

Biossolubilização de rochas silicáticas e produção de ácidos orgânicos *in vitro* por fungos filamentosos isolados de solos ferruginosos de Minas Gerais

Talita Coeli D'Angelis de Aparecida Ramos ⁽¹⁾; Francisco Adriano de Souza ⁽²⁾; Christiane de Abreu Oliveira Paiva ⁽²⁾; Maria Lúcia Ferreira Simeane ⁽²⁾; Jacqueline Aparecida Takahashi ⁽³⁾; Ivanildo Evódio Marriel ^(2,4)

⁽¹⁾ Mestre em Ciências Agrárias; Universidade Federal de São João del Rei, Sete Lagoas, Minas Gerais. ⁽²⁾ Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo. ⁽³⁾ Professora, Doutora, Universidade Federal de Minas Gerais. ⁽⁴⁾ Autor correspondente (marriel@embrapa.br)

RESUMO: A comunidade autóctone de fungos filamentosos de ambientes inóspitos como solos próximos de áreas de mineração desenvolve mecanismos adaptativos que envolvem a produção de diversos metabólitos de interesse biotecnológico. Objetivou-se avaliar a produção de ácidos orgânicos como mecanismo de biossolubilização de rochas silicáticas *in vitro* por fungos filamentosos isolados de áreas impactadas por mineração e entorno. Foram avaliados nove isolados de fungos pertencentes à Coleção de Micro-organismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo. Cinco discos de micélio de cada isolado foram transferidos para em meio MISK suplementado com pó de glauconito e flogopito como única fonte de potássio (K), e incubados durante 14 dias sob agitação de 100 rpm à 28° C. Após, as culturas foram centrifugadas e filtradas para a quantificação dos ácidos orgânicos (cítrico, oxálico e láctico) dos teores de Potássio. A produção de ácidos orgânicos variou em função da rocha e do isolado de fungo. Independentemente da rocha, os valores médios variaram de 13 3,86 mg L⁻¹ a 1400,0 3,86 mg L⁻¹ para ácido cítrico, 68 3,86 mg L⁻¹ a 329049,0 3,86 mg L⁻¹ para ácido láctico e 0,54 3,86 mg L⁻¹ a 9,5 3,86 mg L⁻¹ para ácido oxálico, sendo os valores mais elevados observados para o isolado CMSV798 (*Penicillium sp.*). Houve correlação positiva e significativa entre produção de ácido orgânico e liberação de K, com maior coeficiente para ácido cítrico. Os resultados evidenciam o envolvimento destes ácidos, em particular do ácido cítrico, como mecanismos envolvidos na biodisponibilidade de nutrientes a partir de rochas silicáticas.

Termos de indexação: Rochas potássicas, mecanismos, biodisponibilização de nutrientes.

INTRODUÇÃO

A necessidade de aumentar a oferta de nutrientes para garantir a crescente demanda por

alimentos torna o Brasil cada vez mais dependente de fertilizantes importados, principalmente os potássicos. Este fato implica em ações que favoreçam bem como a conservação dos recursos minerais locais, a sustentabilidade da agricultura brasileira, bem como a mitigação de impactos potenciais negativos de fertilizantes sintéticos sobre o ambiente (Chaves, 2010; Martins et al., 2008). Vários estudos demonstram a contribuição de micro-organismos selecionados eficientes em solubilizar rochas silicáticas e potássicas de baixa solubilidade, enfatizando a importância dos processos biológicos na geração de fertilizantes alternativos e diferenciados (Meena, 2014; Marriel et al., 2006).

A comunidade autóctone de fungos filamentosos de ambientes inóspitos como solos próximos de áreas de mineração desenvolve mecanismos adaptativos que envolvem a produção de diversos metabólitos de interesse biotecnológico. O objetivo deste estudo foi avaliar a produção de determinados ácidos orgânicos como mecanismo de biossolubilização de rochas silicáticas *in vitro* por fungos filamentosos isolados de áreas impactadas por mineração e de seu entorno.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos em laboratórios da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais. Para avaliar a produção de ácidos orgânicos e a capacidade de biossolubilização de Potássio (K), foram utilizados nove isolados de fungos filamentosos oriundos de solos da região do Quadrilátero Ferrífero, MG, pré-selecionados para biossolubilização. Estes isolados que estavam preservados a -86° C na coleção de Micro-organismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF-CNPMS) foram reativados e testados quanto à pureza em meio de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA), durante sete dias e

identificados via sequenciamento da região ITS do rDna (**Tabela 1**).

Cinco discos de micélio de 8 mm de diâmetro de cada isolado foram transferidos para frascos erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura líquido MISK (solução de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 10%, 5 mL; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1%, 2 mL; $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1%, 2 mL; FeCl_3 1%, 1 mL; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1%; pH 7,0) suplementado com 0,5 % de pó de Glauconito (Verdete de Abaeté) e Flogopito, como única fonte de potássio. As culturas foram incubadas durante 14 dias sob agitação de 100 rpm, à temperatura de 28° C. Logo após, foram centrifugadas e filtradas. Uma alíquota do sobrenadante de cada cultura foi utilizada para a quantificação dos ácidos orgânicos (ácido cítrico, oxálico e láctico) via HPLC (High Performance Liquid Chromatographic) e dos teores de K por meio de espectrofotometria de Emissão Atômica por Plasma (ICP).

Delineamento e análise estatística

O delineamento experimental adotado foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 10x2 com três repetições. O controle consistiu do meio de cultura sem o inóculo, somente com o pó de rocha. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade utilizando-se o programa SISVAR 5.3®. O teste de correlação de Pearson foi realizado no programa minitab 14.0.7

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados para teores de Potássio liberado no meio de cultura contendo as rochas silicáticas testadas estão apresentados na **Tabela 2**. Independentemente do tipo de rocha, observou-se diferença significativa para o teor de K disponível em função dos isolados de fungos.

Em relação à rocha flogopito, os teores de K solubilizado variaram de 0,07 a 3,86 3,86 mg L⁻¹, sendo os valores mais elevados detectados na presença dos isolados CMSV 296 - *Penicillium sp* (2,22 3,86 mg L⁻¹), CMSV 200 - *T. harzianum* (2,85 3,86 mg L⁻¹), CMSV 798 - *Penicillium sp.* (3,86 3,86 mg L⁻¹) após 14 dias de incubação. Neste caso, o isolado CMSV 798 mostrou maior eficiência de solubilização, com incremento de até 338%, em relação ao tratamento controle, sem inoculação.

Por outro lado, o fungo que apresentou maior capacidade de solubilização de K a partir da rocha verdete foi o isolado CMSV 947, identificado como *P. simplicium*, com a liberação de até 6,72

3,86 mg L⁻¹ de K no meio, equivalente a 407% superior em relação ao controle.

Os teores de K disponibilizados no meio assemelham-se aos encontrados por Zhang & Kong (2014) em estudos realizados com estirpes bacterianas para solubilização da rocha feldspato. Os autores encontraram 0,59 a 4,4 mg L⁻¹ de K ao final de sete dias de incubação.

O coeficiente de correlação entre K e pH não foi significativo, embora a eficiência de solubilização tenha apresentado uma associação negativa com o aumento da acidez. ($r = -0,10$). Entretanto, houve redução nos valores de pH ($p < 0,05$) do meio, atingindo valores de 2,63 e 2,65 para as rochas verdete e flogopito respectivamente, na presença do isolado CMSV 798 (**Figura 1**).

Estes resultados estão de acordo com vários trabalhos que relatam decréscimos dos valores de pH durante o processo solubilização a partir da liberação de ácidos orgânicos e prótons H⁺ pelos micro-organismos (Behera et al., 2014; Meena et al., 2014).

Os resultados da análise cromatográfica para determinação de ácidos orgânicos demonstrou o potencial de produção de ácido oxálico, cítrico e láctico exibido pelos isolados de fungos filamentosos analisados. Observou-se variabilidade genética entre os isolados na capacidade de produção de ácidos orgânicos pelos fungos na presença de flogopito e verdete ($p < 0,05$) (**Tabela 3**).

Com relação às rochas, o ácido encontrado em maior concentração foi o láctico, com 271202,8 mg L⁻¹ na presença de flogopito e 368895,8 mg L⁻¹, na presença de Verdete.

Entre os isolados avaliados, o isolado CMSV 798 identificado como *Penicillium sp.* destacou-se, sendo o mais eficiente na produção dos três ácidos orgânicos independentemente do tipo de rocha. Os resultados apresentados demonstram que este isolado promoveu um acréscimo de mais de 1000 vezes nos teores de ácido cítrico, sendo potencialmente útil na agroindústria.

Observou-se uma correlação significativa entre a produção de ácidos orgânicos e solubilização de K ($r^* = 0,51, 0,48, 0,46$ para ácido cítrico, láctico e oxálico respectivamente). Este fato implica na capacidade de produção de ácidos orgânicos pelos fungos no processo de biossolubilização. Houve correlação negativa e significativa entre a produção de ácidos orgânicos e pH para ácido cítrico ($r = -0,34^*$). Para os demais ácidos esta correlação não foi significativa, embora também tenha sido observada uma associação negativa. Vários autores apontam para ocorrência de acidificação do meio por meio da liberação de H⁺ proveniente principalmente da produção de ácidos

orgânicos (Behera et al., 2014; Meena et al, 2014; Parmar & Sindhu, 2013).

Como resultado dessa análise, os fungos com alto potencial de produção de ácidos orgânicos, como o isolado CMSV 798 – *Penicillium sp.*, podem ser explorados de diversas formas. Além do processo de solubilização como estratégia para aumentar o valor fertilizante de rochas de baixa solubilidade os ácidos orgânicos avaliados possuem uma gama de utilizações biotecnológicas e o mercado consumidor é crescente, a busca de fontes alternativas e de baixo custo para a sua produção torna-se cada vez mais relevante.

CONCLUSÕES

A variabilidade existente entre os fungos habitantes de ambientes ferruginosos permitiu a seleção de isolados com potencial biotecnológico de interesse agroindustrial.

Os ácidos orgânicos avaliados principalmente o ácido cítrico, participam dos mecanismos envolvidos na biodisponibilidade de nutrientes a partir de rochas silicáticas, além de uso potencial em outros setores biotecnológicos.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, FAPEMIG, CNPq, EMBRAPA e VALE S.A pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

ARCHANA, D.S.; NANDISH, M.S.; SAVALAGI, V.P.; ALAGAWADI, A.R. Characterization of potassium solubilizing bacteria (KSB) from rhizosphere soil. *Bioinfolet*, v.10, p. 248-57, 2013.

BEHERA, B.C.; SINGDEVSACHAN, 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.

CHAVES, A.P. Rotas tecnológicas convencionais e alternativas para a obtenção de fertilizantes. In: FERNANDES, F.R.; LUZ, A.B.; CASTILHOS, Z.C. *Agrominerais para o Brasil*. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2010.

MARRIEL, I.E.; COELHO, A M.; GUIMARÃES, P.S.; SOARES, E.M.; NONATO, L.F.V.; OLIVEIRA, C.A.; ALVES, V.M.C. Seleção de isolados de fungos biossolubilizadores de rochas silicáticas in vitro. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 2006. Dourados. Anais. Embrapa Agropecuaria Oeste. CDRom

MARTINS, E.S.; RESENDE, A.V.; OLIVEIRA, C.G.; NETO, A.E.F. Materiais silicáticos como fontes regionais de nutrientes e condicionadores de solos. In: FERNANDES, F.R.; LUZ, A.B.; CASTILHOS, Z.C. *Agrominerais para o Brasil*. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2010.

MEENA, V.S.; MAURYA, B.R.; VERMA, P. Does a rhizospheric microorganism enhance K⁺ availability in agricultural soils? *Microbiological Research*, v. 169 p. 337-347, 2014.

ZHANG, A. ZHAO, G. GAO, T. WANG, W. LI, J. ZHANG, S. Solubilization of insoluble potassium and phosphate by *Paenibacillus kribensis* CX-7: a soil microorganism with biological control potential. *Afr J Microbiol Res*, v. 7(1), p. 41-47, 2013.

PARMAR, P.; SINDHU, S.S. Potassium solubilization by rhizosphere bacteria: influence of nutritional and environmental conditions. *J Microbiol Res*, v. 3, p. 25-31. 2013.

ZHANG, F. KONG. Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from tobacco rhizospheric soil and their effect on tobacco plants. *Applied. Soil Ecology*, v. 82, p.18-25, 2014.

Tabela 1. Isolados de fungos filamentosos utilizados para avaliação da capacidade de biossolubilização de Potássio e produção de ácidos orgânicos.

Identificação do isolado (CMMF-CNPMS)	Identificação no GenBank ¹	Ecosistema ²
CMSV 844	<i>Trichoderma harzianum</i>	Mata
CMSV 502	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	Canga
CMSV 870	<i>Trichoderma harzianum</i>	Eucalipto
CMSV 200	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Canga
CMSV 296	<i>Penicillium sp.</i>	Eucalipto
CMSV 798	<i>Penicillium sp.</i>	Cerrado
CMSV 947	<i>Penicillium simplicium</i>	Canga
CMSV 250	<i>Penicillium sp.</i>	Cerrado
CMSV 733	<i>Mucor fragilis</i>	Capim

¹Identificação de isolados de fungos filamentosos por sequenciamento da região ITS do rDNA pela ferramenta BLAST N em comparação com o material encontrado no *GenBank*² Área de coleta dos fungos na mina córrego do meio, Sabará, MG

Tabela 2. Solubilização de K após 14 dias de incubação em meio de cultura MISK contendo pó de rocha Flogopito e Verdete como fonte única de K.

Isolado	Teor de Potássio	
	Flogopito	Verdete
	----- mg L ⁻¹ -----	
CMSV 250	n.d	0,67 a
CMSV 870	0,07 a	1,28 a
CMSV 844	0,73 a	n.d
CMSV 947	0,79 a	6,72 d
CMSV 733	0,98 a	n.d
Não inoculado	1,14 a	1,65 b
CMSV 502	1,45 a	2,49 b
CMSV 296	2,22 b	1,89 b
CMSV 200	2,85 b	0,48 a
CMSV 798	3,86 b	4,86 c

As médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. n.d indica que não foi detectado.

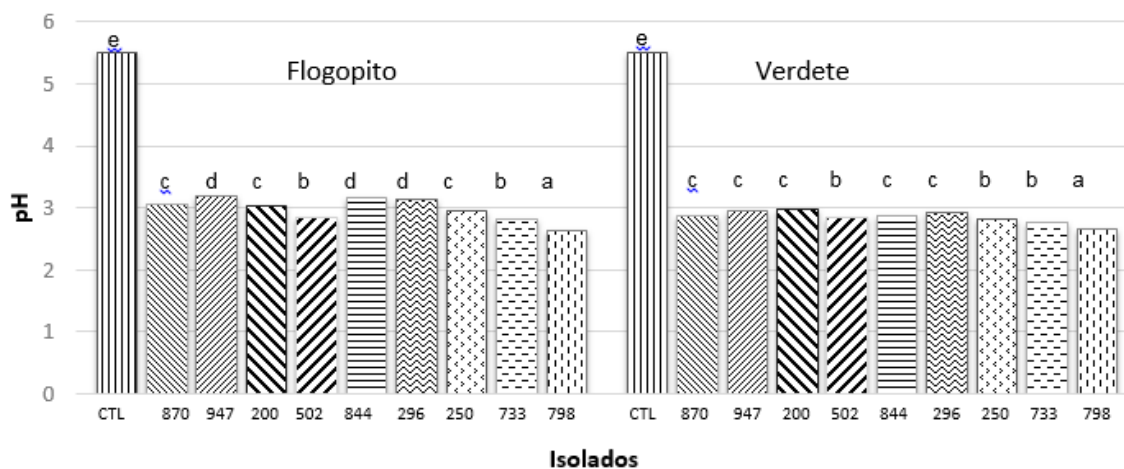


Figura 1. Variação do pH no meio de cultura após 14 dias de incubação em meio de cultura MISK contendo pó de rocha Flogopito e Verdete como única fonte de potássio. Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Tabela 3. Produção de ácido cítrico, láctico e oxálico por isolados de fungos filamentosos em meio MISK suplementados com pó de rocha Flogopito e Verdete

Isolado	Ácido cítrico (3,86 mg L ⁻¹)		Ácido láctico (mg L ⁻¹)		Ácido oxálico (mg L ⁻¹)	
	Flogopito	Verdete	Flogopito	Verdete	Flogopito	Verdete
CMSV 798	1664,7 a	1228,84 a	271202,8 a	386895,80 a	12,28 a	6,82 a
CMSV 733	451,86 b	112,95 c	872,19 b	228,23 b	0,64 b	0,81 b
CMSV 947	271,69 c	276,42 b	13,22 b	184,69 b	1,07 b	1,03 b
CMSV 250	259,25 c	229,4 b	31,61 b	79,79 b	0,20 b	0,23 b
CMSV 502	215,57 c	122,19 c	331,48 b	305,67 b	0,57 b	0,87 b
CMSV 296	177,46 c	249,97 b	24,04 b	61,36 b	0,24 b	0,31 b
CMSV 200	106,93 d	30,03 d	133,99 b	124,68 b	0,93 b	0,54 b
CMSV 870	34,67 d	117,73 c	54,88 b	64,29 b	0,72 b	0,94 b
CMSV 844	11,99 d	15,36 d	39,05 b	97,32 b	0,48 b	0,61 b
Controle	2,45 d	7,58 d	11,38 b	15,75 b	0,66 b	1,72 b

As médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.