



## Solubilização de minerais fosfatados em função da concentração de ácidos orgânicos<sup>(1)</sup>

**Gilberto de Oliveira Mendes<sup>(2)</sup>; Thalita Cardoso Anastácio<sup>(3)</sup>; Nina Morena Rêgo Muniz da Silva<sup>(3)</sup>; Victor Hugo Araújo Bonduki<sup>(3)</sup>; Maurício Dutra Costa<sup>(4)</sup>**

<sup>(1)</sup> Trabalho executado com recursos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

<sup>(2)</sup> Professor; Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências Agrárias; Monte Carmelo, MG; [gilbertomendes@ufu.br](mailto:gilbertomendes@ufu.br); <sup>(3)</sup> Estudante; Universidade Federal de Viçosa; <sup>(4)</sup> Professor, Universidade Federal de Viçosa.

**RESUMO:** A produção de ácidos orgânicos é o principal mecanismo de solubilização de minerais fosfatados por micro-organismos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência dos ácidos cítrico, oxálico e glicônico em solubilizar as seguintes fontes de P:  $\text{AlPO}_4$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{FePO}_4$ , fosfato natural de Araxá e crandalita. Cada mineral foi adicionado à concentração de 3 g L<sup>-1</sup> a soluções dos ácidos em diferentes concentrações e misturas. Os maiores percentuais de solubilização de todas as fontes de P foram obtidos nos tratamentos com 1 g L<sup>-1</sup> de ácido oxálico, atingindo até 65,2% de solubilização do  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . O melhor desempenho do ácido oxálico em comparação ao ácido cítrico é provavelmente decorrente da maior proximidade dos grupos carboxila do primeiro, propiciando maior capacidade complexante. O ácido glicônico mostrou-se ineficaz para solubilizar P nas condições avaliadas. Em conclusão, o ácido oxálico é a melhor opção para emprego em sistemas de solubilização de minerais fosfatados. A mistura dos ácidos cítrico e oxálico é vantajosa para as fontes  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e fosfato natural de Araxá.

**Termos de indexação:** fósforo, fosfato natural, fertilizante

### INTRODUÇÃO

Alguns micro-organismos do solo são capazes de solubilizar minerais fosfatados de baixa solubilidade, apresentando-se como promissora alternativa para o manejo da fertilização fosfatada (Vassilev et al., 2014; Mendes et al., 2015). A mobilização de P por esses micro-organismos resulta da produção de ácidos orgânicos (Fox et al., 1990a; Kpombrekou-A & Tabatabai, 1994) e, em menor extensão, da liberação de prótons durante o crescimento celular (Illmer & Schinner, 1995).

A solubilização de minerais por ácidos orgânicos ocorre por meio de acidólise, provocada por prótons liberados de grupos carboxila, e da complexação dos metais presentes na estrutura do mineral (Fox et al., 1990b; Matsuya & Matsuya, 1994; Fomina et al., 2005). A capacidade de complexação depende das características químicas do ácido orgânico, como

número e posição de grupos carboxila e hidroxila, da constante de estabilidade do complexo ácido orgânico-metal, da concentração do ácido, da concentração e do tipo de metal em solução, e do pH da solução (Bolan et al., 1994; Kpombrekou-A & Tabatabai, 1994; Jones, 1998; Whitelaw, 1999).

Diversos trabalhos relataram a produção dos ácidos cítrico, oxálico e glicônico por micro-organismos solubilizadores de fósforo (MSF) (Scervino et al., 2010; Schneider et al., 2010; Mendes et al., 2014; Silva et al., 2014). Contudo, a efetividade desses ácidos em solubilizar minerais fosfatados não é a mesma, dada suas diferenças moleculares. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de solubilização de minerais fosfatados por ácidos orgânicos tri-, di- e monocarboxílicos em diferentes concentrações e combinações.

### MATERIAL E MÉTODOS

Cinco minerais fosfatados de baixa solubilidade foram utilizados nos testes, sendo três reagentes sintéticos –  $\text{AlPO}_4$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  e  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – e duas rochas fosfáticas – fosfato natural de Araxá (fluorapatita com 14 % P) e crandalita (variscita com 5 % P).

Para simular as condições de um meio de solubilização microbiana de P, as reações foram realizadas no meio de cultura NBRIP (Nautiyal, 1999), que é comumente empregado em experimentos com MSF. A composição do meio, em g L<sup>-1</sup>, foi 10 g glicose, 5 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,25 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g KCl, 0,1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . O pH foi ajustado para 7 antes da adição dos minerais fosfatados. Porções individuais de cada fonte de P foram pesadas e adicionadas à concentração de 3 g L<sup>-1</sup> a frascos erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL do meio NBRIP. Os frascos contendo o meio foram esterilizados por autoclavagem a 121 °C por 20 min.

Soluções dos ácidos orgânicos cítrico, oxálico e glicônico foram preparadas a partir de reagentes analíticos e esterilizadas por filtração em membrana de 0,2 µm. As soluções dos ácidos foram adicionadas ao meio de cultura estéril em quantidades adequadas



para obter as combinações das concentrações 0; 0,5 e 1 g L<sup>-1</sup>, conforme descrito na **tabela 1**.

O experimento foi conduzido em esquema fatorial 2<sup>3</sup> + 1, correspondendo a dois níveis de cada ácido (0 e 1 g L<sup>-1</sup>) mais um ponto central (0,5 g L<sup>-1</sup>), em triplicata. Para cada fonte de P foi realizado um experimento, cujas combinações são mostradas na **tabela 1**.

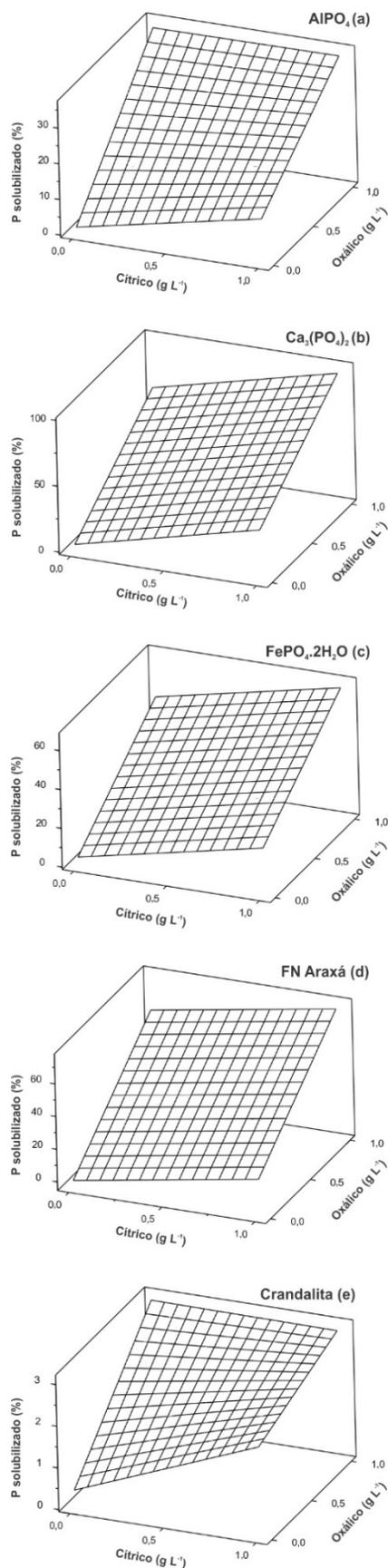
Os dados obtidos foram submetidos a análise de regressão múltipla utilizando o método dos mínimos quadrados. Foram consideradas no máximo interações entre dois fatores, sendo o efeito da interação tripla incorporado ao erro experimental. A equação ajustada foi submetida a análise de variância e os coeficientes com *p*-valor maior que 0,05 foram descartados. O coeficiente de ajuste (R<sup>2</sup>) foi também considerado para verificar a qualidade da regressão ajustada. O delineamento experimental e a análise dos dados foram feitos utilizando-se o software Minitab 17.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para todos os minerais fosfatados avaliados, o ácido oxálico apresentou os maiores percentuais de solubilização, seguido pelo ácido cítrico (**Tabela 1**). Essa superioridade também foi retratada nas equações de regressão ajustadas, onde o ácido oxálico apresentou os maiores coeficientes lineares (**Tabela 2**). Ácidos dicarboxílicos (oxálico) e tricarboxílicos (cítrico) podem solubilizar minerais tanto por acidólise quanto por complexação, o que lhes torna efetivos mesmo em condições de pH mais elevado (Matsuya & Matsuya, 1994).

A mistura dos ácidos cítrico e oxálico potencializou a solubilização de Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, FePO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O e fosfato natural de Araxá (**Figura 1**). Entretanto, para os minerais contendo Al, um efeito de interação negativo foi observado (**Tabela 2**). A altas concentrações de ácido oxálico, o efeito da adição de ácido cítrico é praticamente nulo (**Figura 1**). É provável que o complexo formado entre o ácido cítrico e o Al seja dissociado no ambiente mais ácido proporcionado pela alta concentração de ácido oxálico, o que permitiria a reprecipitação de AlPO<sub>4</sub>.

O ácido glicônico foi ineficaz para todas as fontes de P avaliadas (**Tabela 1**). Alguns trabalhos com MSF já demonstraram essa menor efetividade do ácido glicônico (Illmer & Schinner, 1995; Mendes et al., 2014). Entretanto, um grande esforço tem sido feito para obter MSF com elevada capacidade de produção de ácido glicônico no intuito de aumentar a capacidade de solubilização de P (Liu et al., 1992; Kim et al., 2003; Wagh et al., 2014), alternativa que não é suportada pelos resultados obtidos no presente trabalho. Em geral, ácidos monocarboxílicos, tais como o glicônico, possuem baixa capacidade de complexação (Ryan et al., 2001) e, portanto, solubilizam minerais principalmente por meio de acidólise.



**Figura 1** – Percentuais de P solubilizado a partir de fontes de P em função da concentração dos ácidos cítrico e oxálico.



O ácido glicônico interagiu negativamente com os ácidos oxálico e cítrico na solubilização de  $\text{FePO}_4$  e FN de Araxá, respectivamente (**Tabela 2**). O ácido glicônico ( $\text{p}K_a = 3,7$ ) é um ácido mais fraco que os ácidos oxálico ( $\text{p}K_{a1} = 1,25$ ) e cítrico ( $\text{p}K_{a1} = 3,13$ ) (Lide, 2004), podendo consumir  $\text{H}^+$  liberados destes dois últimos, o que explicaria seu efeito negativo na interação.

Os resultados obtidos evidenciam que, dentre os ácidos orgânicos produzidos por MSF, o ácido oxálico apresenta maior potencial de solubilização de P devido ao processo de acidólise e, principalmente, ao alto potencial de complexação resultante da proximidade de seus grupos carboxila (Silva et al., 2014). Esse ácido deveria ser a escolha para programas de melhoramento genético de microorganismos visando a solubilização de minerais fosfatados.

### CONCLUSÕES

O ácido oxálico é o mais eficiente em solubilizar  $\text{AlPO}_4$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , fosfato natural de Araxá e crandalita, seguido pelo ácido cítrico.

A combinação dos ácidos oxálico e cítrico nem sempre resulta em efeito aditivo de solubilização.

O ácido glicônico é ineficaz para solubilizar P nas condições avaliadas.

### AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

### REFERÊNCIAS

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*, 18:311-319, 1994.

FOMINA M.; HILLIER S.; CHARNOCK J.M.; MELVILLE K.; ALEXANDER I.J. & GADD G.M. Role of oxalic acid overexcretion in transformations of toxic metal minerals by *Beauveria caledonica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:371-381, 2005.

FOX T.R.; COMERFORD N.B. & MCFEE W.W. Kinetics of phosphorus release from spodosols: Effects of oxalate and formate. *Soil Science Society of America Journal*, 54:1441-1447, 1990a.

FOX T.R.; COMERFORD N.B. & MCFEE W.W. Phosphorus and aluminum release from a spodic horizon mediated by organic acids. *Soil Science Society of America Journal*, 54:1763-1767, 1990b.

ILLMER P. & SCHINNER F. Solubilization of inorganic calcium phosphates - Solubilization mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 27:257-263, 1995.

JONES D.L. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant and Soil*, 205:25-44, 1998.

KIM C.H.; HAN S.H.; KIM K.Y.; CHO B.H.; KIM Y.H.; KOO B.S. & KIM Y.C. Cloning and expression of pyrroloquinoline quinone (PQQ) genes from a phosphate-solubilizing bacterium *Enterobacter intermedius*. *Current Microbiology*, 47:457-461, 2003.

KPOMBLEKOU-A K. & TABATABAI M.A. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Science*, 158:442-453, 1994.

LIDE D.R. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 85th.ed. Boca Raton, CRC Press, 2004.

LIU S.T.; LEE L.Y.; TAI C.Y.; HUNG C.H.; CHANG Y.S.; WOLFRAM J.H.; ROGERS R. & GOLDSTEIN A.H. Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101: nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone. *Journal of Bacteriology*, 174:5814-5819, 1992.

MATSUYA S. & MATSUYA Y. Dissolution of dental zinc phosphate cement in organic acid solutions. *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 102:414-418, 1994.

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*, 64:239-249, 2014.

MENDES G.O.; SILVA N.M.R.M.; ANASTÁCIO T.C.; VASSILEV N.B.; RIBEIRO JÚNIOR J.I.; SILVA I.R. & COSTA M.D. Optimization of *Aspergillus niger* rock phosphate solubilization in solid-state fermentation and use of the resulting product as a P fertilizer. *Microbial Biotechnology*:DOI:10.1111/1751-7915.12289, 2015.

NAUTIYAL C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170:265-270, 1999.

RYAN P.R.; DELHAIZE E. & JONES D.L. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52:527-560, 2001.

SCERVINO J.M.; MESA M.P.; DELLA MONICA I.; RECCHI M.; MORENO N.S. & GODEAS A. Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. *Biology and Fertility of Soils*, 46:755-763, 2010.

SCHNEIDER K.D.; VAN STRAATEN P.; DE ORDUNA 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*, 108:366-374, 2010.



SILVA U.D.C.; MENDES G.D.O.; SILVA N.M.R.M.; DUARTE J.L.; SILVA I.R.; TÓTOLA M.R. & COSTA M.D. Fluoride-tolerant mutants of *Aspergillus niger* show enhanced phosphate solubilization capacity. PLoS ONE, 9:e110246, 2014.

VASSILEV N.; MENDES G.; COSTA M. & VASSILEVA M. Biotechnological tools for enhancing microbial solubilization of insoluble inorganic phosphates. Geomicrobiology Journal, 31:751-763, 2014.

WAGH J.; SHAH S.; BHANDARI P.; ARCHANA G. & KUMAR G.N. Heterologous expression of pyrroloquinoline quinone (pqq) gene cluster confers mineral phosphate solubilization ability to *Herbaspirillum seropedicae* Z67. Applied Microbiology and Biotechnology, 98:5117-5129, 2014.

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

**Tabela 1** – Fósforo solubilizado a partir de minerais fosfatados em função de combinações de concentrações ( $\text{g L}^{-1}$ ) de ácidos orgânicos em experimento fatorial  $2^3 + 1$ .

Comb.	Cítrico	Oxálico	Glicônico	AlPO <sub>4</sub>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	FePO <sub>4</sub>	FN Araxá	Crandalita
				P solubilizado (% do P-total)				
1	0	0	0	0,6	2,5	5,4	0,9	0,2
2	1	0	0	12,6	38,8	22,8	16,6	2,0
3	0	1	0	37,9	65,2	46,4	52,2	3,0
4	1	1	0	37,0	90,7	65,8	73,8	3,0
5	0	0	1	0,9	1,9	5,3	0,7	0,2
6	1	0	1	9,9	36,8	24,7	12,1	1,9
7	0	1	1	31,3	62,6	34,8	62,0	2,8
8	1	1	1	32,9	98,7	57,5	66,5	2,7
9 <sup>1/</sup>	0,5	0,5	0,5	22,8	50,3	30,9	37,6	2,6

<sup>1/</sup>Ponto central

**Tabela 2** – Equações de regressão para os percentuais de P solubilizado a partir de fontes de P em função da concentração dos ácidos cítrico, oxálico e glicônico.

Fonte de P	Equação de regressão	R <sup>2</sup>
AlPO <sub>4</sub>	$\hat{Y} = 1,4 + 10,5^* Ci + 33,9^{**} Ox - 10,2^* Ci Ox$	0,97
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	$\hat{Y} = 3,6 + 33,2^{**} Ci + 59,3^{**} Ox$	0,99
FePO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	$\hat{Y} = 3,7 + 19,7^{**} Ci + 42^{**} Ox + 0,9^{**} Gl - 10,9^{**} Ox Gl$	0,99
FN Araxá	$\hat{Y} = -0,9 + 18,7^{**} Ci + 56,1^{**} Ox + 4,8 Gl - 10,7^* Ci Gl$	0,99
Crandalita	$\hat{Y} = 0,4 + 1,7^{**} Ci + 2,7^{**} Ox - 1,8^{**} Ci Ox$	0,91

\*\* Significativo pelo teste F ( $p < 0,01$ )

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

Ci: ácido cítrico, Ox: ácido oxálico, Gl: ácido glicônico