
- CONTE, E. Atividade de fosfatase ácida e formas de acumulação de fosfato em solo no sistema plantio direto. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS, 2001.
- CUNNINGHAM, J.E.; KUIACK, C. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilajii*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, p. 1451-1458, 1992.
- D'SOUZA, J.; RODRIGUES, B.F. Seasonal diversity of Arbuscular Mycorrhizal (AM) fungi in Mangroves of Goa, India. *International Journal of Biodiversity*, v. 2013, p. 1–7, 2013.
- DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 113–125, 2003.
- EIRA, A. Solubilização microbiana de fosfatos. In: CARDOSO, J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (Eds.). *Microbiologia do solo*. Campinas, São Paulo: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p. 243-255, 1992.
- FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N.P.; SANTOS, C. E. R. S. *Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura*. 1ª ed. Recife: Guaíba Agrolivros, p. 568, 2008.
- FOX, P.; SUIDAN, M.T.; BANDY, J.T. A comparison of media types in acetate fed expanded-bed anaerobic reactors. *Water Research*, v. 24, 827 p. 1990a.
- FOX, P.; SUIDAN, M.T.; PFEFFER, J.T.; BANDY, J.T. Hybrid expanded-bed reactor for treating inhibitory wastewaters. *Journal of Environmental Engineering, ASCE*, v. 3, 438p., 1990a.
- FREITAS, J.R. Atividade da enzima fosfatase ácida em folhas e raízes de feijoeiro *Phaseolus vulgaris*. Goiânia: Embrapa Arroz e Feijão, p. 26, 1995 (Relatório interno).
- FURIA, T.E. Regulatory status of direct food additives. *Handbook of Food Additives*. CRC Press. Pp. 903-966, 1972.

FURLANI, A. M. C. Nutrição mineral. In: KERBAUY, G. B. Fisiologia vegetal. 1ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 452p., 2004.

GADD, G.M. Fungal production of citric and oxalic acid: Importance in metal speciation, physiology and biochemical processes. *Advances in Microbial Physiology*. v. 41, p. 47–92, 1999.

GALLEGUILLLOS, C.; AGUIRRE, C.; BAREA, J.M; AZCÓN, R. Growth promotion effect of two *Sinorhizobium meliloti* strains (a wild type and its genetically modified derivative) on a non-legume plant species in specific interaction with arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Science*, v. 159, p. 57-63, 2000.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Microbial diversity in soil: selection microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, v. 42, p. 243-270, 2004.

GAUR, A.C.; MADAN, M.; OSTWAL, K.P. Solubilization of phosphatic compounds by native microflora of rock phosphates. *Indian Journal of Experimental Biology*. v. 2, p. 427-429, 1973.

GAUR, A.C.; SACHAR, S. Effect of rock phosphate on phosphate solubilization by *A.awamori*. *Current Science*, v. 49, p. 553–554, 1980.

GIRI, B.; MUKERJI, K. Mycorrhizal inoculant alleviates salt stress in *Sesbania aegyptiaca* and *Sesbania grandiflora* under field conditions: evidence for reduced sodium and improved magnesium uptake. *Mycorrhiza*, v. 14, n. 5, p. 307-312, 2004.

GOEDERT, W.J. Management of the Cerrado soils of Brazil: a review. *Journal of Soil Science*, v.34, p.405-428, 1983.

GOLDSTEIN, A.H. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *American Journal Alternativa Agricola*, v. 1, n. 2, p. 51-57, 1986.

GOMES, N.C.; OLIVEIRA, V.L.; SILVA FILHO, G.N. Solubilization of natural phosphates by ectomycorrhizal fungi from *Eucalyptus* spp. In: The international symposium on management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry, Perth, Western Australia, 1992. Abstracts. Perth, The Australia Institute of Agricultural Science, p.58., 1992.

GONZALES-EGUIARTE, D.; BAREA, J. M. Fertilization biologica con fosfobacterias produtoras de fitohormonas en suelos deficientes en fósforo. Influencia de la acidicion de fósforo y materia organica. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, v. 17, p. 227-232, 1975.

GRANT, R.F.; ROBERTSON, J.A. Phosphorus uptake by root systems: mathematicalmodelling in ecosys. *Plant and Soil*, v. 188, p. 279-297, 1997.

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 37, p. 395–412, 2005.

- GUPTA, N.; DAS, S. Phosphate solubilizing fungi from mangroves of Bhitarka- nika, Orissa. *Hayati Journal of Biosciences*, v. 15, n. 2, p. 90–92, 2008.
- GYANESHWAR. P.; KUMAR, G.N.; PAREKH, L.J.; POOLE, P.S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*, v. 245, n.1, p.83-93, 2002.
- HARLEY, A.D.; GILKES, R.J. Factors influencing the release of plant nutrient elements from silicate rock powders: a geochemical overview. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, v. 56, p. 11-36, 2000.
- HAYAT, R.; ALI, A.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, v. 60, p. 579–598, 2010.
- HINSINGER, P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil*, v. 237, p. 173–195, 2001.
- HIRATA, C. A.; FILHO, G. A. Abordagem teórica das interações ambientais entre nutrição de plantas e microrganismos. *Revista Geografia*, v. 20, n. 3, p.191-216, 2011.
- ILLMER, P.; BARBATO, A.; SCHINNER, F. Solubilization of hardly soluble AlPO_4 with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 27, p. 265–270, 1995.
- ILLMER, P.; SCHINNER, F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 24, p. 389-395, 1992.
- JONES, D.; SMITH, B.F.L.; WILSON, M.J.; GOODMAN, B.A. Phosphate solubilizing fungi in a Scottish upland soil. *Mycological Research*, v. 95, n. 9, p. 1090-1093, 1991.
- JONES, D.L. Organic acid in the rhizosphere – a critical review. *Plant Soil*, v. 205, p. 25-44, 1998.
- KANIMOZHI, K.; PANNEERSELVAM, A. Investigation of soil characters and *Azospirillum* isolated from paddy soils of Thanjavur district, East coast of Tamilnadu, India. *Arch. Applied Sci. Res.*, v.3: p.525-536, 2011.
- KATZNELSON, H.; PETERSON, E.A.; ROUATT, J.W. Phosphate-dissolving microorganisms on seed and in the root zone of plants. *Canadian Journal of Botany*, Canadá, v. 40, n. 9, p. 1041-1180, 1962.
- KIM, K. Y.; JORDAN, D.; KRISHNAN, H. B. *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite. *FEMS Microbiology Letters*, v. 153, p. 273-277, 1997.
- KIM, K.Y.; MCDONALD, G.A.; JORDAN, D. Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. *Biology and Fertility Soils*, v. 24, p. 347-352, 1997.
- KPOMBLEKOU, K., TABATABAI, M.A. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Science*. v.158, p. 442– 453, 1994.

KUCEY, R. M. N. Increased phosphorus uptake by wheat and field beans inoculated with a phosphorus-solubilizing *Penicillium bilaji* strain and with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Environmental Microbiology*, v. 53, p. 2699-2703, 1987.

KUCEY, R.M.N.; JANZEN, H.H.; LEGGETT, M.E. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Advanced Agronomy*, v. 42, p. 199–228, 1989.

LEINHOS, V.; VACEK, O. Biosynthesis of auxins by phosphate-solubilizing rhizobacteria from wheat (*Triticum aestivum*) and rye (*Secale cereale*). *Microbiological Research*, Jena, v. 149, p. 31-35, 1994.

LEITE, M. V. Fungos Filamentosos do Lodo de Esgoto: Impacto na Microbiana Fúngica e Potencial Enzimático. 2009. 65 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) – Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2003.

LEYVAL, C; BERTHELIN, J. Compararison between the utilization of phosphorus from insoluble phosphates by ectomycorrhizal fungi and rhizobacteria. In: EMS/1° SEM, 1, Dijon, 1985. *Mycorrhizae: Physiology and genetics/Les mycorrhizes: Physiologie et genétique*. Paris, INRA, p.345-349, 1986.

LIMA, T. Modelo de Inferência para a estimação da umidade do leito de um biorreator de fermentação no estado sólido. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná. Curitiba – PR, 2009.

LONERAGAN, J. F. Plant nutrition in the 20th and perspectives for the 21st century. *Plant and Soil*, v. 196, p. 163-174, 1997.

LUGTENBERG, B.J.J.; CHIN-A-WOENG, T.F.C.; BLOEMBERG, G.V. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 81, p. 373-383, 2002.
MAAR, J.R. Justus Von Liebig, 1803-1873. Parte 1: vida, personalidade, pensamento. *Química Nova*, v. 29, n.5, p. 1129-1137, 2006.

MARSCHNER, H. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, San Diego, CA, p. 889, 1995.

MASALHA, J.; KOSEGARTEN, H.; ELMACI, Ö.; MENGEL, K. The central role of microbial activity form iron acquisition in maize and sunflower. *Biology and Fertility Soils*, v. 30, p. 433-439, 2000.

MELO, I.S. DE; COSTA, F. G., Desenvolvimento uma formulação granulada a base de *Trichoderma harzianum* para controle de fitopatógenos. Comunicado técnico 31, Jagariúna, São Paulo, Agosto, ISSN 1516-8638, 2005.

MENDES, G. O.; FREITAS, A. L. M.; PEREIRA, O. L.; SILVA, I. R.; VASSILEV, N. B.; COSTA, M. D. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Annals of Microbiology*, v. 64, p. 239–249, 2014.

MENDES, G.O.; DIAS, C.S.; SILVA, I.R.; JUNIOR, J.I.; PEREIRA, O. L.; COSTA, M.D.; Fungal rock phosphate solubilization using sugarcane bagasse. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.29, p.43–50, 2013. doi:10.1007/s11274-012-1156-5.

- MERCHUK, J. C.; GLUZ, M. Bioreactor, air-lift reactors. Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation. Editora John Wiley & Sons. 320-324, 327, 340-344, 1999.
- MITCHELL, D.A; STUART, D.M.; HARDIN, M.T.; KRIEGER, N. Rotating-Drum and Stirred-Drum Bioreactors. In: Solid-State Fermentation Bioreactors – Fundamentals of design and operation. Berlin: Springer-Verlag, cap.8, 2006.
- MOLLA, M. A. Z.; CHOWDHURY, A. A.; ISLAM, A.; HOQUE, S. Microbial mineralization of organic phosphate in soil. Plant and Soil. v. 78, p. 393-399, 1984.
- MOTEKAITIS, R.J.; MARTELL, A.E. Complexes of aluminium (III) with hydroxyl carboxylic acids. Inorganic Chemistry, v.23, p. 18-23, 1984.
- NAGARAJAH, S.; POSNER, A. M.; QUIRK, J.P. Competitive adsorption of phosphate with polygalacturonate and other organic acids on kaolinite and oxide surfaces. Nature, v. 228, p. 83-85, 1970.
- NAHAS, E.; ASSIS, L.C. Efeito da concentração de fosfato na solubilização de fluorapatita por *Aspergillus niger*. Revista Brasileira de Microbiologia, v. 23, p. 37-42, 1992.
- NAHAS, E.; BANZATTO, D.A.; ASSIS, L.C. Fluorapatite solubilization by *Aspergillus niger* in vinegar medium. Soil Biology & Biochemistry, v. 22, p. 1097-1101, 1990.
- NAHAS, E.; FORNASIERI, D.J.; ASSIS, L.C. Resposta á inoculação de fungo solubilizador de fósforo em milho. Scientia Agrícola, v. 51, n. 3, p. 463-469, 1994b.
- NAHAS, E.; PUPIN, B.; FREDDI, O. S. Microbial alterations of the soil influenced by induced compaction. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 33, n. 5, p.1207-1213, 2009.
- NAHAS, E.; TERENCEZ, H.F.; ROSSI, A. Effect of carbon source and pH on the production and secretion of acid phosphatase (EC 3.1.3.2.) and alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1.) in *Neurospora crassa*. Journal of General Microbiology, v. 128, p. 2017-2021, 1982.
- NARLOCH, C.; OLIVEIRA, V.L.; ANJOS, J.T.; SILVA FILHO, G.N. - Respostas da cultura do rabanete à inoculação de fungos solubilizadores de fosfatos. Pesq. Agropec. Bras., 37: 841-845, 2002.
- NARLOCH, G. Interações microrganismos solubilizadores de fosfatos – fungos ectomicorrízicos e o crescimento de *Pinus taeda* L. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC, 2002
- NAZ, I.; BANO, A. Biochemical, molecular characterization and growth promoting effects of phosphate solubilizing *Pseudomonas* sp. isolated from weeds grown in salt range of Pakistan. Plant and Soil. v. 334, n. 1-2, p. 199-207, 2010.
- NELSON, T. S.; DANIELS, F.B.; HALL, J.R.; SHIELDS, L.G. Hydrolysis of natural phytate phosphorus in the digestive tract of calves. Journal of Animal Science, Champaign, v. 42, n. 6, p. 1509-1512, 1976.

NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J. Fósforo em solo e planta em condições tropicais. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, p. 399, 1999.

OBBERSON, A.; BESSON, J. M.; MAIRE, N.; STICHER, H. Microbiological processes in soil organic phosphorus transformations in conventional and biological cropping systems. *Biology and Fertility of Soils*, v.21, n. 3, p. 138-148, 1996.

OLIVEIRA C.A.; ALVES V.M.C.; MARRIEL I.E.; GOMES E.A.; SCOTTI M.R.; CARNEIRO N.P.; GUIMARÃES C.T.; SCHAFFERT R.E.; SÁ N.M.H. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 41, p. 1782–1787, 2009.

OLIVEIRA, I.P.; THUNG, M. D.; SOUZA, C.M.R.; SANTOS, R.S.M. Atividade da fosfatase ácida no feijoeiro e sua correlação com parâmetros de crescimento. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 29, n. 2, p. 43-49, 1999.

OLIVEIRA-MENDES, G.; DE FREITAS, A.L.M.; PEREIRA, O.L.; DA SILVA, I.R.; VASSILEV, N.B.; COSTA, M.D. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Annals of Microbiology*, v. 64, p. 239–249, 2014.

ONKEN, U.; WEILAND, P., *Airlift Fermenters: Construction, Behavior, and Uses*, Advanced Biotechnology Processes. p. 67-95, 1983.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; RODRIGUEZ-LEON, J.A.; NIGAM, P. Aspects of design of fermenter in solid state fermentation, *Solid State Fermentation in Biotechnology: fundamentals and applications*. New Delhi: Asiatech Publishers. P. 73-77, 2001.

PAPAGIANNI, M.; BOONPOOH, Y.; MATTEY, M.; KRISTIANSEN, B. Substrate inhibition kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in fed-batch cultures operated at constant glucose and maltose concentration levels. *J Ind Microbiol Biotechnol*. v. 34(4), p.301-309, 2007.

PIKOVSKAYA, R.I. Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiologiya*. v.17, p.362–370, 1948.

PINHEIRO, S. A exumação do cadáver no armário. In: *Rochagem-I: adubação com rochas silicatadas moídas*. Revista Agroecologia Hoje, ano IV, n., Agosto/Setembro, 2003.

PLAXTON, W.C.; LAMBERS, H. *Phosphorus Metabolism in Plants*. Wiley Blackwell, Oxford, UK (2015). 449 pp., EUR 202.50, GBP 150.00, ISBN: 978-1-118-95885-8 poorly soluble rock phosphates by *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*. v. 84, p. 187-189, 2002.

RAGHAVARAO, K.S.M.S.; RANGHANATHAN, T.V.; KARANTH, N.G. Some engineering aspects of solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 127–135, 2002.

RAHMAN, A.; BEGUM, M. F.; RAHMAN, M.; BARI, M. A.; ILIAS, G. N. M.; ALAM, M. F. Isolation and identification of *Trichoderma* species from different habitats and their use for

bioconversion of solid waste. Turkish Journal of Biology (TUBITAK). v.35, p. 186-194, 2011.

RAIJ, B. Fertilidade do solo e adubação. São Paulo, Ceres, p. 343, 1991.

RAPER, A.; THORN, W. Topic bibliography of acid production. Manual of *Penicillia* (A. Raper and W. Thorn, Eds). Hafner, New York. p. 709-713, 1968.

REICHARDT, K.; TIMM, L. C. Absorção de nutrientes pelas plantas. Solo, planta e atmosfera: conceitos, processos e aplicações. São Paulo: Editora Manole. cap. 16, p. 341-362, 2004.

REID, M.S.M.; BIELESKI, R.L. Changes in phosphatase activity in phosphorus deficient *Spirodela*. *Planta*, v. 94, p. 273-284, 1970.

RESENDE, Á. V. Micronutrientes na agricultura brasileira: disponibilidade, utilização e perspectivas. EMBRAPA Cerrados. Série Estudos e Documentos, 64, CETEM, 36p. 2005.

REYES, I.; BERNIER, L.; SIMARD, R.R.; ANTOUN, H. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 28, p. 281- 290, 1999.

RICHARDSON, A.E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, v. 28, p. 897-906, 2001.

RINU, K.; PANDEY, A. Temperature-dependent phosphate solubilization by cold- and pH-tolerant species of *Aspergillus* isolated from Himalayan soil. *Mycoscience*. v. 51, p.263-271, 2010. doi 10.1007/s10267-010-0036-9.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, v.17, p.319-339, 1999.

RODRIGUEZ, S.; SAROMÁN, M. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal*, v. 22, p. 211-219, 2005.

ROOS, W.; LUCKNER M. Relationship between proton extrusion and fluxes of ammonium ions and organic acids in *Penicillium cyclopium*. *Journal of General Microbiology* 130, 1007-1014, 1984.

ROVEDA JUNIOR, A. C. Desenvolvimento de um bioreator rotativo para fermentação em estado sólido: Relatório final do trabalho de iniciação científica, São Paulo: FAPESP, 2008.

SAHIN, F.; ÇAKMAKÇI, R.; KANTAR, F. Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N₂-fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant and Soil*, v. 265, n. 1-2, p. 123-129, 2004.

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

SANCHES, P.A.; SALINAS, J.G. Low-input technology for managing Oxisols and Ultisols in tropical America. *Advances in Agronomy*, v.34, p.279-406, 1981.

SCHNEIDER, K.D.; VAN STRAATEN, P.; DE ORDUÑA, R.M.; GLASAUER, S.; TREVORS, J.; FALLOW, D.; SMITH, P.S. 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, 2010.

SHARMA, A.; JOHRI, B.N. Combat of iron-deprivation through a plant growth promotin fluorescent *Pseudomonas* strain GRP3A in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). *Microbiological Research*, v. 158, p. 77-81, 2003.

SHARMA, A.; JOHRIA, A B.N.; SHARMAB, A.K.; GLICKC, B. R. Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP3 influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). *Soil Biology and Biochemistry*, v. 35, p. 887-894, 2003.

SHU, P.; JOHNSON, M. J. Citric acid production by submerged fermentation with *Aspergillus niger*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 40, p.1202-1205, 1948.

SILVA D. N. Identificação de bactérias solubilizadoras de Fosfato e análise do seu efeito sobre o Desenvolvimento de plantas de arabidopsis thaliana. Tese de Doutorado universidade estadual do norte fluminense Darcy ribeiro – UENF. Campos dos goytacazes – RJ. Abril – 2012.

SILVA FILHO, G.N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R.; KAMINSKI, A. - Produção de matéria seca a absorção de fósforo pelo azevém, trevo branco e macieira cultivados em solos inoculados com microrganismos solubilizadores de fosfatos. REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS. Anais. Piracicaba, ESALQ/CENA, v. 20, p. 424, Piracicaba, 1992.

SILVA FILHO, G.N. Solubilização de fosfatos pela microbiota do solo. 1998. 140f. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre - RS, 1998.

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

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

SILVA, F.C.; BASSO, L.C. Avaliação da atividade in vivo da fosfatase ácida da folha na diagnose da nutrição fosfórica em cana-de-açúcar. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 17, n. 3, p. 371-375, 1993.

SILVA, L.E.S.F. Fixação do N₂ no caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) pela interação *Brasyrhizobium* sp. X *Glomus clarum* sob condições de estresse hídrico.. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Cidade, 2003.

- SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F.; MARTÍNEZ, C.R.; SELDIN, L.; BURITY, H.A.; FIGUEIREDO, M.V.B. Estirpes de *Paenibacillus* promotoras de nodulação específica na simbiose *Bradyrhizobium-caupi*. *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 29, n. 3, p. 331-338, 2007.
- SILVA, V.N. Interação de microrganismos na solubilização de fósforo e potássio de rochas para produção de biofertilizantes. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal - RN, 2013.
- SILVEROL, A. C. Processo Humifert para fertilizantes alternativos organo-fosfatados: obtenção a partir do minério de Angico dos Dias, caracterização dos compostos e avaliação da eficiência agrônômica. Dissertação (Mestrado) IGc, Universidade de São Paulo, São Paulo. p. 179, 2006.
- SOUCHIE, E. L.; ABOUD, A. C. de S. Solubilização de fosfato por microrganismos rizosféricos de genótipos de Guandu cultivados em diferentes classes de solo. *Semana: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 28, n. 1, p. 11-18, 2007.
- SOUCHIE, E. L.; CAMPELLO, E. F. C.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. Mudanças de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. *Embrapa Florestas*, v.35, n.2, p.329-334, 2005a.
- SOUCHIE, E.L.; SAGGIN-JUNIOR, O.J.; SILVA, E.M.K.; CAMPELLO, E.F.C. AZCÓN, R.; BAREA, J.M. Communities of P-solubilizing bacteria, fungi and arbuscular mycorrhizal fungi in grass pasture and secondary forest of Paraty, RJ-Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 78, p. 183-193, 2006.
- SPERBER, J. I. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. *Australian Journal of Agricultural Research*. v. 9, p. 778-781, 1958.
- SPERBER, J.I. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Australian Journal of Agricultural Research*, v. 9, p. 778-781, 1958.
- SRIDEVI, M.; MALLAIAH, K.V. Phosphate solubilization by *Rhizobium* strains. *Indian Journal of Microbiology*, v. 49, p. 98-102, 2009.
- STAMFORD, N.P.; IZQUIERDO, C.G.; FERNÁNDEZ, M. T.H.; MORENO, M.; DEL C. M. Biofertilizantes de rochas fosfatadas e potássicas com enxofre e *acidithiobacillus*. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; SATAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E.R.S. (eds). *Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura*. Guaíba, Agrolivros, p. 401-421, 2008.
- STRZELCZYK, E.; ROZYCKI, H. Production of B-group vitamins by bacteria isolated from soil, rhizosphere, and mycorrhizosphere of Pine (*Pinus sylvestris* L.). *Zentralblatt Für Mikrobiologie*, v. 140, p. 293-301, 1985.
- STUMM, W.; FURRER, G.; KUNZ, B. The role of surface coordination in precipitation and dissolution of mineral phases. *Croat Chemical. Acta* 56, p. 593-611, 1983.
- SUDHAKARA REDDY, M.; KUMAR, S.; BABITA, K., REDDY, M.S. Biosolubilization of

Sumário Mineral, Departamento Nacional de Produção Mineral. Coordenadores Thiers Muniz Lima, Carlos Augusto Ramos Neves Brasília: DNPM, Volume 35, Brasília. 2016. 135 p.: il.; 29 cm. ISSN 0101 2053. Acesso em 25/04/2016.

SUN, G. Y.; DENG, S. P.; RAUN, W. R. Bacterial community structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem. *Apple Environment Microbiology*, v.70, p. 5868-5874, 2004.

SURANGE, S. Comparative phosphate solubilizing capacity of some soil fungi. *Current Science*. v. 54, p.1134-1135. 1985.

TARAFDARD, J.C.; ROY, A.B.; MANDALAK, G. Enzyme status of some jute-growing soils of west Bengal. *Australian Journal of Soil*, v. 2, p. 181-184, 1981.

TROLLDENIER, G. Techniques for observing phosphorus mobilization in the rhizosphere. *Biology and Fertility of Soils*, v. 14, p. 121-125, 1992.

TSAL, S. M.; ROSSETTO, R. Transformações microbianas do fósforo. In: CARDOSO, Elke J. B. N.; TSAI, Sui M.; NEVES, Maria Cristina P. *Microbiologia do solo*. Campinas, SP: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 360 p., 1992.

VAN DER PLOEG, R.; BOHM, W.; KIRKHAM, M. On the origin of the theory of mineral nutrition of plants and the law of the minimum. *Soil. Sci. Soc. Am. J.*, v. 63, p. 1055–1062, 1999.

VASSILEV, N.; BACA, M.T.; VASSILEVA, M.; FRANCO, I.; AZCON, R. Rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* grown on sugar-beet waste medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 44, p. 546–549, 1995.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; NIKOLAEVA, I. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 71, p. 137–144, 2006.

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

VASSILEVA, M.; VASSILEV, N.; AZCON, R. Rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* on olive cake based medium and its further application in a soil-plant system. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 14, p. 281–284, 1998.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers, *Plant and Soil*, v. 255, p. 571-586, 2003.

VIEIRA, P. A.; FARIA, S.; VIEIRA, R. B.; DE FRANÇA, F. P.; CARDOSO, V. L.; Statistical analysis and optimization of nitrogen, phosphorus, and inoculum concentrations for the biodegradation of petroleum hydrocarbons by response surface methodology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. v. 25, Issue 3, p. 427–438, 2009.

VIG, A. C.; DEV, G. Phosphorus adsorption characteristics of some acid and alkaline soils. *Journal of the Indian Society of Soil Science*, v. 32, p. 235-239, 1984.

WAHID, O.A.; MEHANA, T.A. Impact of phosphate-solubilizing fungi on the yield and phosphorus-uptake by wheat and faba bean plants. *Microbiological Research*. v. 155, p. 221–227, 2000.

WASEL, Y.; ESHEL, I.; KAFKAFI, A. *Plant Roots: The Hidden Half*. 3ª Edição, revisada e expandida. New York, USA: Marcel Dekker Incorporated, p. 897-909. 2002.

WAKELIN, S.A.; WARREN, R.A.; HARVEY, P.R.; RYDER, M.H.P. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. *Biology and Fertility of Soils*, v. 40, p. 36–43, 2004.

WANG, Y.; SHI, Y.; LI, B.; SHAN, C.; IBRAHIM, M.; JABEEN, A.; XIE, G.; SUN, G. Phosphate solubilization of *Paenibacillus polymyxa* and *Paenibacillus macerans* from mycorrhizal and non- mycorrhizal cucumber plants. *African Journal of Microbiology Research*, v. 6, n.21, p. 4567-4573, 2012.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal DNA for phylogenetics. In: Innes, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic, San Diego, CA, pp. 315–322, 1990.

WHITELAW, M.A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*. v. 69, p. 99-151, 2000.

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

XIAO, D.; BULAT, F.Q.; YANG, W.; BERATAN, D.N. *Nano Letters*. v. 8, p-2814-5818, 2008.

YANG, J, KLOEPPER, J., RYU C. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, v. 14, p. 1-4. 2009.

APÊNDICE

APÊNDICE A

DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO

Uma solução de ortofosfato reage com o molibdato de amônio e com vanádio para formação do ácido vanadomolibdatofosfórico, de coloração amarela. A intensidade da cor amarela é proporcional à concentração do fósforo. A faixa de trabalho do método é de 1 a 10 mg/L (ppm) de fósforo em comprimento de onda de 420 nm.

Para coloração foi utilizado a solução de vanadomolibdato de amônio preparada através da mistura de duas soluções. A primeira consistiu na dissolução de 40g de molibdato de amônio $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ em 400 mL de água destilada. A segunda foi realizada dissolvendo 1 g de metavanadato de amônio NH_4VO_3 em uma mistura de 300 mL de água destilada e 200 mL de ácido nítrico concentrado. A segunda solução foi adicionada a primeira, em seguida completou esta mistura a 1000 mL com água destilada.

Para leitura do resultado de fósforo foi transferido 50 mL do extrato líquido da amostra, ou o mesmo diluído, para frasco de Erlenmeyer de 250 mL. Em seguida foi adicionado 25 mL da solução de vanadomolibdato de amônio seguido de agitação vigorosa. Após 2 minutos para desenvolvimento da cor, foi determinada a absorbância das amostras em espectrofotômetro a 420 nm. 50 mL de água destilada foi utilizada como branco, seguindo o mesmo procedimento dos extratos.

A curva padrão foi constituída pelos pontos de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 e 10 mg/L de P, empregando fosfato de potássio monobásico como solução padrão, seguindo o mesmo procedimento dos extratos líquidos das amostras.

Os dados utilizados para determinação da curva padrão, bem como o gráfico e a equação da curva padrão obtida são apresentados abaixo.

Curva Padrão				
Concentração de Fósforo (ppm)		Absorbância (λ)		Absorbância média (λ)
	1	0,046	0,042	0,044
	2	0,055	0,076	0,066
	3	0,098	0,102	0,100
	4	0,131	0,136	0,133
	5	0,160	0,169	0,164
	6	0,175	0,189	0,182
	7	0,202	0,207	0,204
	8	0,237	0,240	0,239
	9	0,277	0,278	0,277
	10	0,319	0,313	0,316