

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PRODUÇÃO DE PELLETS LIVRES E IMOBILIZADOS E
MECANISMO DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS
INORGÂNICOS POR *Aspergillus niger***

Cinthya Babá Barroso
Engenheira Agrônoma

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

2006

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PRODUÇÃO DE PELLETS LIVRES E IMOBILIZADOS E
MECANISMO DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS
INORGÂNICOS POR *Aspergillus niger***

Cinthyá Babá Barroso

Orientador : Prof. Dr. Ely Nahas

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Outubro de 2006

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CINTHYA BABÁ BARROSO – nascida em 14 de janeiro de 1971, em Manaus, Amazonas, é filha de Francisco Gustavo Guedes Barroso e Iranilde Babá Barroso. É engenheira Agrônoma formada pela Universidade Federal do Amazonas, em 1999. Em 2002, obteve o Título de Mestre em Microbiologia, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – UNESP, Jaboticabal, SP. Na mesma Instituição no ano de 2003 iniciou suas pesquisas no Doutorado do Programa de Microbiologia Agropecuária.

DEDICO

Ao meu pai **Francisco Gustavo Guedes Barroso** e a minha mãe **Iranilde Babá Barroso** pelo amor, compreensão, apoio, carinho, incentivo e dedicação, a quem devo minha educação e formação.

Ofereço

As minhas irmãs, irmãos e sobrinhos pelo carinho, incentivo e amizade.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador Prof. Dr. Ely Nahas, pela oportunidade, orientação, paciência, apoio e amizade indispensável para o desenvolvimento desse e outros trabalhos durante o período de seis anos de convivência a quem ofereço o seguinte pensamento:

“Se você quer ter sucesso, procure sempre aprender com os *melhores*. Eles são caros, é verdade, mas ninguém pode ter uma coisa de valor (e não existe nada mais valioso que o conhecimento) sem pagar por isso” – Roberto Shinyashiki.

AGRADECIMENTOS

A **FAPESP**, pela concessão da bolsa de Doutorado e auxílio financeiro, que tornou possível o desenvolvimento e a realização dessa pesquisa.

A **UNESP** de Jaboticabal pela concessão do Laboratório de Microbiologia sob a responsabilidade do Prof. Dr. **Ely Nahas** para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao amigo **Luiz Carlos de Assis**, pelo companheirismo, amizade, paciência e todo o aprendizado adquirido durante o desenvolvimento desse trabalho e de outros trabalhos.

As amigas **Martha Garcia, Thais e Eliane** pela amizade e companhia.

Aos amigos **Thiago, Rodrigo, Ariel e Breno** pelo apoio, amizade e colaboração.

Ao Prof. Dr. **Gener Tadeu Pereira**, pela ajuda e precisão nas análises estatísticas e ao Prof. Dr. **Antonio Carlos Monteiro** pela amizade.

A secretária do Curso de Microbiologia Agropecuária, **Edna Testa** e a colega **Rosângela Andrade** pela ajuda e amizade.

As famílias **Cechi e Salles** pela amizade, carinho, companheirismo e incentivo.

Aos amigos **Maria Madalena, Rogério, Ana Paula e Dalmo** pela amizade, carinho e atenção.

A todos os **colegas**, que direta e indiretamente tornaram possível a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Noberto Prepine Lopes e a Profa. Dra. Carem Rechia pela colaboração.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1. Microrganismos solubilizadores de fosfatos.....	05
2.2. Mecanismo de solubilização.....	07
2.3.Efeito da fonte de C, N e P no mecanismo de solubilização.....	08
2.4. Efeito dos metais e álcoois sobre a solubilização.....	10
2.5. Imobilização de células	12
2.6 Produção de pellets.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 MATERIAL.....	15
3.1.1 Fungo.....	15
3.1.2 Meios de cultura.....	15
3.1.3 Fontes de carbono.....	16
3.1.4 Fontes de nitrogênio.....	17
3.1.5 Metais utilizados.....	17
3.1.6. Álcoois utilizados.....	17
3.1.7 Fosfatos insolúveis utilizados em meio de cultura.....	18
3.1.8 Melaço.....	19
3.2 MÉTODOS.....	20
3.2.1 Obtenção dos esporos do fungo <i>A. niger</i> F111.....	20

3.2.2. Produção de pellets de <i>Aspergillus niger</i> e solubilização de fosfatos inorgânicos em meio de cultura e no solo.....	20
3.2.2.1 Produção de pellets.....	20
3.2.2.2 Efeito do regime de agitação na solubilização de FePO_4 por <i>A. niger</i> na forma de pellets.....	20
3.2.2.3 Influência de concentrações crescentes dos pellets na solubilização dos fosfatos inorgânicos.....	21
3.2.2.4 Influência dos tamanhos dos pellets na solubilização de FePO_4	22
3.2.2.5 Imobilização dos pellets e esporos.....	22
3.2.2.6 Solubilização do FePO_4 por esporos e pellets livres e imobilizados.....	22
3.2.2.7 Atividade respiratória.....	23
3.2.3 Efeito da fonte de carbono e nitrogênio na solubilização de FePO_4 , AlPO_4 e CaHPO_4	24
3.2.4 Efeito de concentrações crescentes de metais na solubilização de fosfatos inorgânicos por <i>A. niger</i>	24
3.2.5 Efeito de concentrações crescentes de metanol e etanol na solubilização de fosfatos inorgânicos por <i>Aspergillus niger</i>	25
3.2.6 Efeito do metanol associado aos metais na solubilização de FePO_4	25
3.2.7 Análises químicas e físico-químicas.....	26
3.2.7.1 Fósforo disponível no solo.....	26
3.2.7.2 Acidez titulável e pH.....	27
3.2.7.3. Fosfato solúvel no meio de cultura.....	27
3.2.7.4. Crescimento fúngico.....	27
3.2.7.5. Crescimento e quantificação dos pellets.....	28
3.2.7.6 Manitol residual.....	28
3.2.7.7 Ácidos orgânicos.....	28

3.2.8 Análise estatística.....	29
4. RESULTADOS.....	30
5. DISCUSSÃO.....	73
6. CONCLUSÕES.....	79
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Microrganismos solubilizadores de fosfato aplicados no solo.....	06
TABELA 2. Concentrações dos metais utilizadas na solubilização de FePO_4 e CaHPO_4 por <i>Aspergillus niger</i>	18
TABELA 3. Minerais fosfatados e sua solubilidade.....	18
TABELA 4. Composição típica do melaço residual.....	19
TABELA 5. Efeito de concentrações crescentes de pellets do fungo <i>Aspergillus niger</i> na solubilização de FePO_4	34
TABELA 6. Efeito de concentrações crescentes de pellets do fungo <i>Aspergillus niger</i> na solubilização de AlPO_4	35
TABELA 7. Efeito de concentrações crescentes de pellets do fungo <i>Aspergillus niger</i> na solubilização de CaHPO_4	36
TABELA 8. Determinação dos pontos máximo e mínimo de solubilização do FePO_4 , produção da acidez titulável, diminuição do pH e biomassa seca, observados na inoculação 0,3 g de pellets de <i>Aspergillus niger</i> em 50 ml de meio de cultura.....	37
TABELA 9. Determinação dos pontos máximo e mínimo de solubilização do AlPO_4 , produção da acidez titulável, diminuição do pH e biomassa seca, observados na inoculação 0,2 g de pellets de <i>Aspergillus niger</i> em 50 ml de meio de cultura.....	38
TABELA 10. Determinação dos pontos máximo e mínimo de solubilização do CaHPO_4 , produção da acidez titulável, diminuição do pH e biomassa seca, observados na inoculação 0,2 g de pellets de <i>Aspergillus niger</i> em 50 ml de meio de cultura.....	39
TABELA 11. Efeito das quantidades crescentes de pellets de <i>Aspergillus niger</i> na solubilização do FePO_4 com 7 dias de incubação.....	40

TABELA 12. Coeficiente de correlação simples entre os valores do FePO_4 solubilizado, acidez titulável, pH e peso seco dos pellets com 7 dias de incubação.....	41
TABELA 13. Efeito das quantidades crescentes dos pellets de <i>Aspergillus niger</i> na solubilização do AlPO_4 com 6 dias de incubação.....	42
TABELA 14. Coeficiente de correlação simples entre os valores do AlPO_4 solubilizado, acidez titulável, pH e peso seco dos pellets com 6 dias de incubação.....	42
TABELA 15. Efeito das quantidades crescentes dos pellets de <i>Aspergillus niger</i> na solubilização do CaHPO_4 com 5 dias de incubação.....	43
TABELA 16. Coeficiente de correlação simples entre os valores do CaHPO_4 solubilizado, acidez titulável, pH e peso seco dos pellets com 5 dias de incubação.....	44
TABELA 17. Influência do tamanho dos pellets de <i>Aspergillus niger</i> na solubilização do FePO_4	44
TABELA 18. Efeito do reuso de pellets e esporos livres e imobilizados de <i>Aspergillus niger</i> na solubilização de FePO_4	46
TABELA 19. Produção de CO_2 por pellets e esporos livres e imobilizados de <i>Aspergillus niger</i>	47
TABELA 20. Efeito das fontes de nitrogênio na solubilização de fosfatos inorgânicos pelo <i>Aspergillus niger</i>	50
TABELA 21. Coeficiente de correlação simples entre os valores do efeito das fontes de nitrogênio no AlPO_4 solubilizado, acidez titulável, pH e micélio.....	51
TABELA 22. Coeficiente de correlação simples entre os valores do efeito das fontes de nitrogênio no FePO_4 solubilizado, acidez titulável, pH e micélio.....	51
TABELA 23. Coeficiente de correlação simples entre os valores do efeito das fontes de nitrogênio no CaHPO_4 solubilizado, acidez titulável, pH e micélio.....	51

TABELA 24. Efeito das fontes de carbono na solubilização de FePO_4 pelo <i>Aspergillus niger</i>	52
TABELA 25. Coeficiente de correlação simples entre os valores do efeito das fontes das carbono do FePO_4 solubilizado, acidez titulável, pH e micélio.....	53
TABELA 26. Efeito das fontes de carbono na solubilização de AlPO_4 pelo <i>Aspergillus niger</i>	54
TABELA 27. Coeficiente de correlação simples entre os valores do efeito das fontes de carbono no AlPO_4 solubilizado, acidez titulável, pH e micélio.....	55
TABELA 28. Efeito das fontes de carbono na solubilização do CaHPO_4 pelo <i>Aspergillus niger</i>	55
TABELA 29. Coeficiente de correlação simples entre os valores do efeito das fontes de carbono no CaHPO_4 solubilizado, acidez titulável, pH e micélio.....	56
TABELA 30. Efeito das concentrações crescentes de Cu^{2+} na solubilização de FePO_4 pelo <i>Aspergillus niger</i>	57
TABELA 31. Efeito das concentrações crescentes de Zn^{2+} na solubilização de FePO_4 pelo <i>Aspergillus niger</i>	57
TABELA 32. Efeito das concentrações crescentes de Fe^{2+} na solubilização de FePO_4 pelo <i>Aspergillus niger</i>	58
TABELA 33. Efeito das concentrações crescentes de Fe^{3+} na solubilização de FePO_4 pelo <i>Aspergillus niger</i>	58
TABELA 34. Efeito das concentrações crescentes de Cu^{2+} na solubilização de CaHPO_4 pelo <i>Aspergillus niger</i>	60
TABELA 35. Efeito das concentrações crescentes de Zn^{2+} na solubilização de CaHPO_4 pelo <i>Aspergillus niger</i>	61

TABELA 36.Efeito das concentrações crescentes de Fe^{2+} na solubilização de CaHPO_4 pelo <i>Aspergillus niger</i>	61
TABELA 37.Efeito das concentrações crescentes de Fe^{2+} na solubilização de CaHPO_4 pelo <i>Aspergillus niger</i>	62
TABELA 38.Efeito da concentrações crescente de metanol na solubilização de FePO_4 pelo <i>Aspergillus niger</i>	63
TABELA 39. Efeito das concentrações crescente de etanol na solubilização de FePO_4 pelo <i>Aspergillus niger</i>	64
TABELA 40.Efeito das concentrações crescente de metanol na solubilização de CaHPO_4 pelo <i>Aspergillus niger</i>	65
TABELA 41. Efeito das concentrações crescente de etanol na solubilização de CaHPO_4 pelo <i>Aspergillus niger</i>	65
TABELA 42.Ácidos orgânicos produzidos pelo <i>Aspergillus niger</i> na solubilização de fosfatos inorgânicos.....	78

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Efeito do meio de cultura na produção de pellets de <i>Aspergillus niger</i>	31
FIGURA 2. Efeito do meio de cultura na produção de massa seca do <i>Aspergillus niger</i>	32
FIGURA 3. Efeito do regime de agitação na solubilização de FePO_4 , utilizando-se pellets produzidos em diferentes meios de cultura....	33
FIGURA 4. Solubilização de FePO_4 por pellets e esporos livres e imobilizados de <i>Aspergillus niger</i>	45
FIGURA 5. Solubilização de FePO_4 por esporos livres ou imobilizados ou pellets de <i>Aspergillus niger</i> inoculados no solo.....	48
FIGURA 6. Consumo de manitol por <i>Aspergillus niger</i> cultivado em meio MS, adicionado de concentrações crescente de metanol.....	67
FIGURA 7. Consumo de manitol por <i>Aspergillus niger</i> cultivado em meio MS, adicionado de concentrações crescente de etanol.....	67
FIGURA 8. Efeito das combinações dos metais na solubilização de FePO_4 pelo <i>Aspergillus niger</i>	68
FIGURA 9. Efeito das combinações dos metais na acidez titulável produzida pelo <i>Aspergillus niger</i> e no pH em meio contendo FePO_4	69
FIGURA 10. Efeito das combinações dos metais e metanol na solubilização e a biomassa do <i>Aspergillus niger</i> em meio contendo FePO_4	71
FIGURA 11. Efeito das combinações dos metais e metanol na acidez titulável produzida pelo <i>Aspergillus niger</i> e no pH em meio contendo FePO_4	72

PRODUÇÃO DE PELLETS LIVRES E IMOBILIZADOS E MECANISMO DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS INORGÂNICOS POR *Aspergillus niger*

RESUMO – Devido a baixa disponibilidade de P no solo e a alta capacidade do fungo *Aspergillus niger* F111 em solubilizar fosfatos inorgânicos, este trabalho teve por objetivo geral avaliar a possibilidade de inocular no solo esporos ou pellets imobilizados com vista a prolongar sua habilidade de solubilização e averiguar o mecanismo de solubilização de fosfatos inorgânicos de Ca, Al e Fe por este fungo. Os pellets inoculados em meio de cultura agitado proporcionaram maior solubilização dos fosfatos, principalmente o fosfato de Fe por ser de baixa solubilidade. No solo, os pellets livres e imobilizados promoveram as maiores solubilizações de fosfato de Fe e maior produção de CO₂. Avaliando-se o efeito da fonte de N, as seguintes proporções foram obtidas na solubilização dos fosfatos de Ca, glicina > Al, nitrato de amônio > Fe, ácido l-glutâmico. Os açúcares que mais solubilizaram os fosfatos foram manitol, maltose e d-galactose. Dentre os metais somente o FeCl₃.6H₂O promoveu maior solubilização do fosfato de Fe e os metais FeSO₄.7H₂O e FeCl₃.6H₂O promoveram maiores solubilizações do fosfato de Ca. As concentrações de álcoois que mais favoreceram a solubilização do fosfato de Fe foram 3 e 4% de etanol e metanol, para o fosfato de Ca foi 3% de etanol. A combinação dos metais com o metanol, indicou que o metanol foi o principal responsável pela solubilização. Fatores como queda do pH, a maior produção de ácidos e o menor crescimento do fungo influíram neste trabalho, principalmente em relação a solubilização do fosfato de Fe. No solo, os pellets solubilizaram quantidades semelhantes de fosfato de Fe que os esporos imobilizados de *A. niger*, podendo ser utilizados com vantagem devido a sua facilidade de obtenção.

Palavras - Chave: ácidos orgânicos, álcoois, fontes de carbono, fontes de nitrogênio, metais, microrganismos solubilizadores

PRODUCTION OF FREE AND IMMOBILIZED PELLETS AND INORGANIC PHOSPHATE SOLUBILIZATION MECHANISM BY *Aspergillus niger*

SUMMARY – Considering the low P availability in the soil and the high capability of *Aspergillus niger* F111 in solubilizing inorganic phosphates, this work aimed to evaluate the possibility of inoculating spores or immobilized pellets in the soil to prolong the solubilization capability and study the solubilization mechanism of inorganic calcium phosphate, aluminum phosphate and iron phosphate by this fungus. Pellets inoculated in culture medium under agitation allowed higher phosphate solubilization, especially iron phosphate, which is low soluble. In the soil, free and immobilized pellets allowed the highest solubilization of iron phosphate and CO₂ production. Evaluating the effect of N sources, the following proportions were obtained in the solubilization of calcium phosphates, glycine > Al, ammonium nitrate > Fe, L-glutamic acid. The sugars that most solubilized phosphates were mannitol, maltose and D-galactose. Among the metals, only FeCl₃·6H₂O promoted higher iron phosphate solubilization, and FeSO₄·7H₂O and FeCl₃·6H₂O promoted higher solubilization of calcium phosphate. The alcohol concentrations that most favored iron phosphate solubilization were 3 and 4% of ethanol and methanol, while the highest solubilization of calcium phosphate was reached with 3% ethanol. The combination of metals with methanol indicated this alcohol was mainly responsible for solubilization. Factors as pH decrease, higher acid production and lower *A. niger* growth influenced the results, especially in the solubilization of iron phosphate. In the soil, pellets and immobilized spores solubilized similar amounts of iron phosphate. Pellets are thus preferable because they are more easily obtained.

Key words: organic acids, alcohols, carbon sources, nitrogen sources, metals, solubilizing microorganisms

I. INTRODUÇÃO

Os solos de regiões tropicais e subtropicais são carentes de P e, por serem ácidos, apresentam alta capacidade de fixação de fósforo, resultando na sua baixa disponibilidade para as plantas, o que restringi a produção de culturas. Para suprir esta carência é necessária a aplicação de fertilizantes fosfatados.

O fósforo ocorre nos solos em quantidades muito variáveis com valores menores que 0,01% de P_2O_5 até valores acima de 0,50%. Isto equivale, para a camada arável, respectivamente de 200 Kg ha⁻¹ até 10.000 Kg ha⁻¹, com pouco significado prático em termos de agricultura (RAIJ, 1986). A aplicação deste nutriente no solo em forma de fertilizantes fosfatados proporciona aumentos na produção agrícola, mas por outro lado, segundo MCLAUGHLIN et al. (1988) muito do P solúvel aplicado como fertilizante reage com os compostos do solo, precipitando-se em fosfatos de ferro e de alumínio.

Porém, existem processos naturais que podem tornar o fósforo disponível, entre os quais, a solubilização microbiana de fosfatos inorgânicos insolúveis já existentes ou adicionados no solo como os fosfatos de rocha. A presença de microrganismos do solo com capacidade de solubilizar fosfatos, pode favorecer a disponibilidade desse elemento para as plantas (BARROSO & OLIVEIRA, 2001). Os microrganismos do solo capazes de solubilizar fosfatos orgânicos e inorgânicos são muito numerosos, e o processo envolve a excreção de ácidos orgânicos ou inorgânicos, na dependência do metabolismo microbiano envolvido (MINHONI et al., 1991).

A solubilização de fosfatos inorgânicos ocorre graças à diminuição do valor de pH ou pela quelatização do metal proporcionada pela produção microbiana de ácidos orgânicos ou inorgânicos liberando fosfato solúvel (SPERBER, 1958a; BARROSO & NAHAS, 2005). Contudo, foi demonstrado que a solubilização de fosfatos pode não estar vinculada apenas à produção de ácidos, dependendo dos mecanismos que envolvem o crescimento microbiano e que favoreçam a excreção de prótons (H⁺) resultantes da assimilação de NH₄⁺ (BEEVER & BURNS, 1980; ROOS & LUCKNER, 1984) ou da produção de H₂CO₃ devido à respiração (JURINAK et al., 1986).

Inúmeras Pesquisas têm sido conduzidas envolvendo um grande número de microrganismos solubilizadores de fosfato, com o objetivo de desenvolver alternativas para a melhoria do suprimento de P para as plantas. A capacidade e o potencial de solubilização variam conforme as fontes de nitrogênio, carbono, fósforo e o microrganismo. Alguns microrganismos podem solubilizar apenas fosfato de cálcio enquanto outros ainda solubilizam fosfato de ferro e de alumínio.

O fungo *Aspergillus niger* tem sido bastante estudado por sua habilidade de produzir ácidos orgânicos, principalmente o ácido cítrico, possibilitando a solubilização de fosfatos orgânicos e inorgânicos como o fosfato de ferro de baixa solubilidade. Pesquisas recentes tem envolvido: 1) a imobilização de células ou esporos de microrganismos com estabelecidas vantagens, principalmente na produção de ácidos orgânicos que é um dos principais mecanismos de solubilização e na proteção das células contra efeitos adversos do meio ambiente ou solo; 2) a utilização de álcoois no meio de cultura para aumentar a produção de ácido cítrico; 3) a adição de concentrações mínimas de metais como Zn, Mn, Fe, Cu e Pb no meio de cultivo para aumentar a produção de ácidos orgânicos no meio de crescimento.

Considerando que, o fungo *Aspergillus niger* F111 isolado neste laboratório (Microbiologia do solo) de um Nitossolo Vermelho, apresentou alta capacidade de solubilizar fosfatos inorgânicos de Ca, Fe e Al em quantidade acima de $1000 \mu\text{g PO}_4^{-3}$ ml de meio de cultura e em mistura solo + areia (1:3) $4,38$ a $7,51 \mu\text{g PO}_4^{-3} \text{g}^{-1}$, a falta de estudo envolvendo o mecanismo de solubilização de fosfatos por este fungo e que poucos estudos foram realizados para verificar a viabilidade de técnicas para introdução de fungos em solos com alta capacidade de retenção de fosfatos este trabalho teve por objetivos:

Gerais:

- 1- Averiguar o mecanismo utilizado por este fungo para solubilizar os fosfatos de Fe, Al e de Ca.

- 2- Avaliar a possibilidade de inocular no solo esporos imobilizados com vista a prolongar sua habilidade de solubilização.

Específicos:

Examinar:

- 1- A utilização de pellets imobilizados ou não em cápsulas de alginato de sódio na solubilização dos fosfatos de Fe, Al e Ca “in vitro”.
- 2- A utilização de pellets produzidos do fungo *A. niger* F111 na solubilização dos fosfatos de Fe, Al e Ca.
- 3- A influência das fontes de N e C na solubilização de fosfatos de Fe, Al e Ca pelo *Aspergillus niger* F111.
- 4- Examinar o efeito dos metais e álcoois sobre a solubilização de Fe e Ca pelo fungo *A. niger* F111.

II. REVISÃO DE LITERATURA

Junto com o nitrogênio, o fósforo (P) é um dos nutrientes mais necessários para a nutrição das plantas, exercendo funções metabólicas estrutural, funcional e de transferência de energia (NAHAS, 1991). A disponibilidade deste nutriente no solo é bastante limitada, não obstante sua ampla distribuição na natureza, havendo a necessidade da aplicação de fertilizantes solúveis para adequado crescimento das plantas (VASSILEV et al., 2001).

Muitas formas de fosfatos insolúveis de cálcio, ferro e alumínio ocorrem no solo (BRADY & WEIL, 2002). O solos brasileiros são reconhecidamente pobres em fosfato disponível ($< 0,5 \mu\text{g P g}^{-1}$ solo seco), sendo que a maior parte do P inorgânico está precipitada na forma de fosfatos de ferro (27 a $158 \mu\text{g P g}^{-1}$ solo seco), de alumínio (1 a $35 \mu\text{g P g}^{-1}$ solo seco) e de cálcio (0 a $19 \mu\text{g P g}^{-1}$ solo seco) (BARROSO & NAHAS, 2005). Em solos ácidos, formas solúveis de Fe, Al e Mg podem reagir com fosfatos tornando-os insolúveis e em solos alcalinos, a disponibilidade do fósforo é determinada pela solubilidade dos fosfatos de cálcio formados (TISDALE et al., 1985).

Segundo ALLEONI (2003), a deficiência de P disponível também está relacionada com a elevada intemperização, lixiviação de bases (Si, Ca, Mg, e Na), precipitação do Fe, Al e Mn como óxidos, hidróxidos e oxihidróxidos de baixa solubilidade e P ligado principalmente aos óxidos de Fe e Al.

No Brasil, alguns solos do cerrado podem fixar até 4.000 kg ha^{-1} de P (KER, 1995). Portanto, como consequência há necessidade de se repor as quantidades de fósforo perdidas, aplicando-se adubos fosfatados para satisfazer as necessidades das plantas, em quantidades que podem chegar a quatro vezes os requerimentos da cultura (GOLDSTEIN, 1986).

Porém existem processos naturais que podem tornar o fósforo disponível, entre os quais, a solubilização microbiana de fosfatos inorgânicos insolúveis já existentes ou adicionados no solo como os fosfatos de rocha.

2.1 Microrganismos solubilizadores de fosfatos

A presença destes microrganismos no solo com capacidade de solubilizar fosfatos de rocha, proporcionando, além das suas necessidades, fosfato solúvel, que é aproveitado pelas plantas foi comprovada na maioria dos solos investigados (KUCEY, 1987; YOUNG, 1990; NAHAS, 1996; SUNDARA et al., 2002).

Em 52 amostras de solos de áreas agrícolas, YAHYA & AL-AZAWI (1989) constataram a presença de mais de 90% de bactérias solubilizadoras de fosfatos, variando de 0,012 a $28,4 \times 10^4$ células g^{-1} solo. Analisando-se a frequência de microrganismos solubilizadores de treze solos do Estado de São Paulo, constatou-se que 7 a 56% do total de bactérias e 8 a 58% do total de fungos solubilizaram fosfato inorgânicos (NAHAS et al., 1994a). Apesar da importância dos microrganismos em disponibilizar fosfato solúvel, deve-se levar em consideração que também possuem forte ação de imobilização do fósforo proveniente da adubação ou da decomposição da matéria orgânica incorporada no solo (MCLAUGHLIN et al., 1988).

Inúmeros autores têm verificado a possibilidade de inoculação de microrganismos solubilizadores na produção de plantas (ASEA et al., 1988; RICHARDSON, 2001; NARLOCH et al., 2002). O efeito da inoculação de *Penicillium bilaji* associado ao fosfato de rocha proporcionou uma produção de matéria seca e absorção de fósforo pela cultura de trigo comparável à produzida pela aplicação de fosfato de amônio (KUCEY, 1987).

A bactéria *Bacillus firmus* produziu maior efeito significativo na produção de arroz quando em combinação com fosfato de rocha, do que produziu em combinação com superfosfato simples, em decorrência de sua habilidade solubilizadora e de produzir o fito-hormônio ácido indol acético (DATTA et al., 1982). WAHID & MEHANA (2000) constataram aumento da produção de trigo (28,9 a 32,8%) e feijão (14,7 e 29,4%), quando os fungos *Aspergillus niger*, *A. fumigatus* e *Penicillium pinophilum* foram inoculados no solo, utilizando-se fosfato de rocha e superfosfato como fonte de fósforo.

BARROSO & NAHAS (2005) selecionaram 33 isolados fúngicos de um Nitossolo Vermelho, sendo que 12 se sobressaíram por sua maior capacidade de solubilização, mas apenas 1 isolado fúngico solubilizou todos os fosfatos inorgânicos (Ca, Fe e Al) em quantidade acima de $1000 \mu g PO_4^{3-} mL^{-1}$ em meio de cultura líquido. JONES et al.

(1991) demonstraram a atividade de dois isolados fúngicos de solo escoceses com capacidade de solubilizar fosfato de ferro. NAHAS & ASSIS (1992) observaram a solubilização de um mineral de fosfato de alumínio (AlPO_4) na proporção de 7,7% do total empregando o fungo *A. niger*. A inoculação de fungos ou bactérias selecionados para solubilização de fosfatos tem sido objeto de estudo de inúmeros autores. A Tabela 1 mostra alguns microrganismos solubilizadores de fosfatos inoculados no solo.

Tabela 1. Microrganismos solubilizadores de fosfato aplicados no solo.

Microrganismos	Fosfato	Referência
<i>Glomus fasciculatum</i>	Fosfato de ferro	(BOLAN et al., 1987)
<i>Penicillium bilaji</i>	Fosfato de rocha Idaho	(ASEA et al., 1988)
<i>Penicillium fuscum</i>		
<i>Pseudomonas striata</i>		
<i>Bacillus polymyxa</i>	KH_2PO_4	(GAIND & GAUR, 1990)
<i>Bacillus subtilis</i>		
<i>Bacillus circulans</i>		
<i>Aspergillus niger</i>		
<i>Bacillus firmus</i>		
	Fosfato de rocha	(DATTA et al., 1992)
	Mussoorie	
<i>Enterobacter</i> sp.	Fosfato de rocha	(CHABOT et al., 1993)
<i>Pseudomonas</i> sp.		
<i>Rhizopus</i> sp.		
<i>Bacillus megaterium</i>	Fosfato tricálcico	(ZAYED, 1997)
<i>Enterobacter</i> sp. e <i>Glomus deserticola</i>	Fluorapatita	(VASSILEVA et al., 1999)
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	Fosfato tricálcico	(PEIX, et al., 2001)
<i>Glomus deserticola</i> e <i>Yarrowia lipolytica</i>	Fluorapatita	(VASSILEV, 2001)
<i>B. megaterium</i> var. <i>phosphaticum</i>	Fosfato de rocha	(SUNDARA et al., 2002)
<i>Penicillium</i> sp.	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	(NARLOCH et al., 2002)
<i>Aspergillus</i> sp.		
<i>Acidithiobacillus</i>	Fosfato de rocha Gafsa	(STAMFORD et al., 2003)
<i>Bacillus megaterium</i>	Fosfato de rocha	(WU et al., 2005)
<i>Bacillus mucilaginosus</i>		
<i>Azotobacter chroococcum</i>		
<i>Glomus mossae</i>		
<i>Glomus intraradices</i>		

2.2 Mecanismos de solubilização

A solubilização decorre da diminuição do pH ou da secreção de metabólitos como ácidos orgânicos e inorgânicos (NAHAS, 1996; NAUTIYAL, 1999). A produção de ácidos orgânicos tem sido considerado um dos principais mecanismos, contudo não somente a quantidade como a natureza do ácido produzido influenciam a solubilização de fosfatos inorgânicos (CUNNINGHAM & KUIACK, 1992). Os ácidos orgânicos secretados pelos microrganismos podem diminuir o pH ou atuam como agentes quelantes dos metais dos fosfatos inorgânicos liberando fosfato solúvel (SALIH et al., 1989; NAHAS, 1991) para a solução do solo (WHITELAW, 2000). De acordo com ILLMER & SCHINNER (1995) pode ocorrer solubilização ainda sem a produção de ácidos, pela liberação de prótons resultantes da assimilação de NH_4^+ .

ASEA et al. (1988) demonstraram a necessidade da presença do NH_4^+ no meio de cultura para aumentar a solubilização de P por *Penicillium bilaji*. Por seus exsudatos as plantas podem favorecer a solubilização de fosfatos insolúveis (HOFFLAND et al., 1989) por um mecanismo que envolve o balanço entre cátions e ânions absorvidos, de modo que, quando há absorção de NH_4^+ pela planta como fonte de N, a mesma mantém sua eletroneutralidade secretando H^+ , diminuindo o pH da rizosfera, e, quando o NO_3^- é absorvido, há secreção de OH^- com elevação do pH (SWART & VAN DIEST, 1987).

O efeito do valor do pH na dissolução de fosfato de rocha pode ser constatado em condições onde a atividade foi restringida. O resultado obtido mostrou que há uma dependência do tempo de reação e uma relação linear entre a quantidade de fosfato solubilizado e a diminuição dos valores do pH do solo (KANABO & GILKES, 1987).

De acordo com NAHAS (1999) aumentando a acidez titulável ocorre diminuição nos valores de pH final, e um aumento da acidez titulável ou uma diminuição nos valores de pH final correspondem a um aumento do teor de fosfato solúvel. No estudo realizado por SESHADRI et al. (2000) envolvendo o crescimento de três linhagens de *Azospirillum halopraeferans* (LMG7107, LMG 7108 e LMG 7109) em dois meios de cultura líquidos, a solubilização do fosfato que variou de 47,19 a 122,54 $\mu\text{g P mL}^{-1}$, foi atribuída à diminuição do pH em decorrência da dissociação dos cátions. Segundo

SAYER et al. (1997), o fungo *A. niger* foi capaz de solubilizar quatro compostos insolúveis de metal, CuO_2 , Pbs , $\text{Mn}(\text{CO}_3)_x$ e CaCO_3 em meio de cultura sólido pela produção de ácidos orgânicos. A produção de ácidos orgânicos e metabólitos varia com as condições do meio, estado fisiológico e o tipo de microrganismo (SILVA FILHO, 1998).

Entre os ácidos orgânicos identificados encontram-se o ácido maléico, cítrico, láctico, oxálico, tartárico, sucínico e glucônico (ILLMER & SCHINNER, 1992; HAQ et al., 2002). A capacidade de *Penicillium rugulosum* em solubilizar fosfatos foi proporcionada pela produção dos ácidos cítrico e glucônico (REYES et al., 2001).

Entre os fungos filamentosos, o *Aspergillus niger* é um dos fungos que tem sido bastante estudado devido a produção de ácido cítrico em escala industrial (PAPAGIANNI & MATTEY, 2004).

2.3 Efeito da fonte de C, N e P no mecanismo de solubilização

Inúmeros fatores influenciam a diminuição do pH ou a produção de ácidos pelos microrganismos como o microrganismo, a fonte de carbono, nitrogênio e micronutrientes (REYES et al., 1999; SILVA FILHO & VIDOR, 2000).

De modo geral, a solubilização aumenta com a absorção de fontes amoniacais e diminui com as nítricas (SILVA FILHO & VIDOR, 2001). LAPEYRIE et al. (1991) constataram que entre dez espécies de fungos ectomicorrízicos, nove solubilizaram fosfatos somente na presença de amônio como fonte de nitrogênio, enquanto uma espécie solubilizou fosfatos no meio com nitrato.

DIXON-HARDY et al. (1998) observaram que a redução da concentração do sulfato de amônio no meio de cultura, resultou na diminuição do crescimento do *Aspergillus niger*, e, quando a concentração de nitrato foi reduzida, houve maior crescimento e solubilização de fosfato.

A interação específica entre fungos micorrízicos arbusculares e bactérias foi capaz de solubilizar fosfatos inorgânico na presença de NH_4^+ como fonte de nitrogênio e este resultado foi relacionado com a mudança no pH do meio de cultura (VILLEGAS & FORTIN, 2001).

DI SIMINE et al. (1998) observaram que *Pseudomonas fluorescens* solubilizou fosfato de zinco utilizando glicose como a única fonte de carbono. XU et al. (1989) testaram várias fontes de C e suas aplicabilidades no processo de produção de ácido cítrico; entre as fontes de C a maltose, sacarose, glicose, manose e frutose foram os açúcares que mais estimularam a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. De acordo com BUZUKOJE & LEDAKOWIEZ (2004), a utilização de frutose como fonte de C pelo *A. niger* foi inibida devido a alta concentração do ácido cítrico no meio de cultura e este provavelmente estava associado com a interferência do ácido sobre o sistema de transporte da frutose.

VORA & SHELAT (1998) constataram que a solubilização de fosfato de rocha por quatro espécies de bactéria e uma levedura foi alta na presença de glicose, sacarose e frutose como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. De acordo com CUNNINGHAM & KUIACK (1992), o ácido cítrico e o ácido oxálico foram produzidos pelo fungo *Penicillium bilaji* em condições de nitrogênio e carbono limitantes.

MINHONI et al. (1991) constataram que entre cinco fonte de matéria orgânica, a glicose foi a fonte que mais ativou o processo microbiano de solubilização do fosfato de rocha. No estudo realizado por SING & AMBERGER (1991) a adição de melaço como fonte de carbono no substrato favoreceu a solubilização de fosfato de rocha durante 60 a 120 dias alcançando um máximo de 24,5%, devido a mineralização do carboidrato do melaço ou do solo pelos microrganismo. O mesmo resultado favorável foi obtido por MINHONI et al. (1991).

Em um estudo com 42 microrganismos (NAHAS, 1996) em meio de cultura líquido, a bactéria *Pseudomonas cepacia* foi a que maior habilidade de solubilização apresentou para todos os fosfatos experimentados. Além do mais, foi a que mais diminuiu o valor de pH e produziu ácidos em todos os fosfatos, exceto nos de cálcio e de Gafsa respectivamente. Com os fungos, as respostas encontradas foram diferentes. Os que apresentaram maior habilidade de solubilização foram *Penicillium implicatum* e *P. purpurogenum*. Contudo, a maior diminuição do pH e produção de ácidos ocorreu quando se utilizou o fungo *Aspergillus ochraceus* em meios de cultura suplementados

com os fosfatos naturais de Araxá e de Patos. Com os fosfatos de cálcio puro e de Gafsa, a maior produção de ácidos ocorreu com o fungo *Penicillium implicatum*. Portanto, nem sempre a maior habilidade de diminuir o pH, de produzir ácidos e de solubilização ocorreu em todos os fosfatos pelos fungos estudados.

A maioria dos trabalhos publicados com referência à investigação dos microrganismos solubilizadores tem utilizado algum tipo de fosfato de cálcio, como as apatitas, predominantemente fluorapatita e hidroxiapatita (MBA, 1997), fosfato tricálcico (SHENBAGARATHAI, 1993), fosfato dicálcico (CUNNINGHAM & KUIACK, 1992) e fosfato de cálcio precipitado “in vitro” (NAHAS et al., 1994a; FREITAS et al., 1997). Além de solubilizarem fosfato de cálcio, esses microrganismos podem também solubilizar fosfato de ferro, de alumínio e outros (ALEXANDER, 1977). O fungo *Penicillium rugulosum* foi capaz de solubilizar mais hidroxiapatita e FePO_4 na presença de sacarose do que glicose e maltose (REYES et al., 1999b).

A solubilidade depende ainda da granulometria do fosfato ou de sua origem, sendo os fosfatos de rocha de origem sedimentar mais solúveis do que os fosfatos de origem ígneas ou metamórfica (HAMMOND et al., 1986). Em adição, o tempo de reação e quantidade de fosfato natural aplicada favorecem a solubilização (RAIJ & VAN DIEST, 1980; KANABO & GILKES, 1987).

2.4 Efeito dos metais e álcoois sobre a solubilização

A produção de ácidos orgânicos por *Aspergillus niger* é influenciada por várias condições ambientais como o pH, metais, concentrações de fosfato, fontes de C e N (TRUMPY & MILLIS, 1963; XU et al., 1989; HAQ et al., 2003). Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de aumentar a produção dos ácidos orgânicos na presença de álcoois (SAHA et al. 1999). YAYKASH et al. (2005) observaram maior produção de ácido cítrico no meio adicionado com 3 e 4% de etanol e metanol. CHAUDHARY et al. (1978) constataram que altas concentrações de etanol ou metanol reduziram o crescimento do *A. niger* e a produção do ácido cítrico.

SAHA et al. (1999) demonstraram que o metanol e etanol produziram o mesmo efeito na produção de ácido cítrico aumentando de 82 e 85% respectivamente em comparação com 49% quando os álcoois não foram usados no meio cultura.

Segundo DEMIREL et al. (2005) o metanol e o etanol melhoram a permeabilidade da membrana celular permitindo o transporte de metabólitos através da membrana. NAVARATNAM et al. (1998) sugeriram que o efeito estimulatório do metanol sobre a produção do ácido cítrico pode ser devido a remoção dos íons de metais pesados presentes como contaminantes no meio. Entre os ácidos orgânicos identificados encontram-se o ácido maléico, cítrico, láctico, oxálico, tartárico, succínico e glucônico (ILLMER & SCHINNER, 1992; HAQ et al., 2002).

Aumento da produção de ácido cítrico foi decorrente da adição de Cu^{2+} enquanto que Mn^{2+} e Fe^{3+} diminuíram a produção (KUBICEK & ROHR, 1977; XU et al., 1989). A adição de Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} ou Fe^{3+} no meio de cultura reduziu a produção de ácido cítrico (INFANTE MAJOLLI & AGUIRRE, 1999). Segundo SAYER et al. (1997), o fungo *A. niger* foi capaz de solubilizar quatro compostos insolúveis de metal, CuO_2 , PbS , $\text{Mn}(\text{CO}_3)_x$ e CaCO_3 em meio de cultura sólido causada pela produção de ácidos orgânicos.

O fungo *A. niger* foi capaz de crescer e solubilizar compostos de metais insolúveis em meio contendo ZnO , $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ e $\text{Co}_3(\text{PO}_4)_2$, produzindo ácidos cítrico e oxálico e demonstrando a capacidade de transformar os metais de compostos inorgânicos insolúveis em compostos orgânicos insolúveis (SAYER & GADD, 1997). Demonstrou-se a solubilização de Cu , Fe e Zn a partir dos óxidos cuproso e cúprico, carbonato cúprico, zinco metálico, óxido ferroso e férrico e pirita, empregando-se o fungo *Penicillium bilaji* (KUCEY, 1988). A solubilização de ZnO e $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ por *Pseudomonas aeruginosa* foi acompanhada pelo aumento da concentração do íon H^+ no meio de cultura, provavelmente uma consequência da produção do ácido 2-ketogluconico (FASIN et al., 2002).

Segundo JAGNOW & DAWID (1991) e INFANTE MAJOLLI & AGUIRRE (1999) a produção de ácidos orgânicos como glucônico, fumárico, cítrico, málico, oxálico e a biomassa miceliana podem aumentar ou diminuir quando pequenas concentrações de

micronutrientes como Zn, Mn, Fe, Ca, Cu e Pb são adicionadas no meio de crescimento.

2.5 Imobilização de células

O emprego de suspensões de células ou esporos de microrganismos é a técnica mais utilizada para inocular microrganismos no solo (CHABOT et al., 1993; PEIX et al., 2001; WU et al., 2005). Seu efeito benéfico é propiciar fosfato solúvel para nutrição das plantas, principalmente em regiões de solos pobres em fósforo ou com reservas limitadas de fertilizantes fosfatados (DAS et al., 2003).

Considerável atenção tem sido dada à produção de metabólitos através da imobilização de células vegetais e animais (DORNENBURG, 2004) e microrganismos (ANGELOVA et al., 1998; COUTO et al., 2004; MANDAL & BANERJEE, 2005). Nos fungos, esta técnica tem sido empregada por meio do encapsulamento de esporos em estudos de produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* (TSAY & TO 1987; DEMIREL et al., 2005).

Muitos microrganismos são capazes de solubilizar fosfato insolúvel em meio de cultura, mas quando inoculados no solo essa capacidade torna-se limitada (RICHARDSON, 2001). Segundo VAN VEEN et al. (1997) isto está relacionado com o declínio da população ou morte do microrganismo inoculado, das suas características fisiológicas, fatores bióticos e abióticos do solo (pH, textura, temperatura e umidade), e a atividade da microbiota nativa.

A imobilização de células ou esporos de microrganismos constitui uma alternativa que proporciona algumas vantagens tais como: 1) não há problema de toxicidade; 2) é biodegradável; 3) fornece adequado crescimento de microrganismos; 4) é estável e possível de secar e esterilizar; 5) pode ser usada mais de uma vez em vários processos; 6) possibilita maior sobrevivência dos microrganismos quando inoculados no solo; 7) oferece vantagens bem estabelecidas envolvendo o sistema microbiano e a produção de ácidos, em relação ao método de utilização de células ou esporos livres (BASHAN, 1998; MOFIDE et al., 2000; WANG, 2000).

Os materiais utilizados são em geral alginatos de sódio, cálcio ou bário, ágar, poliacrilamida e poliuretano (JIANLONG et al., 1999; MOFIDE et al., 2000).

Vesículas intactas e hifas do fungo *Glomus intraradices* encapsulados em alginato de sódio mostraram ser viáveis para inoculação de plantas de alho mesmo após longo tempo de armazenamento (PLENCHETTE & STRULLU, 2003). A imobilização da biomassa micelial tem sido utilizada em estudos de produção de lipases intracelulares por *Rhizomucor miehei* e *Yarrowia lipolytica* (ADAMACZAK & BEDNARSKI, 2004).

VASSILEVA et al. (1999) relataram que o crescimento de *Lactuca sativa* inoculada com células de *Enterobacter* sp. imobilizadas com alginato foi 36% maior do que o respectivo controle inoculado com células livres. A eficiência das células de *Bacillus megaterium* imobilizadas em cápsulas de alginato de sódio foi demonstrada por ZAYED (1997) quando as mesmas foram inoculadas em meio de cultura líquido e em solo esterilizado cultivado com milho. Em ambas condições, as células imobilizadas mostraram alta eficiência, em solo cultivado houve uma solubilização de 93,9 mg P planta⁻¹, aumentando a disponibilidade do fósforo mais do que as células livres que solubilizaram 45 mg P planta⁻¹.

2.6 Produção de pellets

Tem sido constatado nesse laboratório (Câmpus de Jaboticabal) que o fungo *Aspergillus niger* F111 se desenvolve em forma de pequenas pelotas ou pellets com diâmetro variando entre <1 mm com 2 dias a ≥ 5 mm com 4 dias de incubação em meio de Sabouraud sob agitação. Além da produção ser de baixo custo quando comparado com a imobilização de células em cápsulas de alginato, os pellets proporcionaram alta solubilização de fosfatos inorgânicos.

Outro método alternativo está relacionado com a utilização de pellets de fungos filamentosos. INFANTE MAJOLLI & AGUIRRE (1999) observaram o desenvolvimento do fungo *Aspergillus wentii* P1 em forma de pequenas pelotas ou pellets, com aproximadamente 1,5 mm de diâmetro em meio de cultura com agitação e o número de pellets aumentava com o aumento da produção do ácido cítrico. Resultados

semelhantes foram constatados por IWAHORI et al. (1995) que obtiveram a produção de pellets com diâmetro variando entre 2 a 10 mm e produção de ácidos orgânicos utilizando o fungo *Aspergillus niger* como inóculo em meio de Czapek - Dox, durante 5 dias de incubação.

A forma de pellets foi a mais efetiva da biomassa micelial para produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* (HAQ, 2003). De acordo com XU et al. (2000), a produção de pellets de fungos constitui uma forma de imobilização além da vantagem de não necessitar de uma imobilização artificial.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Fungo

O fungo utilizado foi *Aspergillus niger* F111 isolado de um Nitossolo Vermelho, por apresentar alta capacidade em solubilizar fosfatos inorgânicos de ferro, alumínio e de cálcio. O fungo foi liofilizado e encontra-se estocado no Laboratório de Microbiologia do Solo .

3.1.2 Meios de cultura

Meios líquidos usados para avaliar o crescimento e produção de pellets ou desenvolvimento do *Aspergillus niger* F111 com diâmetro variando entre < 1 a ≥ 4 mm.

(a) Malte (DIXON-HARDY et al., 1998)

Extrato de malte	30,0 g
H ₂ O q.s.p	1000 mL
pH	5,5

(b) Sabouraud (MEDVEDEFF et al., 2001)

Peptona	10,0 g
Glicose	40,0 g
H ₂ O q.s.p	1000 mL
pH	7,0

(c) Czapeck (IWAHORI et al., 1995)

NaNO ₃	2,0 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g

K_2HPO_4	1,0 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01 g
Sacarose	30,0 g
H_2O q.s.p	1000 mL
pH	6,0

(d) Meio para solubilização - MS (NAHAS et al., 1994)

NaCl	0,1 g
NH_4Cl	1,0 g
KCl	0,2 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,2 g
Glicose	10,0 g
Extrato de levedura	0,5 g
H_2O q.s.p	1000 mL
pH	7,0

Para cada 50 mL de meio de solubilização foi colocado 1,5 mL de solução de $CaCl_2$ a 10%, e 1 mL de solução de K_2HPO_4 a 10% (esterilizados separadamente), para produzir um precipitado de fosfato inorgânico, $CaHPO_4$ conforme SPERBER (1958), ou 0,1g de $FePO_4$ ou 0,08 g de $AlPO_4$.

3.1.3 Fontes de carbono

As seguintes fontes de carbono foram utilizadas na concentração de 4,0 g C L⁻¹.

- D-arabinose
- D-xilose
- D-frutose
- D-galactose

- D-glicose
- D-manose
- Maltose
- Sacarose
- Amido solúvel
- Manitol

As fontes de carbono foram esterilizadas em autoclave separadamente e adicionadas ao meio antes da inoculação.

3.1.4 Fontes de nitrogênio

As seguintes fontes de nitrogênio foram utilizadas na concentração 262 mg N L⁻¹.

- Cloreto de amônio
- Nitrato de amônio
- Sulfato de amônio
- Nitrato de sódio
- Nitrato de potássio
- Glicina
- Ácido L-glutâmico
- Uréia

3.1.5 Metais utilizados

Foram utilizados os metais FeCl₃.6H₂O, FeSO₄.7H₂O, CuSO₄.5H₂O e ZnSO₄.7H₂O (INFANTE MAJOLLI & AGUIRRE, 1999) nas concentrações especificadas na Tabela 2.

3.1.6 Álcoois utilizados

Foram utilizados metanol e etanol (DEMIREL et al., 2005) nas concentrações de 0 a 6%.

Tabela 2. Concentrações dos metais utilizadas na solubilização de FePO_4 e CaHPO_4 por *Aspergillus niger*.

Fosfatos e Metais	Concentração mg L^{-1}
FePO_4	
Fe^{2+} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,01, 0,02, 0,1 e 0,2
Fe^{3+} ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,01, 0,02, 0,1 e 0,2
Cu^{2+} ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,05, 0,1, 0,5 e 1,0
Zn^{2+} ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,05, 0,1, 0,5 e 1,0
CaHPO_4	
Fe^{2+} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,05; 0,1; 0,5 e 1,0
Fe^{3+} ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,05; 0,1; 0,5 e 1,0
Cu^{2+} ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,05; 0,1; 0,5 e 1,0
Zn^{2+} ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,05; 0,1; 0,5 e 1,0

3.1.7 Fosfatos insolúveis utilizados em meio de cultura

Foram utilizados os fosfatos de alumínio (AlPO_4) e de ferro (FePO_4) e para comparação, o fosfato de cálcio ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Tabela 3).

Tabela 3. Minerais fosfatados e sua solubilidade *.

Composto	Mineral	Solubilidade em água	Solubilidade em ácido	K_{sp}
AlPO_4	Variscita	Insolúvel	Ligeiramente solúvel	$9,84 \cdot 10^{-21}$
$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Brushita	Insolúvel	Ligeiramente solúvel	
FePO_4	Estrengita	Insolúvel	Solúvel (HCl)	$9,91 \cdot 10^{-16}$

*baseado em TISDALE et al. (1985) e LIDE & FREDERIKSE (1998).

3.1.8 Melaço

Utilizou-se melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono contendo aproximadamente 50 a 70% açúcar invertido; é um resíduo da extração de sacarose, proveniente de usina da região, cuja composição encontra-se na Tabela 4.

Tabela 4. Composição típica do melaço residual *.

Componentes	Quantidade %
Matéria sólida	75
Açúcares totais, dos quais:	50 a 70
Sacarose	30 a 40
Açúcares redutores	20 a 25
Açúcares não fermentáveis	3 a 5
Matéria orgânica sem açúcar, da qual:	9 a 12
Gomas solúveis e outros carboidratos	4
Ácidos orgânicos tais como ácidos aconíticos	3
Componentes nitrogenados como proteínas	2 a 3
Cinzas sulfatadas, das quais:	10 a 15
Cloro (Cl)	0,7 a 3,0
Sódio (Na)	0,1 a 0,4
Potássio (K)	1,5 a 5,0
Cálcio (Ca)	0,4 a 0,8
Fósforo (P)	0,6 a 2,0

*SAPTCHENKO (1981).

3.2 MÉTODOS

3.2.1. Obtenção dos esporos do fungo *A. niger* F111

O fungo *Aspergillus niger* F111 foi crescido em tubos contendo meio de Sabouraud inclado, e incubado a 30°C durante 8 dias. Após o crescimento do fungo, foi feita uma suspensão de esporos com concentração $22,3 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$. A quantidade de esporos foi determinada em câmara de Neubauer.

3.2.2 Produção de pellets de *A. niger* e solubilização de fosfatos inorgânicos em meio de cultura e no solo

3.2.2.1 Produção de pellets

Frasco de Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido de Czapeck, Malte, Sabouraud ou Solubilização (MS) acrescido de $0,4 \text{ g P L}^{-1}$ na forma de FePO_4 (MS-FeP), AlPO_4 (MS-AIP), CaHPO_4 (MS-Ca) ou K_2HPO_4 (MS-KP) foram inoculados com 1 mL da suspensão de esporos ($22,3 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$). O microrganismo foi incubado a 30° C com agitação circular (160 rpm) por 4 dias. Os pellets foram separados do meio de cultura por filtração em peneira de 1 mm de malha, lavados com água destilada, contados e secos por 24 h a 105° C para determinação do peso seco.

3.2.2.2 Efeito do regime de agitação na solubilização de FePO_4 por *A. niger* na forma de pellets

Após a produção dos pellets os mesmos foram filtrados com auxílio de funil de Buchner. Os pellets retidos em papel de filtro esterilizado foram lavados com água destilada e esterilizada. Em seguida, foram inoculados na quantidade de 0,2 g peso

úmido em Frascos de Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio MS adicionado de 0,10 g de FePO_4 . O microrganismo foi incubado a 30° C com e sem agitação circular por 4 dias. Foi determinado, a quantidade de fosfato solúvel.

3.2.2.3 Influência de concentrações crescentes dos pellets na solubilização dos fosfatos inorgânicos

Experimento I

Frascos de Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido de Sabouraud foram inoculados com 0,5 mL de uma suspensão com $22,3 \times 10^6$ esporos ml^{-1} e mantidos a 30° C com agitação circular (160 rpm) por 4 dias. Os pellets produzidos foram lavados com água destilada e esterilizada. Após a lavagem, os pellets foram inoculados nas quantidades de 0,2, 0,3 ou 0,4 g peso úmido em frascos de Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio MS acrescido de 0,4 g P L^{-1} de FePO_4 (MS-FeP), AlPO_4 (MS- AIP) ou K_2HPO_4 (MS-KP). O fungo foi incubado com agitação circular (160 rpm) à temperatura de 30 °C por até 8 dias. Diariamente, foram retirados 3 frascos e o meio de cultura foi filtrado em papel de filtro Whatman nº 40. Foram determinados o fosfato solúvel, a acidez titulável, o pH e o crescimento.

Experimento II

Quantidades de 0,2 a 1,0 g peso úmido de pellets produzidos em meio de Sabouraud foram inoculados em 50 mL de meio MS acrescido de 0,4 g P L^{-1} forma de FePO_4 (MS-FeP), AlPO_4 (MS- AIP) ou K_2HPO_4 (MS-KP) e incubados por 7, 6 e 4 dias a 30° C com agitação circular. Após o período de incubação o meio foi filtrado em papel de filtro Whatman nº 42. Foram determinados o peso seco, a acidez titulável, o pH e o fosfato solubilizado.

3.2.2.4 Influência dos tamanhos dos pellets na solubilização de FePO_4

Após incubação em meio de Sabouraud durante 4 dias a 30° C com agitação circular (160 rpm) os pellets foram lavados com água esterilizada e peneirados em peneiras de malhas 1, 2, 3 e 4 mm. Os pellets, separados pelo diâmetro, foram inoculados na quantidade de 6 g L⁻¹ peso úmido em frascos de Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido MS-FeP adicionado de 2 g L⁻¹ na forma de FePO_4 e novamente incubados a 30° C com agitação circular (160 rpm) por até 8 dias. Diariamente, foram retirados 3 frascos e o meio de cultura foi filtrado em papel de filtro Whatman nº 40. Foram determinados o fosfato solúvel, a acidez titulável, o pH e o crescimento.

3.2.2.5 Imobilização dos pellets e esporos

Três ml de uma suspensão com concentração $22,3 \times 10^6$ esporos mL⁻¹ foi misturada em 100 mL de solução de alginato de sódio 3% (w / v) e a mistura foi pipetada em 100 mL de solução CaCl_2 0,5M em agitação por 30 min. Os pellets produzidos em 50 mL de meio Sabouraud (quantidade correspondente a três mL de uma suspensão com concentração $22,3 \times 10^6$ esporos mL⁻¹) foram também adicionados em 100 mL de solução de alginato de sódio 3% (w / v) e a mistura foi pipetada em 100 mL de solução CaCl_2 0,5 M em agitação (VASSILEVA et al., 1998). Depois de consistentes, as cápsulas formadas foram lavadas várias vezes com água esterilizada.

3.2.2.6 Solubilização do FePO_4 por esporos e pellets livres e imobilizados

Frascos de Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio MS e 2 g L⁻¹ de FePO_4 foram adicionados do fungo e incubados a 30° C sob agitação circular (160 rpm). As quantidades inoculadas do fungo foram de 0,5 mL de uma suspensão com $22,3 \times 10^6$ esporos livres ou imobilizados mL⁻¹ ou quantidade correspondente de pellets

livres ou imobilizados produzidos em meio de Sabouraud. Amostras foram analisadas diariamente para a determinação do fosfato solubilizado (AMES, 1966). Após 8 dias de incubação, o meio de cultura foi filtrado e o fungo retido no papel de filtro foi lavado com água esterilizada e transferido para 50 mL de meio de cultura novo em condições assépticas. Novamente, após 8 dias de incubação, o fungo retido na filtração foi transferido para novo meio.

Em frascos com capacidade para 2500 mL, foram colocados 200 g (peso seco) de uma mistura constituída por Nitossolo vermelho + areia (proporção 1:3), misturados com 0,9 mg de $\text{FePO}_4 \text{ g}^{-1}$ de solo seco. O melaço foi adicionado na concentração de $0,02 \text{ mL g}^{-1}$ de solo seco, como fonte de carbono na água de reidratação (esterilizada). O teor de umidade foi equilibrado para 70% da capacidade de retenção de água. Os solos foram inoculados com 1 mL de uma suspensão com 45×10^6 esporos livres ou imobilizados ou quantidade correspondente em cápsulas mL^{-1} , ou quantidade correspondente de pellets livres ou imobilizados produzidos em meio de Sabouraud. Os frascos foram mantidos a 30°C por até 15 dias. Diariamente, a atividade respiratória foi determinada e amostras de 11 g de solo úmido foram retiradas de cada frasco. Estas amostras foram secas em estufa a 45°C e utilizadas para a determinação do fósforo solúvel.

3.2.2.7 Atividade Respiratória

A produção de CO_2 nos frascos que receberam solos inoculados com esporos ou pellets livres e imobilizados foi determinada conforme REZENDE et al. (2004). Em cada frasco com 200 g de amostra (esterilizadas) de terra fina seca ao ar (TFSA), colocaram-se 2 béqueres (esterilizados) de 50 mL, um contendo 20 mL de H_2O destilada e o outro contendo 20 mL de $\text{NaOH } 1 \text{ M}$, vedou-se com parafilme seguido da tampa e incubou-se a 30°C por 15 dias, no escuro. A cada 24 horas retirou-se o bequer contendo $\text{NaOH } 1 \text{ M}$ e titulou-se com $\text{HCl } 1 \text{ M}$. Foram incluídos dois frascos sem solo, somente com os referidos béqueres.

3.2.3 Efeito da fonte de carbono e nitrogênio na solubilização de FePO_4 , AlPO_4 e CaHPO_4

A atividade de solubilização foi determinada em meio líquido (MS) adicionado de AlPO_4 e FePO_4 na quantidade de $1,26 \text{ g PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$ e o CaHPO_4 pela adição de 1,5 mL de solução de CaCl_2 a 10% e 1,0 mL de solução de K_2HPO_4 a 10% (esterilizados separadamente) para cada 50 mL de meio de cultura (SPERBER, 1958).

Quando se avaliou o efeito da fonte de carbono na solubilização dos fosfatos, D-arabinose, D-xilose, D-frutose, D-galactose, D-glicose, D-manose, maltose, sacarose, amido solúvel ou manitol foram utilizados em quantidades de 4 g C L^{-1} . Cada solução com a fonte de carbono foi esterilizada separadamente e adicionada ao meio de cultura antes da inoculação. O efeito da fonte de nitrogênio na solubilização foi avaliado substituindo-se o cloreto de amônio por nitrato de amônio, sulfato de amônio, nitrato de sódio, nitrato de potássio, glicina, ácido l-glutâmico ou uréia em quantidades de 262 mg N L^{-1} . A fonte de carbono utilizada foi a sacarose.

Foram inoculados 2 mL de uma suspensão com $13,4 \times 10^6$ esporos mL^{-1} em 30 mL de meio de cultura contido em frascos de Erlenmeyers de 250 mL. O fungo foi inoculado sem agitação à temperatura de 30°C durante 8 dias. Ao final do período de incubação, o meio de cultura foi filtrado em funil de Buchner e o micélio lavado com uma solução de NaOH ou HCl 0,5 M e água destilada (BARROSO, 2002). Determinou-se o peso seco de micélio em estufa a 105°C por 24 horas.

No filtrado, foram determinados o fosfato solúvel pelo método de Ames (1966), o pH e a acidez titulável pelo método de CERZINE et al. (1988).

3.2.4 Efeito de concentrações crescentes de metais na solubilização de fosfatos inorgânicos por *A. niger*

Frascos de Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido MS foram adicionados de FePO_4 ou CaHPO_4 , nas quantidades anteriormente descritas, e concentrações crescentes de Fe^{2+} , Fe^{3+} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Cu^{2+}

($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e Zn^{2+} ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), conforme relatado na Tabela 2. Após a esterilização do meio de cultura o pH foi ajustado para 7,0. Inoculou-se 0,5 mL de uma suspensão do fungo com concentração $22,3 \times 10^6$ esporos mL^{-1} . A incubação foi realizada sem agitação a 30 °C durante 8 dias. No final do período de incubação, o meio de cultura foi filtrado em funil de Buchner e o micélio lavado com uma solução de NaOH ou HCl 0,5 M e água destilada (BARROSO, 2002). Determinou-se o peso seco de micélio em estufa a 105° C por 24 horas. No filtrado, foram determinados as mesmas variáveis do item acima.

3.2.5 Efeito de concentrações crescentes de metanol e etanol na solubilização de fosfatos inorgânicos por *A. niger*

Frascos de Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido MS foram adicionados FePO_4 ou CaHPO_4 nas quantidades estabelecidas anteriormente. Após a esterilização do meio de cultura, foram adicionados concentrações crescentes de 0 a 6% de metanol ou etanol (v / v), em seguida o pH foi ajustado para 7,0. Foram inoculados 0,5 mL de uma suspensão com concentração $22,3 \times 10^6$ esporos mL^{-1} e mantidos sem agitação a 30° C por 8 dias. No final do período de incubação, o mesmo procedimento foi seguido de acordo com o item 3.2.3, com exceção da determinação dos ácidos orgânicos e o manitol residual no meio de cultura.

3.2.6 Efeito do metanol associado aos metais na solubilização de FePO_4

Frascos de Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio MS foram adicionados com 0,1g de FePO_4 e 0,02 mg L^{-1} de Fe^{2+} e Fe^{3+} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), e 0,05 mg L^{-1} de Cu^{2+} e Zn^{2+} ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Após a esterilização, foram adicionados 2 mL de metanol (concentração final 4%, v/v) e o pH foi ajustado para 7,0. Foi inoculado 0,5 mL de uma suspensão do fungo contendo $22,3 \times 10^6$ esporos mL^{-1} . A incubação foi realizada sem agitação a 30 °C por até 8 dias no

escuro. No final do período de incubação seguiu-se o mesmo procedimento do item 3.2.3.

3.2.7 Análises químicas e físico-químicas

3.2.7.1 Fósforo disponível no solo

Para a determinação do fósforo solúvel aplicou-se o método de WATANABE & OLSEN (1968), modificado. Foi pesado 0,6 g de TFSA em erlenmeyer de 125 mL, acrescentando 12 mL de solução de bicarbonato de sódio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,5, seguido de agitação por 30 minutos (movimento circular). Após a agitação, filtrou-se a solução em papel de filtro Whatman nº 40. A uma alíquota de 2 mL do filtrado, foram adicionados 0,2 mL da solução de ácido sulfúrico 5 mol L^{-1} e 0,8 mL do reagente B, agitando vigorosamente e incubou-se em banho-maria 45°C por 20 minutos. Após a incubação, fez-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda 820 nm. Os cálculos foram efetuados com base numa curva padrão com solução de KH_2PO_4 , contendo $100 \mu\text{g P mL}^{-1}$.

- **Reagente A**

Foi dissolvido 12 g de molibdato de amônio em 250 mL de água desionizada e, em 100 mL de água desionizada dissolveu-se 0,208 g de tartarato de antimônio e potássio. As duas soluções foram adicionadas em 1000 mL de solução de H_2SO_4 5 mol, completando-se o volume para 2000 mL com água desionizada. A solução foi armazenada em frasco de vidro escuro, em geladeira.

- **Reagente B**

Foi dissolvido 1,056 g de ácido ascórbico em 200 mL do reagente A, preparado imediatamente antes do uso, não sendo armazenado por mais de 24 horas.

3.2.7.2 Acidez titulável e pH

Foram determinados titulando-se 10 mL do meio de cultura com solução padrão de NaOH 0,02 M até pH 7,0 (CEREZINE et al., 1988).

3.2.7.3 Fosfato solúvel no meio de cultura

O fosfato solúvel foi determinado pelo método de AMES (1966). Foram adicionados 0,1 mL do sobrenadante em tubo de ensaio, 1,5 mL de água destilada e 1,4 mL da solução R, seguido de agitação. O tubo foi incubado por 20 minutos a 45° C em banho-maria. Em seguida fez-se a leitura em absorbância no espectrofômetro no comprimento de onda 820 nm. Os cálculos foram efetuados com base numa curva padrão com solução de KH_2PO_4 0,0002 mol L⁻¹.

- Solução A

Foi dissolvido 10 g de ácido ascórbico em 100 mL de água desionizada.

- Solução B

Foi dissolvido 1,25 g de molibdato de amônio em 30 mL de água desionizada. A esta solução foi acrescentado 7,3 mL de ácido sulfúrico concentrado, completando-se o volume para 300 mL.

- Solução R

Misturou-se a solução A e a solução B no momento da determinação, na seguinte proporção: 1 parte de A + 6 partes de B.

3.2.7.4 Crescimento fúngico

Quantificou-se o crescimento micelial em termos de massa seca. Após filtração em funil de Buchner, o micélio retido em papel de filtro foi lavado com solução de NaOH

ou HCl 0,5 M e água destilada. O micélio que cresceu em meio com fosfato de Al e de Ca, foi lavado com 50 mL de solução NaOH 0,5 M e com 250 mL de água destilada, e o que cresceu em meio com fosfato de Fe foi lavado com aproximadamente 100 mL de solução de HCl 0,5 M e 300 mL de água destilada, por ser o fosfato de Fe mais insolúvel que os demais e para a remoção de todas as partículas de fosfato aderidos ao micélio. Em seguida os mesmos foram colocados em estufa a 105°C por 24 horas. Determinou-se o peso seco de micélio descontando-se o peso seco do papel de filtro.

3.2.7.5 Crescimento e quantificação dos pellets

Os pellets foram passados em peneiras com malhas de 1, 2, 3 e 4 mm e lavados com água destilada, em seguidas contados e colocados para secar em estufa a 105° C para a determinação da massa seca.

3.2.7.6 Manitol residual nas seguintes condições experimentais:

O manitol residual foi determinado pelo método de Cromatografia Líquida de Altoeficiência, usando o aparelho HPLC, Waters equipado com bomba mod. 510, detector de índice de refração mod. R401, coluna : aminex HPX – 87 H (300 x 7,8 mm). Fase móvel – ácido sulfúrico 0,004 mol / L⁻¹, fluxo – 0,6 mL / min. a temperatura de 35° C, padrão manitol: 1 mg mL⁻¹ e as amostras diluídas 1:10 por injeção.

A análise foi realizada no laboratório da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Ribeirão Preto.

3.2.7.7 Ácidos orgânicos

A determinação qualitativa dos ácidos orgânicos foi realizada utilizando o método de Cromatografia gasosa Hewlett Packard, modelo 5890 série II, equipado com detector de ionização de chama, coluna HP-5 (5% fenil metil silicone) de 30 cm x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura da fase. A temperatura inicial da coluna foi 50°

C, permanecendo por 2 minutos, subindo a 8° C por minuto até 250 °C, subindo hora e a 15 °C por minuto até 280° C. A temperatura detector FID foi de 300° C e a temperatura injetor 240° C no modo split. O gás arraste foi hidrogênio a 42 cm por segundo (250 °C) e o Split 1:50

Ácidos orgânicos padrões foram oxálico, succínico, láctico, málico, tartárico, cítrico e glutâmico. Os padrões foram submetidos ao processo de metilação através de uma solução eleico diazometano e analisados sob a forma de metil esterres. As retenções relativas desses ácidos foram obtidos com a utilização de um padrão de referência salicilato de metila.

Metilação das amostras – As amostras foram secas e os ácidos extraídos em ultra-som por 10 minutos com pequena quantidade de metanol. Após a extração, foi realizada a centrifugação, retirando-se o metanol (camada superior) e levando-se a secura total sob N₂ à temperatura ambiente. Ao extrato seco foi adicionado a solução eleica de diazometano até não se observar mais a liberação de gases. As amostras foram evaporadas até secura sob N₂, ressuspensa-solubilizadas com diclorometano e analisadas no GC (Cromatógrafo a Gás) para obtenção das retenções relativas, utilizando também como padrão de referência o salicilato de metila.

A análise foi realizada no laboratório da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Ribeirão Preto.

3.2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os ensaios foram analisados segundo o delineamento experimental inteiramente casualizado com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e análise de regressão. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Para toda a análise estatística foi utilizado o programa **SAS**.

IV. RESULTADOS

4.1 Efeito do meio de cultura na produção de pellets por *A. niger*

Diferentes meios de cultura foram examinados para o crescimento de *Aspergillus niger* utilizando-se culturas agitadas em frascos erlenmeyer (Figura 1) O número de pellets formados variou de 2,34 a 491,04 mL⁻¹ de meio de cultura, porém a maior produção foi observada no meio de Solubilização adicionado com CaHPO₄ com 491,04 pellets.

A produção de massa seca micelial variou de 0,8 a 4,6 mg mL⁻¹ de meio de cultura (Figura 2). A maior quantidade de pellets foi obtida no meio MS adicionado de CaHPO₄, porém as maiores quantidades de massa seca micelial foram encontradas nos meios de Sabouraud e MS adicionado de FePO₄, CaHPO₄ ou AlPO₄. Nestes tratamentos as produções de massa seca foram significativamente iguais.

4.2 Efeito do regime de agitação na solubilização de FePO₄ *A. niger* na forma de pellets

A capacidade e o potencial de solubilização dos pellets formados nos meios de Sabouraud e MS adicionado de FePO₄, AlPO₄ ou CaHPO₄ foram testados em meio MS adicionado com 0,1 g de FePO₄, incubados com e sem agitação (Figura 3). Em meio de cultura agitado, foram obtidas as quantidades de 300 a 836,89 µg PO₄³⁻ mL⁻¹ e, a maior quantidade de fosfato solubilizado foi obtida no meio inoculado com pellets formados no meio de Sabouraud.

Em cultura estacionária, a quantidades de fosfato solubilizado variaram de 27,64 a 178,45 µg PO₄³⁻ mL⁻¹, representando um decréscimo de 64% em relação a quantidade obtida no meio agitado.

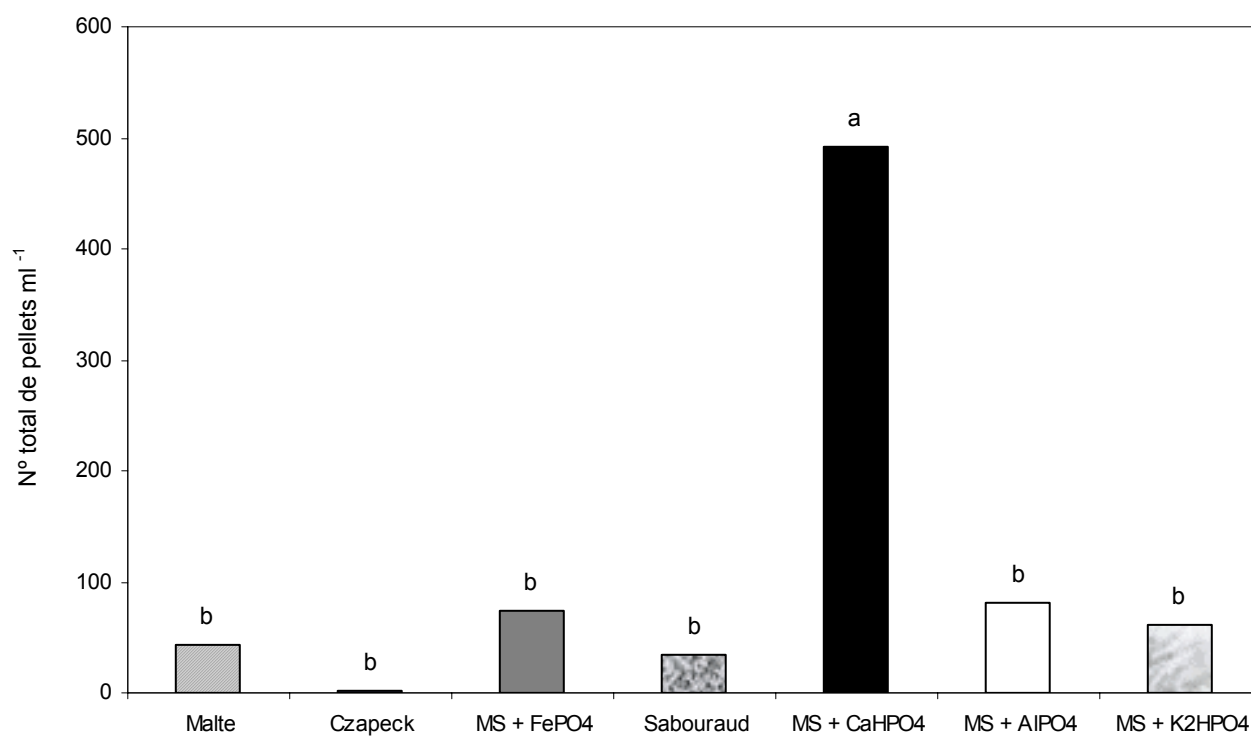


Figura 1. Efeito do meio de cultura na produção de pellets de *Aspergillus niger*. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre o número de pellets, conforme o valor LSD ($p < 0,05$).

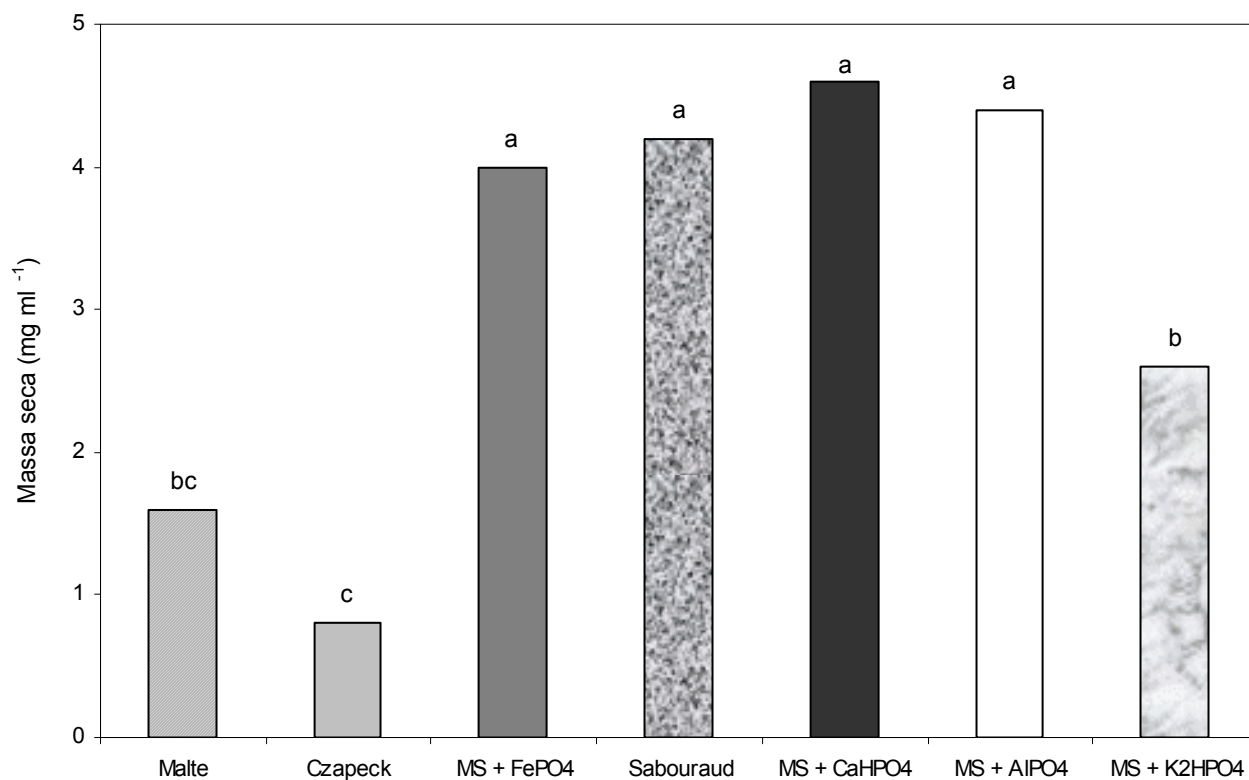


Figura 2. Efeito do meio de cultura na produção de massa seca do *Aspergillus niger*. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre a quantidade de massa seca, conforme o valor LSD ($p < 0,05$).

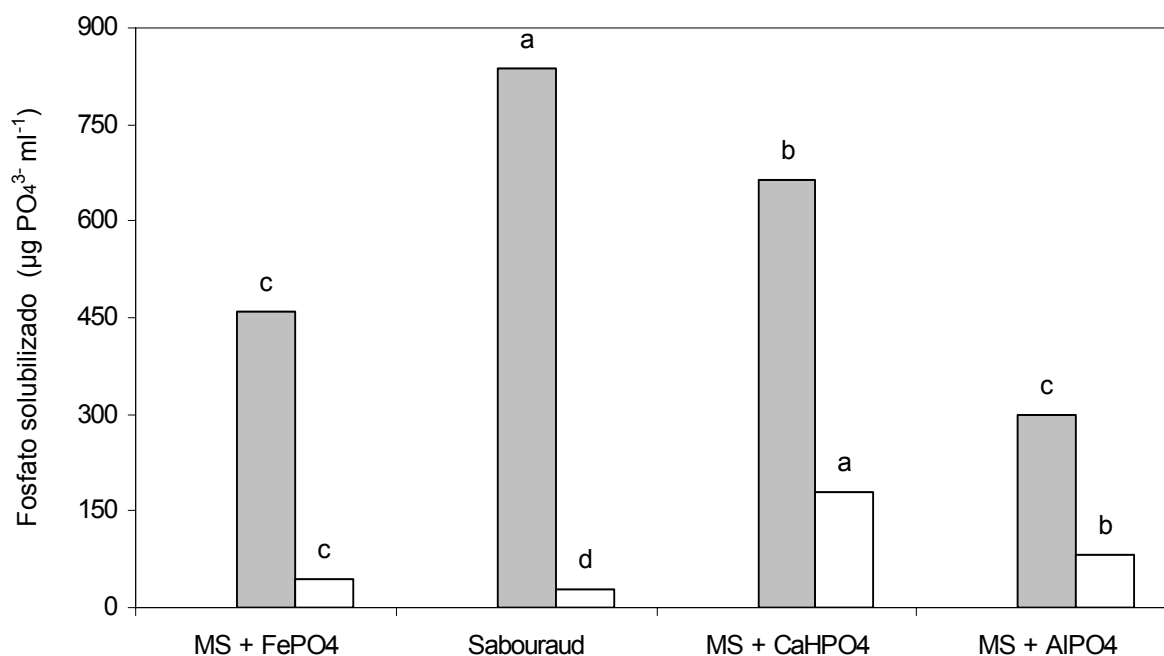


Figura 3. Efeito do regime de agitação sobre a solubilização de FePO₄, utilizando-se pellets produzidos em diferentes meios de cultura. Solubilização com agitação e sem agitação . Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre a quantidade de fosfato solubilizado, conforme o valor LSD ($p < 0,05$).

4.3 Efeito de concentrações crescentes de pellets do *Aspergillus niger* na solubilização de fosfatos insolúveis

Quando concentrações crescentes de pellets de *A. niger* foram incubados no meio MS adicionado de FePO₄ por até 8 dias, as maiores quantidades de fosfato solubilizado, de produção de ácidos e diminuição do pH foram encontrados quando se utilizou um inóculo de 0,3 g pellets (Tabela 5). Com esta quantidade de inóculo, também foram obtidos a menor produção de massa seca.

No meio de cultura adicionado de AlPO₄ (Tabela 6), as maiores quantidades de fosfato solubilizado, acidez titulável e menor valor de pH final foram observados com 0,2 g de pellets por 50 mL de meio. No entanto a produção da biomassa foi maior na concentração 0,4 g de pellets.

Tabela 5. Efeito de concentrações crescentes de pellets do fungo *Aspergillus niger* na solubilização FePO_4 .

Inóculo (g. pellets peso úmido)	Tempo de incubação (dias)								
	0	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°
Fosfato solubilizado ($\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$)									
0,2	0,89A	0,00A	115,64A	367,47C	795,28C	814,75C	749,87C	1135,51C	1071,85B
0,3	0,89A	0,0A	52,38C	429,10B	860,57B	1052,79 ^A	1222,29A	1253,11A	1323,67A
0,4	0,89A	0,00A	79,96B	534,13A	974,12A	986,28B	1175,66B	1212,15B	1060,49B
Acidez titulável (mg NaOH mL^{-1})									
0,2	0,00A	0,19B	1,19B	1,71B	1,80B	1,79B	1,77B	1,69B	1,72A
0,3	0,00A	0,09A	1,98A	2,03A	1,95A	2,16 ^A	2,24A	2,03A	1,98A
0,4	0,00A	0,12C	1,16C	1,28C	1,55C	1,28C	1,37C	1,27C	1,27B
pH									
0,2	7,0A	2,9A	2,2A	2,1A	2,0A	2,0A	2,0A	2,1A	2,1A
0,3	7,0A	3,1A	1,8B	1,8B	1,8B	1,8B	1,8B	1,8B	1,8B
0,4	7,0A	3,0A	1,8B	1,8B	1,7C	1,8B	1,8B	1,8B	1,8B
Biomassa seca (mg mL^{-1})									
0,2	0,60A	2,07A	3,73A	3,93A	4,20A	4,07A	3,93A	3,60A	3,53A
0,3	0,60A	1,13B	3,00B	3,60A	3,47B	3,47A	3,07B	3,13B	3,20A
0,4	0,60A	1,00B	3,07B	3,73A	3,80AB	3,53A	3,47A	3,53A	3,27A

Médias com letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Tabela 6. Efeito de concentrações crescentes de pellets do fungo *Aspergillus niger* na solubilização de AlPO_4 .

Inóculo (g. pellets peso úmido)	Tempo de incubação (dias)								
	0	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°
Fosfato solubilizado ($\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$)									
0,2	0,77A	146,30C	784,17A	885,55A	1085,4A	969,09 ^A	988,55A	964,63A	998,69A
0,3	0,77A	242,81A	525,45B	646,70B	804,04B	815,80B	822,70B	858,79B	821,89C
0,4	0,77A	177,93B	500,31C	531,94C	748,49C	810,94B	814,18B	815,40C	877,44B
Acidez titulável (mg NaOH mL^{-1})									
0,2	0,02A	0,76A	1,78A	2,40A	2,03A	2,04A	2,03A	2,14A	2,06A
0,3	0,02A	0,34B	1,40B	1,56B	1,65B	1,65B	1,34B	1,39B	1,66B
0,4	0,02A	0,26C	1,46B	1,65B	1,68B	1,47B	1,44B	1,51B	1,71B
pH									
0,2	6,5A	2,7B	2,3A	2,1B	2,0B	1,7C	1,9B	1,9B	1,9B
0,3	6,5A	2,8B	2,4A	2,3A	2,2A	2,2B	2,4A	2,4A	2,2A
0,4	6,5A	3,0A	2,3A	2,2B	2,2A	2,3A	2,4A	2,3A	2,1A
Biomassa seca (mg mL^{-1})									
0,2	0,60A	1,33B	2,80B	3,40AB	3,80A	3,40A	3,07B	3,47A	3,87A
0,3	0,60A	2,07A	2,73B	3,07B	3,27B	2,93B	2,93B	2,87B	2,80B
0,4	0,80A	2,87A	3,07A	3,47A	4,00A	3,20A	3,60A	3,60A	3,87A

Médias com letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Quando foi utilizado CaHPO_4 (Tabela 7) no meio de cultura a solubilização do fosfato aumentou de 68,34 para 1367,66 $\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$, com 100% de solubilização no 5° dia de incubação. A maior produção de ácidos e o menor valor do pH final foram

obtidos com a concentração 0,2 g de pellets por 50 mL de meio de cultura. Com a quantidade de 0,4 g de pellets foi obtida a maior produção da biomassa.

Tabela 7. Efeito de concentrações crescentes de pellets do fungo *Aspergillus niger* na solubilização de CaHPO_4 .

Inóculo (g. pellets peso úmido)	Tempo de incubação (dias)								
	0	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°
Fosfato solubilizado ($\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$)									
0,2	68,34A	671,76A	817,10A	834,58A	879,56A	1367,66A	748,58B	862,53A	854,01A
0,3	68,34A	396,82C	671,12B	638,31C	689,78C	1231,00B	674,37C	682,89C	776,16B
0,4	68,34A	565,92B	669,90B	799,70B	742,50B	1233,84B	757,91A	815,49B	772,51B
Acidez titulável (mg NaOH mL^{-1})									
0,2	0,05A	0,63A	0,86B	1,07A	1,07A	1,07A	0,82A	0,43B	0,78B
0,3	0,05A	0,64A	0,86B	0,86C	0,86C	0,85C	0,19C	0,78A	0,86A
0,4	0,05A	0,59B	0,93A	0,93B	0,93B	0,93B	0,72B	0,30C	0,67C
pH									
0,2	5,7A	3,9A	2,5A	1,6C	1,7B	1,5C	2,2C	1,6C	2,2B
0,3	5,7A	3,9A	2,5A	2,3B	2,5A	2,5B	2,8B	3,2A	3,4A
0,4	5,7A	3,9A	2,5A	2,4A	2,5A	2,7A	3,2A	2,9B	3,5A
Biomassa seca (mg mL^{-1})									
0,2	0,60A	1,67A	3,87B	4,73A	4,20B	4,60B	4,07B	3,73C	3,73B
0,3	0,60A	1,80A	4,87A	4,40A	4,73A	5,27A	4,73A	4,67B	4,20A
0,4	0,80A	1,80A	5,00A	4,93A	5,00A	4,87B	4,60A	5,20A	4,20A

Médias com letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

As Tabelas de 8 a 10 apresentam os resultados da análise de variância para se determinar o ponto máximo e mínimo da solubilização dos CaHPO_4 , AlPO_4 e FePO_4 utilizando pellets do fungo *A. niger* nas quantidades de 0,2, 0,3 e 0,4 g por 50 mL de meio de cultura.

Tabela 8. Determinação dos pontos máximos e mínimos de solubilização do FePO_4 , produção da acidez titulável, diminuição do pH e biomassa seca, observados na inoculação 0,3 g de pellets de *Aspergillus niger* em 50 ml de meio de cultura.

Aspergillus niger em 50 ml de meio de cultura.							
		Máximo		Mínimo		R ²	F
Variáveis	Equações	Dias	Valores	Dias	Valores		
Fosfato							
(µg PO ₄ ³⁻ mL ⁻¹)	Y= - 93,99 + 200,19x					0,93	325,05**
	Y= -165,01 + 261,06x - 7,61x ²	17,16	2074,22			0,94	173,95**
	Y= - 9,46 – 74,12x + 103,50x ² - 9,26x ³	7,07	1367,86	0,37	-23,19	0,98	434,60**
NaOH	Y= 0,63 + 0,24x					0,55	30,60**
(mg mL ⁻¹)	Y= - 0,10 + 0,86x - 0,08x ²	5,53	2,30			0,85	68,05**
	Y= - 0,24 + 1,17x - 0,18x ² + 0,01x ³	5,09	2,16	9,07	1,92	0,87	49,67**
	Y= 4,14 - 0,41x					0,42	18,25**
pH	Y= 5,70 - 1,74x + 0,17x ²			5,22	1,16	0,78	43,51**
	Y= 6,57 - 3,62x + 0,79x ² - 0,05x ³	6,63	2,16	3,50	1,35	0,95	141,10**
Biomassa seca	Y= 2,00 + 0,32x					0,49	24,21**
(mg mL ⁻¹)	Y= 0,83 + 1,33x - 0,13x ²	5,29	4,34			0,87	79,22**
	Y= 0,39 + 2,28x - 0,44x ² + 0,03x ³	4,06	4,13	7,12	3,76	0,94	131,01**

**, significativo ($p < 0,01$)

Tabela 9. Determinação dos pontos máximos e mínimos de solubilização do AlPO_4 , produção da acidez titulável, diminuição do pH e biomassa seca, observados na inoculação 0,2 g de pellets de *Aspergillus niger* em 50 ml de meio de cultura.

Variáveis	Equações	Máximo		Mínimo		R^2	F
		Dias	Valores	Dias	Valores		
Fosfato	$Y = 362,50 + 115,39x$					0,63	43,00**
$(\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1})$	$Y = 43,07 + 389,18x - 34,22x^2$	5,69	1149,46			0,92	134,25**
	$Y = -27,24 + 540,69x - 84,45x^2 + 4,19x^3$	5,25	1089,41	8,20	1035,76	0,94	115,43**
NaOH	$Y = 0,87 + 0,21x$					0,52	26,71**
(mg mL^{-1})	$Y = 0,18 + 0,80x - 0,04x^2$	5,39	2,34			0,86	74,42**
	$Y = -0,09 + 1,39x - 0,27x^2 + 0,02x^3$	4,11	2,19	6,95	2,01	0,94	112,94**
	$Y = 4,05 - 0,37x$					0,45	20,37**
pH	$Y = 5,35 - 1,49x + 0,14x^2$			5,32	1,39	0,78	42,31**
	$Y = 6,05 - 2,99x + 0,64x^2 - 0,04x^3$	6,51	2,03	3,70	1,57	0,90	79,79**
Biomassa seca	$Y = 2,12 + 0,30x$					0,44	19,58**
(mg mL^{-1})	$Y = 0,82 + 1,42x - 0,14x^2$	5,09	4,43			0,91	121,21**
	$Y = 0,48 + 2,17x - 0,39x^2 + 0,02x^3$	4,23	4,26	8,25	3,60	0,96	175,71**

**, significativo ($p < 0,01$).

Tabela 10. Determinação dos pontos máximos e mínimos de solubilização do CaHPO_4 , produção da acidez titulável, diminuição do pH e biomassa seca, observados na inoculação 0,2 g de pellets de *Aspergillus niger* em 50 ml de meio de cultura.

Variáveis	Equações	Máximo		Mínimo		R^2	F
		Dias	Valores	Dias	Valores		
Fosfato	$Y = 515,28 + 68,52x$					0,32	11,57**
$(\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1})$	$Y = 202,26 + 336,82x - 33,56x^2$	5,02	1047,93			0,71	28,75**
	$Y = 120,85 + 512,25x - 91,69x^2 + 4,85x^3$	4,18	1013,91	8,44	826,27	0,74	22,18**
NaOH	$Y = 0,61 + 0,04x$					0,09	2,36 ^{NS}
(mg mL^{-1})	$Y = 0,20 + 0,39x - 0,04x^2$	4,42	1,06			0,72	31,59**
	$Y = 0,02 + 0,77x - 0,17x^2 + 0,01x^3$	3,24	1,09	7,60	0,65	0,89	60,61**
	$Y = 3,97 - 0,36x$					0,49	24,31**
pH	$Y = 5,33 - 1,53x + 0,15x^2$			5,23	1,34	0,91	128,17**
	$Y = 5,75 - 2,42x + 0,44x^2 - 0,02x^3$	7,71	2,06	4,25	1,56	0,97	246,49**
Biomassa seca	$Y = 2,20 + 0,32x$					0,39	15,65**
(mg mL^{-1})	$Y = 0,72 + 1,59x - 0,16x^2$	4,99	4,68			0,88	91,34**
	$Y = 0,32 + 2,44x - 0,44x^2 + 0,02x^3$	8,37	3,62	4,12	1,56	0,93	109,49**

NS, não significativo; **, significativo ($p < 0,01$)

Os valores do coeficiente de determinação (R^2) indicaram que a regressão polinomial do 3º grau é a que mais se ajusta aos valores dos tratamentos, por que o valor está mais próximo de 1. O teste F foi significativo (Tukey $p < 0,01$) 1% de probabilidade, indicando que entre os tratamentos há diferenças. Os valores dos pontos de máxima, indicaram que a solubilização dos AlPO_4 e FePO_4 (Tabela 8 e 9) ocorreram no 7º e 6 dia de incubação e do CaHPO_4 (Tabela 10) ocorreu no 5º dia de incubação.

Considerando os resultados obtidos nas Tabelas 8 a 10 procedeu-se a realização de outra séries de ensaios (Tabelas 11, 13 e 15) com objetivo de averiguar o período de maior solubilização dos fosfatos inorgânicos promovida pelos pellets do *A. niger*.

O crescimento do fungo (Tabela 11) proporcionado pela inoculação de quantidade crescentes de pellets variou de 4,23 a 8,84 mg mL^{-1} , sendo que a maior

produção de massa seca foi obtida com 1,0 g de pellets por 50 mL de meio de cultura. A produção de acidez titulável variou de 0,59 a 1,01 mg NaOH mL⁻¹. A maior quantidade de ácidos produzidos foi de 1,01 mg NaOH mL⁻¹ na quantidade 0,2 g de pellets. O valor do pH inicial diminuiu de 7,0 para 2,0, permanecendo quase constante. A maior solubilização do FePO₄ foi 528,45 µg PO₄³⁻ mL⁻¹ (Tabela 11).

De acordo com os dados de correlação simples (Tabela 12) entre os parâmetros estudados, a solubilização e a acidez titulável não se correlacionaram com pH.

Tabela 11. Efeito das quantidades crescentes de pellets de *Aspergillus niger* na solubilização do FePO₄ com 7 dias de incubação.

Quantidade de Inóculo - peso úmido (g / 50 ml)	Crescimento peso seco (mg mL ⁻¹)	Acidez titulável (mg NaOH mL ⁻¹)	pH	Fosfato solubilizado (µg PO ₄ ³⁻ mL ⁻¹)
0,2	4,23 E	1,01 A	2,1 CB	528,45 A
0,3	5,34 D	0,61 F	2,1 CB	162,68 E
0,4	6,37 C	0,66 F	2,1 D	21,56 H
0,5	6,14 C	0,81 C	2,0 D	135,92 F
0,6	6,35 C	0,74 D	2,0 D	189,57 C
0,7	7,35 B	0,66 F	2,1 CD	160,25 E
0,8	7,29 B	0,59 G	2,2 A	169,98 D
0,9	7,62 B	0,70 E	2,2 A	107,94 G
1,0	8,84 A	0,87 B	2,3 A	235,67 B

Médias com letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey 5% de probabilidade.

Tabela 12. Coeficiente de correlação simples entre os valores do FePO_4 solubilizado, acidez titulável, pH e peso dos pellets com 7 dias de incubação.

Variáveis	Fosfato solubilizado	Acidez titulável	pH	Peso dos pellets
Fosfato solubilizado		0,821 **	0,189 ns	-0,419 *
Acidez titulável			0,047 ns	-0,276 **
pH				-0,561 **

*, significativo ($p < 0,05$); **, significativo ($p < 0,01$); ns , não significativo.

A Tabela 13 apresenta os resultados da utilização do AlPO_4 como fonte de fósforo no meio de cultura. O maior crescimento foi $9,24 \text{ mg mL}^{-1}$ peso seco na quantidade 1,0 g de pellets por 50 mL. As maiores produções de ácidos foram obtidas nas quantidades de 0,2 e 0,3 g de pellets, sem diferença significativa entre as dois tratamentos. O pH variou de 2,3 a 3,1, sendo obtidos menores pH nos tratamentos com quantidades 0,2, 0,3 e 0,5 g de pellets. A maior solubilização do fosfato foi $769,79 \mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$.

O resultado de coeficiente de correlação simples (Tabela 14) entre as variáveis estudadas indicaram que entre a quantidade do AlPO_4 solubilizado e a acidez titulável não houve correlação, ou seja, uma variável não sofre influência da outra. A acidez titulável também não se correlacionou com o pH e o peso dos pellets.

Analisando os resultados da Tabela 15, verificou-se que o maior crescimento do fungo e a maior solubilização do CaHPO_4 foram obtidos na quantidade de 1,0 g de pellets. A produção de acidez titulável foi maior nas concentrações 0,2 e 0,5 g de pellets, entre estes tratamentos não houve diferença significativa. Os menores valores do pH final foram observados na concentrações de 0,2 a 0,5 g de pellets.

Tabela 13. Efeito das quantidades crescentes dos pellets de *Aspergillus niger* na solubilização do AlPO_4 com 6 dias de incubação.

Quantidade de inóculo-peso úmido (g / 50 mL)	Crescimento peso seco (mg mL ⁻¹)	Acidez titulável (mg NaOH mL ⁻¹)	pH	Fosfato Solubilizado (µg PO ₄ ³⁻ mL ⁻¹)
0,2	4,70 G	1,48 A	2,3 D	747,08 B
0,3	4,30 H	1,42 A	2,3 D	769,79 A
0,4	5,73 E	0,71 B	2,8 BC	609,21 D
0,5	5,30 F	0,13 C	2,3 D	742,62 B
0,6	6,64 D	0,76 B	2,9 BAC	577,58 E
0,7	7,52 C	0,76 B	2,9 BAC	715,04 C
0,8	7,68 C	0,66 B	2,7 C	416,18 F
0,9	8,76 B	0,77 B	3,1 A	404,01 G
1,0	9,24 A	0,75 B	3,1 A	374,01 H

Médias com letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey 5% de probabilidade.

Tabela 14. Coeficiente de correlação simples entre os dados do AlPO_4 solubilizado, acidez titulável, pH e peso dos pellets com 6 dias de incubação.

Variáveis	Fosfato solubilizado	Acidez titulável	pH	Peso dos pellets
Fosfato solubilizado		0,286 ns	-0,726 **	-0,866 **
Acidez titulável			-0,284ns	-0,377 ns
pH				0,857 **

**, significativo ($p < 0,01$); ns , não significativo.

Tabela 15. Efeito das quantidades crescentes dos pellets de *Aspergillus niger* na solubilização do CaHPO_4 com 5 dias de incubação.

Quantidade de inóculo - peso úmido (g / 50 mL)	Crescimento peso seco (mg mL ⁻¹)	Acidez titulável (mg NaOH mL ⁻¹)	pH	Fosfato solubilizado ($\mu\text{g PO}_4^{3-}$ mL ⁻¹)
0,2	4,93 E	0,88 A	2,5 D	736,01 D
0,3	4,27 F	0,82 B	2,5 D	740,88 D
0,4	5,40 D	0,82 B	2,5 D	755,07 C
0,5	5,47 D	0,89 A	2,5 D	766,42 B
0,6	5,40 D	0,83 B	2,6 C	717,76 C
0,7	6,27 C	0,78 D	2,7 B	773,32 B
0,8	7,20 B	0,71 F	2,9 A	753,45 C
0,9	7,53 B	0,80 C	2,8 B	693,43 F
1,0	8,13 A	0,74 E	2,7 B	790,75 A

Médias com letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey 5% de probabilidade.

Os coeficientes de correlação simples entre as variáveis estudadas (Tabela 16), mostraram que não houve correlação entre o fosfato solubilizado e a acidez titulável, o pH e o peso dos pellets.

4.4 Influência dos tamanhos dos pellets na solubilização de FePO_4

O efeito da incubação de tamanhos crescentes de pellets (< 1 a > 4mm) na solubilização de fosfato foi avaliado (Tabela 17). A quantidade de fosfato solubilizado e a produção de ácidos aumentaram com o aumento do diâmetro dos pellets, porém, a produção de biomassa e o pH do meio de cultura foram decrescentes.

Tabela 16. Coeficiente de correlação simples entre os valores do CaHPO_4 solubilizado, acidez titulável, pH e peso dos pellets com 5 dias de incubação.

Variáveis	Fosfato solubilizado	Acidez titulável	pH	Peso dos pellets
Fosfato solubilizado		-0,269 ns	0,032 ns	0,162 ns
Acidez titulável			-0,880 **	-0,719 **
pH				0,815 **

**, significativo ($p < 0,01$); ns , não significativo.

Tabela 17. Influência do tamanho dos pellets de *Aspergillus niger* na solubilização do FePO_4 .

Tamanho dos pellets mm	Fosfato solubilizado $\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$	NaOH mg mL^{-1}	pH	Massa seca mg mL^{-1}
> 4	1227,97 A	2,06 A	1,79 C	3,23 C
3 a 4	1184,98 A	2,07 A	1,80 BC	3,51 B
2 a 3	1038,59 B	1,70 B	1,84 AB	3,71 B
1 a 2	650,52 C	1,14 C	1,88 A	4,79 A

Médias com letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey 5% de probabilidade.

4.5 Solubilização do FePO_4 por esporos e pellets livres e imobilizados

O efeito do uso e do número de reusos de *A. niger* foi investigado na solubilização de FePO_4 (Figura 4). Após 8 dias de incubação, os pellets imobilizados ou livres solubilizaram mais de $1200 \mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$ de FePO_4 na seguinte ordem: pellets livres > pellets imobilizados > esporos imobilizados > esporos livres. Os inóculos foram lavados e transferidos para novo meio esterilizado. No primeiro reuso (Tabela 18), maior

solubilização do Fe-P foi encontrada com a inoculação dos pellets até o 5º dia de incubação e com os esporos imobilizados a partir do 6º dia. No segundo reuso, a solubilização foi maior com a inoculação dos pellets do que com os esporos. A habilidade de solubilização do fungo decresceu drasticamente com o segundo reuso.

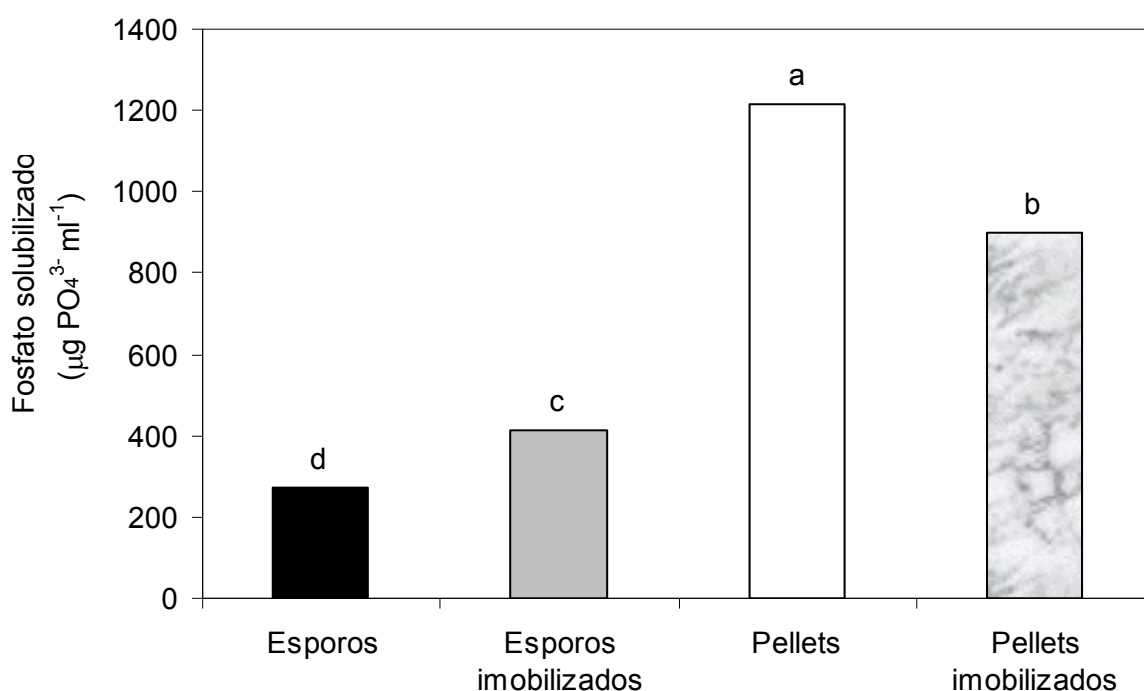


Figura 4. Solubilização de FePO₄ por pellets e esporos livres e imobilizados de *Aspergillus niger*. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas entre a solubilização de FePO₄, conforme o valor LSD ($p < 0,05$).

Tabela 18. Efeito do reuso de pellets e esporos livres e imobilizados de *Aspergillus niger* na solubilização de FePO_4 .

	Tempo (Dias)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	(µg PO ₄ ³⁻ ml ⁻¹)							
1º Reuso								
Esporos	8,42 c	8,83 d	36,81 c	48,16 d	104,94 d	109,93 d	118,32 d	156,03 d
Esporos imobilizados	384,33 b	425,29 b	448,00 b	685,23 c	840,94 c	1012,88 a	1014,10 a	916,37 a
Pellets	696,18 a	709,15 a	724,97 a	930,97 a	1027,08 a	800,91 c	699,83 c	689,28 c
Pellets Imobilizados	386,36 b	407,04 c	575,58 ab	775,66 b	856,76 b	901,77 b	893,66 b	901,37 b
2º Reuso								
Esporos	00,00	96,82 d	95,61 d	137,78 d	159,68 b	169,01 d	158,06 d	144,27 d
Esporos imobilizados	00,00	179,96 b	477,20 a	500,72 c	513,29 ab	522,62 b	393,66 c	375,01 c
Pellets	00,00	273,63 a	450,03 b	570,87 a	477,60 ab	434,21 c	415,97 b	407,85 b
Pellets Imobilizados	00,00	116,29 c	312,96 c	541,67 b	594,80 a	596,01 a	466,25 a	422,86 a

* Letras diferentes na linha indicam diferença significativa entre a solubilização de FePO_4 . Conforme o valor LSD ($p < 0,05$)

Esporos e pellets livres ou imobilizados foram inoculados no solo para investigar seu efeito na atividade respiratória e solubilização de FePO_4 (Tabela 19). A liberação de CO_2 foi maior no solo inoculado com pellets livres ou imobilizados do que com os esporos. As quantidades maiores de CO_2 produzido foram obtidas com 5 dias de incubação nos tratamento com pellets livres ou imobilizados com a produção de 176,98 e 167,69 mg CO_2 100g solo seco. Com a segunda adição de melaço no 10º dia de incubação, a produção de CO_2 pelos pellets continuou sendo maior que a dos esporos e aumentou mais de 2 vezes em relação à adição inicial de melaço.

Tabela 19. Produção de CO₂ por pellets e esporos livres e imobilizados de *Aspergillus niger*.

Tempo (Dias)	Esporos	Esporos imobilizados	Pellets	Pellets imobilizados
(mg CO ₂ 100 g solo seco)				
1	81,14 b	45,93 c	81,44 b	100,35 a
2	156,44 a	151,56 ab	144,22 c	149,11 bc
3	150,12 b	138,04 c	164,78 a	144,94 b
4	134,29 b	139,79 b	167,75 a	163,63 a
5	114,40 c	126,13 b	176,98 a	167,69 a
6	68,10 b	71,76 b	99,52 a	98,48 a
7	40,62 b	45,69 b	81,23 a	78,41 a
8	26,28 b	29,33 b	48,89 a	51,33 a
9	18,67 b	20,67 b	35,33 a	35,33 a
10	12,47 c	16,13 bc	19,80 ab	24,20 a
11	169,48 b	200,44 a	201,26 a	201,26 a
12	192,50 a	192,50 a	168,67 b	197,08 a
13	184,38 b	187,52 ab	187,52 ab	202,19 a
14	157,67 b	165,00 b	167,44 b	188,22 a
15	118,80 b	129,07 b	137,87 b	206,80 a

Letras diferentes na linha indicam diferenças significativas entre produção de CO₂, conforme o valor LSD ($p < 0.05$).

Os pellets imobilizados ou livres solubilizaram maior quantidade de FePO_4 até o 5º dia de incubação (Figura 5) enquanto que os esporos foram mais eficientes a partir do 4º dia de incubação.

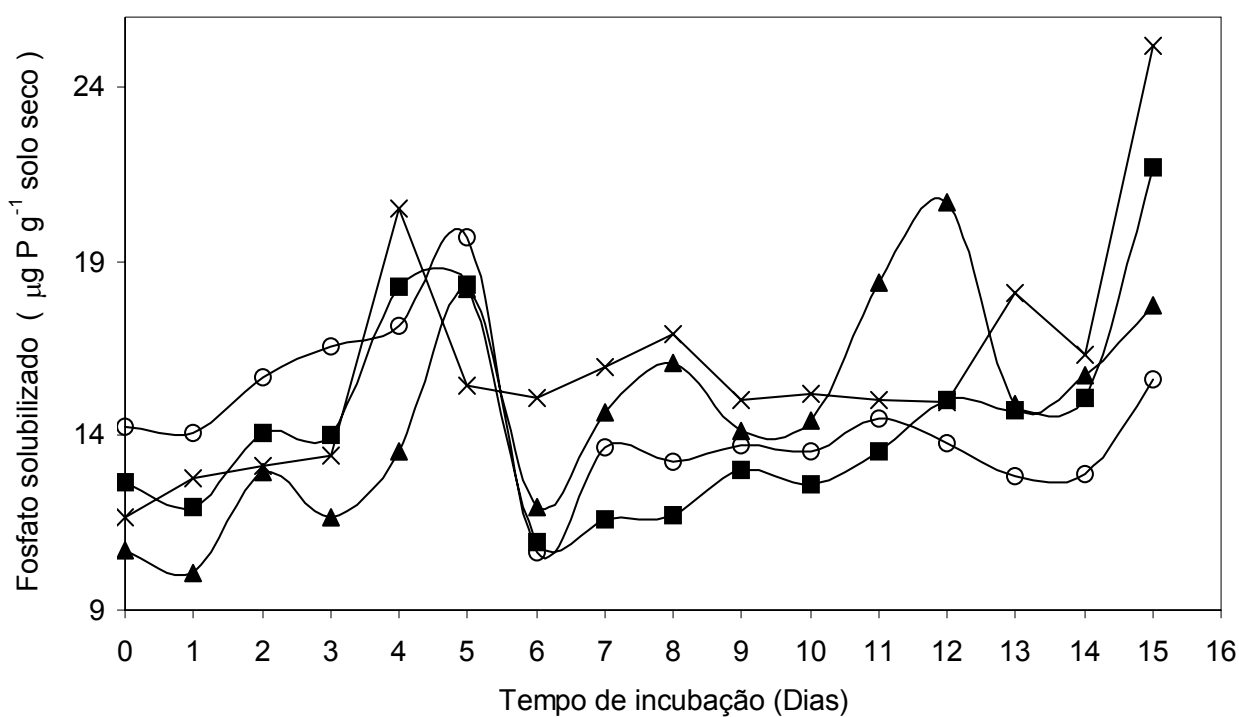


Figura 5. Solubilização de FePO_4 por esporos livres ou imobilizados ou pellets de *A. niger* inoculados no solo. (x) esporos; (σ) esporos imobilizados; (v) pellets e (O) pellets imobilizados.

4.6 Efeito da fonte de nitrogênio e carbono na solubilização de FePO_4 , AlPO_4 e CaHPO_4

A atividade do fungo *A. niger* no meio de cultura estacionário foi afetado com a utilização de fontes diferentes de nitrogênio (Tabela 20). A quantidade de AlPO_4 solubilizado foi de $705,50 \mu\text{g PO}_4 \text{ mL}^{-1}$ com a utilização do nitrato de amônio como fonte de nitrogênio, o FePO_4 foi respectivamente de $266,01 \mu\text{g PO}_4 \text{ mL}^{-1}$ utilizando ácido L- glutâmico e o CaHPO_4 de $888,31 \mu\text{g PO}_4 \text{ mL}^{-1}$ com glicina.

O crescimento do micélio (Tabela 20) no meio adicionado de AlPO_4 , FePO_4 e CaHPO_4 foi de 8,03; 9,56 e 11,30 mg mL^{-1} peso seco na presença de ácido L-glutâmico como fonte de nitrogênio, indicando que esse ácido foi a melhor fonte de nitrogênio para o crescimento do fungo.

O pH no meio adicionado de AlPO_4 e FePO_4 (Tabela 20) diminuiu respectivamente de 7,0 para 2,55 e 2,38 na presença de cloreto de amônio, indicando que esses tratamentos se diferenciaram dos demais significativamente. Na presença de CaHPO_4 o pH diminuiu de 7 para 2,36 e 2,37 com a utilização do cloreto de amônio e ácido L- glutâmico, não havendo diferença significativa entre estes dois tratamentos.

A produção de acidez titulável (Tabela 20) no meio adicionado de AlPO_4 e CaHPO_4 foi respectivamente de 1,22 e 1,01 mg NaOH mL^{-1} com a utilização do cloreto de amônio, e FePO_4 foi 0,86 mg NaOH mL^{-1} com a utilização do sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. Os resultados foram significativos, indicando que houve diferença entre os tratamentos.

Na correlação das variáveis estudadas na Tabela 21, foi observado que entre todas as variáveis houve correlação significativa.

Os resultados obtidos na Tabela 22 indicaram que a correlação entre a solubilização do FePO_4 com a acidez titulável ($r = 0,579^{**}$) e o micélio ($r = 0,646^{**}$) foi significativa e positiva, indicando que uma variável influencia a outra, ou seja, com o crescimento do fungo há produção de ácido e este solubiliza o fosfato. Correlação significativa e negativa foi obtida entre a acidez titulável e o pH ($r = -0,621^{**}$) porém entre o pH e o micélio foi positiva ($r = 0,606^{**}$). Correlações significativas não foram

obtidas entre fosfato solubilizado e acidez titulável ou acidez titulável e micélio (Tabela 23).

Tabela 20. Efeito das fontes de nitrogênio na solubilização de fosfatos inorgânicos pelo *Aspergillus niger*.

Fosfatos	Ureia	Cloreto de amônio	Glicina	Nitrato de potássio	Nitrato de sódio	Sulfato de amônio	Ácido L-glutâmico	Nitrato de amônio
Fosfato solubilizado ($\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$)								
Al	400,43FB	682,43B	533,61D	371,93 G	415,07 E	668,56 C	348,85 H	705,50 A
Fe	27,69 GC	42,32F	58,71E	120,63 D	141,15 C	173,83 B	266,01 A	63,82 E
Ca	760,65 GA	874,97B	888,31A	835,06 E	860,77 C	798,33 F	849,26 D	800,43 F
Micélio (mg mL^{-1} peso seco)								
Al	4,60 C	4,26 D	3,53 F	3,89 E	5,99 B	3,79 E	8,03 A	3,88 E
Fe	6,74 C	5,64 E	7,17 B	6,31 D	6,85 C	5,71 E	9,56 A	5,86 E
Ca	6,46 E	6,73 D	8,64 B	7,56 C	6,69 ED	5,93 F	11,30 A	5,81 F
pH								
Al	3,98 C	2,55 F	3,97 C	5,04 B	5,32 A	2,82 E	5,14 B	3,06 D
Fe	5,05 C	2,38 F	5,05 C	5,55 A	5,52 A	2,62 E	5,33 B	3,89 D
Ca	3,64 A	2,37 E	2,73 DC	2,80 C	3,34 B	2,60 D	2,36 E	3,22 B
Acidez titulável (mg NaOH mL^{-1})								
Al	0,54 E	1,22 A	0,84 D	0,45 GF	0,47 F	1,11 B	0,43 G	0,94 C
Fe	0,04 F	0,46 C	0,18 ED	0,20 D	0,21 D	0,86 A	0,51 B	0,14 E
Ca	0,54 E	1,01 A	0,71 DC	0,67 D	0,57 E	0,82 B	0,84 B	0,75 C

Média com letras iguais na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey de 5 % de probabilidade.

Tabela 21. Coeficiente de correlação simples entre os valores do efeito de fontes de nitrogênio no AlPO_4 solubilizado, acidez titulável, pH e micélio .

Variáveis	Fosfato solubilizado	Acidez titulável	pH	Micélio
Fosfato solubilizado		0,944**	-0,919**	-0,582**
Acidez titulável			-0,968**	-0,584**
pH				0,606 **

**, significativo ($p < 0,01$).

Tabela 22. Coeficiente de correlação simples entre os valores do efeito de fontes de nitrogênio no FePO_4 solubilizado, acidez titulável, pH e micélio .

Variáveis	Fosfato solubilizado	Acidez titulável	pH	Micélio
Fosfato solubilizado	-	0,579 **	-0,206 ns	0,646**
Acidez titulável	-	-	-0,621**	-0,015ns
pH	-	-	-	0,606**

**, significativo ($p < 0,01$); ns, não significativo.

Tabela 23. Coeficiente de correlação simples entre os valores do efeito de fontes de nitrogênio no CaHPO_4 solubilizado, acidez titulável, pH e micélio .

Variáveis	Fosfato solubilizado	Acidez titulável	pH	Micélio
Fosfato solubilizado		0,165 ns	-0,566**	0,456*
Acidez titulável			-0,722**	0,126 ns
pH				-0,506 *

*, significativo ($p < 0,05$); **, significativo ($p < 0,01$); ns, não significativo.

A Tabela 24 demonstrou que a maior quantidade de fosfato solubilizado foi de 339,20 $\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$ na presença de manitol como fonte de carbono. A maior quantidade de micélio produzido, foi de 7,34, 7,38 e 7,55 mg mL^{-1} , quando foi utilizado glicose, sacarose e d-galactose, indicando que estas fontes foram as melhores para o crescimento do fungo, no entanto não houve diferença significativa entre estes resultados.

O pH diminuiu (Tabela 24) de 7 para 2,19 e 2,20 nos tratamentos adicionados respectivamente com sacarose e maltose. A maior produção de acidez titulável foi de 0,89 mg NaOH mL^{-1} no meio de cultura adicionado de d-galactose.

Tabela 24. Efeito das fontes de carbono na solubilização de FePO_4 pelo *Aspergillus niger*.

Fontes de C	P solubilizado ($\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$)	Micélio (mg mL^{-1} peso seco)	pH	Acidez titulável (mg NaOH mL^{-1})
Glicose	11,10 J	7,34 A	2,21 DC	0,42 G
Sacarose	23,43 I	7,37 A	2,19 D	0,42 G
Maltose	39,65 G	6,66 B	2,20 D	0,48 E
Manitol	339,20 A	3,61 E	2,24 C	0,86 B
Frutose	48,16 F	6,49 CB	2,22 DC	0,51 D
Arabinose	84,09 E	2,77 F	3,88 A	0,14 H
Xilose	30,04 H	6,22 C	2,22 DC	0,46 F
Amido solúvel	108,71 D	6,16 C	2,34 B	0,48 E
D-galactose	171,72 B	7,55 A	2,20 DC	0,89 A
D-manose	118,52 C	5,34 D	2,29 B	0,69 C

Média com letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

A Tabela 25 inclui os resultados de correlação entre os parâmetros analisados na presença do FePO_4 e fontes de carbono. Correlações significativas não foram observadas entre o fosfato solubilizado e o pH final ou entre a acidez titulável e o micélio.

No meio MS adicionado com AlPO_4 (Tabela 26) a quantidade de fosfato solubilizado foi de $762,44 \mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$, quando foi utilizada d-galactose como fonte de carbono. A maior produção micelial foi de $11,52 \text{ mg mL}^{-1}$ obtida na presença de sacarose seguido de d-manose, indicando que estas foram as melhores fontes de carbono para o crescimento do *Aspergillus niger*. Os menores valores do pH final (Tabela 26) foram obtidos com a utilização de xilose e d-manose. A maior produção de acidez titulável foi de $3,02 \text{ mg NaOH mL}^{-1}$ no tratamento adicionado de d-manose.

Tabela 25. Coeficiente de correlação simples entre os valores do efeito das fontes de carbono na solubilização de FePO_4 , acidez titulável, pH e micélio.

Variáveis	Fosfato solubilizado	Acidez titulável	pH	Micélio
Fosfato solubilizado		0,705 **	-0,023 ns	-0,504*
Acidez titulável			-0,617**	0,174ns
pH				-0,716**

*, significativo ($p < 0,05$); **, significativo ($p < 0,01$); ns, não significativo.

Tabela 26. Efeito das fontes de carbono na solubilização de AlPO_4 pelo *Aspergillus niger*.

Fontes de C	P solubilizado ($\mu\text{g PO}_4^{-3} \text{ mL}^{-1}$)	Micélio (mg mL^{-1} peso seco)	pH	Acidez titulável (mg NaOH mL^{-1})
Glicose	673,35 E	9,39 DC	2,27 C	1,89 F
Sacarose	745,41 B	11,52 A	2,23 DC	1,89 F
Maltose	713,90 C	9,62 C	2,14 GEF	2,86 B
Manitol	591,15 G	8,24 E	2,15 DEF	2,04 E
Frutose	700,68 D	8,69 DE	2,15 DEF	2,12 D
Arabinose	607,17 F	6,71 F	2,56 B	0,91 H
Xilose	590,05 G	9,43 C	2,06 G	2,45 C
Amido solúvel	419,94 H	6,54 F	2,70 A	0,63 I
D-galactose	762,44 A	10,70 B	2,30 C	1,43 G
D-manose	706,92 DC	11,33 AB	2,07 GF	3,02 A

Média com letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Todas as variáveis estudadas (Tabela 27) foram correlacionadas significativamente, indicando que houve diferença significativa praticamente de 1%.

As quantidades máximas de CaHPO_4 (Tabela 28) solubilizado foram obtidas na presença de maltose e manitol, correspondendo a um percentual de 59 e 60%. O crescimento do fungo foi maior no meio adicionado com sacarose com 5,96 mg micélio peso seco mL^{-1} . O pH final (Tabela 28) variou de 2,24 a 4,6 e os menores valores foram observados nos meios adicionados com frutose e manitol. As quantidades de ácidos produzidas variaram de 0,05 a 1,55 mg NaOH mL^{-1} e a maior produção foi obtida na presença de maltose.

Tabela 27. Coeficiente de correlação simples entre os valores do efeito das fontes de carbono na solubilização de AlPO_4 , acidez titulável, pH e micélio.

Variáveis	Fosfato solubilizado	Acidez titulável	pH	Micélio
Fosfato solubilizado		0,529 **	-0,604**	0,796*
Acidez titulável			-0,919**	0,645 **
pH				-0,686 **

*, significativo ($p < 0,05$); **, significativo ($p < 0,01$).

Tabela 28. Efeito das fontes de carbono na solubilização de CaHPO_4 pelo *Aspergillus niger*.

Fontes de C	P solubilizado ($\mu\text{g PO}_4^{-3} \text{ mL}^{-1}$)	Micélio (mg mL^{-1} peso seco)	pH	Acidez titulável (mg NaOH mL^{-1})
Glicose	688,03 C	4,69 D	3,14 C	1,29 B
Sacarose	639,81 E	5,96 A	2,58 D	0,94 C
Maltose	750,64 A	3,61 E	3,07 C	1,55 A
Manitol	757,25 A	5,61 B	2,30 E	1,03 C
Frutose	672,09 D	5,72 BA	2,24 E	1,02 C
Arabinose	39,08 H	2,69 F	4,60 A	0,05 G
Xilose	728,74 B	3,60 E	2,66 DE	0,77 D
Amido solúvel	442,00 G	2,83 F	4,59 A	0,82 D
D-galactose	722,78 B	5,08 C	4,44 B	0,53 E
D-manose	481,78 F	2,74 F	4,53 AB	0,39 F

Média com letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

O resultado do teste de correlação (Tabela 29) indicou que a maior parte das variáveis se correlacionaram significativamente a 1% de probabilidade. Os resultados de correlação também indicaram que os efeitos dos tratamentos influenciaram as variáveis, ocasionando diferenças significativas entre as mesmas.

Tabela 29. Coeficiente de correlação simples entre os valores do efeito das fontes de carbono na solubilização de CaHPO_4 , acidez titulável, pH e micélio.

Variáveis	Fosfato Solubilizado	Acidez titulável	pH	Micélio
Fosfato solubilizado		0,738 **	-0,655**	0,618**
Acidez titulável			-0,659**	0,423 *
pH				-0,707 **

*, significativo ($p < 0,05$); **, significativo ($p < 0,01$).

4.7 Efeito dos metais na solubilização de FePO_4 e CaHPO_4

Os resultados apresentados na Tabela 30 indicaram que o aumento da quantidade de Cu^{2+} no meio de cultura diminuiu a solubilização FePO_4 , em comparação com o controle que foi $690,94 \mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$. O crescimento do micélio foi maior na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Cu^{2+} com a produção de massa seca de $7,91 \text{ mg mL}^{-1}$ em relação ao controle. As doses de Cu^{2+} testadas não influenciaram a diminuição do pH para valores menores que 2,66, ao contrário houve aumento superior a 3. A quantidade de ácido produzida foi baixa, com produção máxima de $1,15 \text{ mg NaOH mL}^{-1}$ na concentração $0,05 \text{ mg L}^{-1}$.

A adição de Zn^{2+} no meio de cultura causou redução da solubilização do FePO_4 . Os resultados (Tabela 31) indicaram que as concentrações usadas causaram a diminuição da solubilização do FePO_4 em relação ao controle. A produção de micélio não foi afetada pelas quantidades de Zn^{2+} testadas, portanto nenhuma diferença

significativa foi constatada, entre a produção de micélio no controle e nos tratamentos adicionados com concentrações crescentes de Zn^{2+} .

Tabela 30. Efeito das concentrações crescentes de Cu^{2+} na solubilização de FePO_4 pelo *Aspergillus niger*.

Micronutriente	Concentração (mg L ⁻¹)	Fosfato solubilizado ($\mu\text{g PO}_4^{-3} \text{ mL}^{-1}$)	Micélio (mg mL ⁻¹)	pH	Acidez titulável (mg NaOH mL ⁻¹)
Cu^{2+} ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,00	690,9 A	3,59 C	2,66 B	1,26 A
	0,05	429,12 D	3,45 C	2,67 B	1,15 AB
	0,10	458,83 C	3,47 C	3,17 AB	0,90 BC
	0,50	461,22 C	4,20 B	3,39 A	0,76 C
	1,00	506,09 B	7,91 A	3,19 AB	0,88 BC

Médias com letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey 5% de probabilidade.

Tabela 31. Efeito das concentrações crescentes de Zn^{2+} na solubilização de FePO_4 pelo *Aspergillus niger*.

Micronutriente	Concentração (mg L ⁻¹)	Fosfato solubilizado ($\mu\text{g PO}_4^{-3} \text{ mL}^{-1}$)	Micélio (mg mL ⁻¹)	pH	Acidez titulável (mg NaOH mL ⁻¹)
Zn^{2+} ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,00	690,9 A	3,59 A	2,66 E	1,26 A
	0,05	252,12 D	3,58 A	5,42 A	0,33 C
	0,10	260,84 D	3,46 A	5,00 B	0,35 C
	0,50	280,04 C	3,26 A	4,52 C	0,42 C
	1,00	497,90 B	3,72 A	3,49 D	0,87B

Médias com letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade

Os dados apresentados indicaram que, aumentando as concentração de Zn^{2+} , o pH tende a aumentar. Observou-se também que aumentando as concentrações de Zn^{2+} no meio de cultura, a quantidade de acidez produzida tende a diminuir em relação ao controle, mas entre as concentrações houve aumento.

A solubilização de FePO_4 (Tabela 32) não apresentou diferença significativa entre o controle e todas as concentrações testadas de Fe^{2+} . A concentração de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ de Fe^{2+} aumentou a produção do micélio de 3,59 para $5,27 \text{ mg mL}^{-1}$ de meio de cultura. O valor do pH aumentou com adição das concentrações em comparação com controle que foi de 2,66. A produção de acidez titulável não apresentou diferença significativa em todos os tratamentos adicionados com Fe^{2+} , diferenciando apenas do controle.

Tabela 32. Efeito das concentrações crescentes de Fe^{2+} na solubilização de FePO_4 pelo *Aspergillus niger*.

Micronutriente	Concentração (mg L^{-1})	Fosfato solubilizado ($\mu\text{g PO}_4^{-3} \text{ mL}^{-1}$)	Micélio (mg mL^{-1})	pH	Acidez titulável (mg NaOH mL^{-1})
	0,00	690,9 A	3,59 B	2,66 B	1,26 A
Fe^{2+}	0,01	454,31 A	5,27 A	3,15 A	0,83 B
($\text{FeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,02	509,80 A	3,81 B	2,85 AB	0,96 B
	0,10	509,62 A	3,55 B	3,04 AB	0,92 B
	0,20	524,48 A	3,37 B	3,11 AB	0,89 B

Médias com letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey 5% de probabilidade.

Entre os metais, o Fe^{3+} (Tabela 33) foi o que mais favoreceu a solubilização do FePO_4 . Os resultados do crescimento do micélio (Tabela 33) indicaram que, as concentrações testadas não aumentaram significativamente a produção da massa seca do micélio em relação ao controle que foi de 3,59 mg de micélio mL^{-1} de meio de cultura. O valor do pH e a produção da acidez titulável foram semelhantes, ou seja, não apresentaram diferenças significativas em relação aos controles.

Tabela 33. Efeito das concentrações crescentes de Fe^{3+} na solubilização de FePO_4 pelo *Aspergillus niger*.

Micronutriente	Concentração (mg L^{-1})	Fosfato solubilizado ($\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{mL}^{-1}$)	Micélio (mg mL^{-1})	pH	Acidez titulável (mg NaOH mL^{-1})
Fe^{3+} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,00	690,9 C	3,59 A	2,66 A	1,26 A
	0,01	665,60 D	3,34 BC	2,73 A	1,21 A
	0,02	834,17 A	3,21 C	2,59 A	1,27 A
	0,10	834,29 A	3,43 AB	2,62 A	1,26 A
	0,20	704,63 B	3,49 AB	2,72 A	1,24 A

Médias com letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey 5% de probabilidade.

Os dados observados na Tabela 34 indicaram que, com o aumento da quantidade de Cu^{2+} ocorreu a diminuição do CaHPO_4 solubilizado, em comparação com o controle que foi 982,41 $\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{mL}^{-1}$. Resultados semelhantes foram observados com relação ao crescimento do micélio, ou seja, nenhuma concentração de Cu^{2+} favoreceu o crescimento do fungo. O valor do pH final diminuiu de 2,79 para 2,35 na concentração de 0,5 mg L^{-1} Cu^{2+} . A maior produção de acidez titulável foi de 0,84 mg NaOH mL^{-1} na

concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, diferenciando-se significativamente dos demais tratamentos, inclusive do controle que foi de $0,80 \text{ mg NaOH mL}^{-1}$.

Tabela 34. Efeito das concentrações crescentes de Cu^{2+} na solubilização de CaHPO_4 pelo *Aspergillus niger*.

Micronutriente	Concentração (mg L^{-1})	Fosfato solubilizado ($\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$)	Micélio (mg mL^{-1})	pH	Acidez titulável (mg NaOH mL^{-1})
Cu^{2+} ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,00	982,41 A	9,67 A	2,79 AB	0,80 B
	0,05	910,21 C	7,40 B	2,78 AB	0,81 B
	0,10	917,22 C	6,88 C	2,56 AB	0,81 B
	0,50	943,34 B	6,42 D	2,35 B	0,84 A
	1,00	874,58 D	6,90 C	2,50 AB	0,79 B

* Médias com letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey 5% de probabilidade.

Com adição de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de Zn^{2+} no meio de cultura, a solubilização do CaHPO_4 pelo *A. niger* (Tabela 35) foi de $996,78 \mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$, representando um aumento de 1,5% em relação ao controle $982,41 \mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$. No entanto este pequeno aumento de 1,5% não foi significativo. As demais concentrações de Zn^{2+} diminuíram a solubilização do CaHPO_4 . Com relação ao crescimento do micélio (Tabela 35) nenhuma concentração de Zn^{2+} adicionado no meio de cultura proporcionou aumento em comparação com o controle que foi de $9,67 \text{ mg mL}^{-1}$. Não houve diferença significativa entre os valores do pH final com as adições das concentrações testadas de Zn^{2+} e o controle. Todos os tratamentos foram iguais. A produção de acidez titulável pelo fungo foi de $0,89 \text{ mg NaOH mL}^{-1}$ na presença de $0,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$, diferenciando-se significativamente dos demais tratamentos.

A máxima solubilização do CaHPO_4 pelo fungo (Tabela 36) foi $1025,90 \mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$ indicando um aumento significativo em relação ao controle. Nenhuma

concentração de Fe^{2+} favoreceu o aumento da produção do micélio e acidez titulável ou diminuiu o pH.

Tabela 35. Efeito das concentrações crescentes de Zn^{2+} na solubilização de CaHPO_4 pelo *Aspergillus niger*.

Micronutriente	Concentração (mg L ⁻¹)	Fosfato solubilizado ($\mu\text{g PO}_4^{-3}$ mL ⁻¹)	Micélio (mg mL ⁻¹)	pH	Acidez titulável (mg NaOH mL ⁻¹)
Zn^{2+} ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,00	982,41 AB	9,67 A	2,79 A	0,80 C
	0,05	996,78 A	6,64 E	2,69 A	0,79 C
	0,10	978,50 B	7,59 C	2,54 A	0,71 D
	0,50	977,56 B	7,09 D	2,51 A	0,89 A
	1,00	951,57 C	8,08 B	2,60 A	0,85 B

Médias com letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey 5% de probabilidade.

Tabela 36. Efeito das concentrações crescentes de Fe^{2+} na solubilização de CaHPO_4 pelo *Aspergillus niger*.

Micronutriente	Concentração (mg L ⁻¹)	Fosfato solubilizado ($\mu\text{g PO}_4^{-3}$ mL ⁻¹)	Micélio (mg mL ⁻¹)	pH	Acidez titulável (mg NaOH mL ⁻¹)
Fe^{2+} ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,00	982,41 B	9,67 A	2,79 B	0,80 A
	0,05	760,25 E	7,68 C	5,27 A	0,53 E
	0,10	1025,90 A	7,49 C	5,29 A	0,63 B
	0,50	874,10 C	8,38 B	5,32 A	0,56 D
	1,00	814,77 D	6,85 D	5,33 A	0,61 C

Médias com letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey 5% de probabilidade.

A concentração 0,5 mg L⁻¹ de Fe³⁺, aumentou a solubilização do CaHPO₄ pelo *A. niger* (Tabela 37) para 1021,12 µg PO₄³⁻ mL⁻¹, um aumento significativo. O Fe³⁺ não interferiu na produção de micélio, acidez titulável ou diminuição do pH final.

Tabela 37. Efeito das concentrações crescentes de Fe³⁺ na solubilização de CaHPO₄ pelo *Aspergillus niger*.

Micronutriente	Concentração (mg LI ⁻¹)	Fosfato solubilizado (µg PO ₄ ⁻³ mL ⁻¹)	Micélio (mg mL ⁻¹)	pH	Acidez titulável (mg NaOH mL ⁻¹)
Fe ³⁺ (FeCl ₃ .6H ₂ O)	0,00	982,41 C	9,67 A	2,79 C	0,80 A
	0,05	640,01 E	8,89 B	5,08 B	0,48 C
	0,10	1004,14 B	7,97 C	5,21 AB	0,63 B
	0,50	1021,12 A	7,28 D	5,36 A	0,61 B
	1,00	917,42 D	7,04 D	5,21 AB	0,49 C

Médias com letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey 5% de probabilidade.

4.8 Efeito dos álcoois na solubilização de FePO₄ e CaHPO₄

Os resultados da Tabela 38 indicaram que concentrações crescentes de metanol influenciaram o crescimento do fungo *A. niger* em cultura estacionária. A solubilização de FePO₄ foi crescente até a concentração 4% de metanol com a produção de 1204,55 µg PO₄³⁻ mL⁻¹, diferenciando-se significativamente dos demais tratamentos. Nos tratamentos com concentrações de 5 e 6% a solubilização diminuiu bruscamente para 461,06 e 137,58 µg PO₄³⁻ mL⁻¹.

A concentração de 3% de metanol foi a que mais favoreceu o crescimento do micélio com 4,46 mg mL⁻¹ peso seco, esta mesma concentração diminuiu o pH do

meio de cultura para 1,77. A maior produção de acidez titulável (Tabela 38) foi observada no tratamento adicionado com 4% de metanol com 2,74 mg NaOH mL⁻¹.

Tabela 38. Efeito das concentrações crescente de metanol na solubilização de FePO₄ pelo *Aspergillus niger*.

Concentração (%)	Fosfato solubilizado (µg PO ₄ ³⁻ mL ⁻¹)	Massa seca (mg mL ⁻¹)	pH	Acidez titulável (mg NaOH mL ⁻¹)
0	521,12 E	2,94 C	3,45 C	0,88 E
1	849,91 D	3,67 B	2,06 D	1,67 D
2	912,44 C	3,25 BC	2,08 D	1,88 C
3	999,03 B	4,46 A	1,77 E	2,40 B
4	1204,55 A	3,02 C	1,89 DE	2,74 A
5	461,06 F	2,22 D	4,07 B	0,58 F
6	137,58 G	2,17 D	5,17 A	0,06 G

Médias com letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey 5% de probabilidade.

As maiores quantidades de FePO₄ solubilizado e ácido produzido pelo *A. niger* foram obtidos na concentração de 3% de etanol com 1098,51 µg PO₄³⁻ mL⁻¹ e 3,19 mg NaOH mL⁻¹. A maior produção de massa seca foi de 7,25 mg mL⁻¹ peso seco, obtida com 1% de álcool. O pH final (Tabela 39) do meio de cultivo diminuiu consideravelmente para 2,08, exceto nos tratamentos com 5 e 6% de etanol com pH 5,21 e 6,70. Os resultados obtidos indicaram que as concentrações de álcoois testadas, possuem efeitos diferentes sobre as variáveis estudadas.

A Tabela 40 indicou que a solubilização do CaHPO₄, que apesar de ter aumentado de 685,62 para 872,47 µg PO₄³⁻ mL⁻¹, não houve diferença significativa em todos os tratamentos. Os dados indicaram que nenhuma concentração de metanol testada proporcionou um aumento expressivo na solubilização do CaHPO₄ e a mesma tende a

Tabela 39. Efeito das concentrações crescente de etanol na solubilização de FePO_4 pelo *Aspergillus niger*.

Concentração (%)	Fosfato solubilizado ($\mu\text{g PO}_4^{-3} \text{ mL}^{-1}$)	Massa seca (mg mL^{-1})	pH	Acidez titulável (mg NaOH mL^{-1})
0	696,44 D	3,69 CD	2,74 C	1,42 D
1	1051,45 B	7,25 A	2,30 D	1,95 C
2	1078,78 A	6,75 AB	2,24 D	2,29 B
3	1098,51 A	6,20 B	2,08 D	3,19 A
4	986,04 C	3,92 C	2,34 D	2,37 B
5	27,06 E	2,91 DE	5,21 B	0,07 E
6	5,10 E	2,65 E	6,70 A	0,00 E

Médias com letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey 5% de probabilidade.

Tabela 40. Efeito das concentrações crescente de metanol na solubilização de CaHPO_4 pelo *Aspergillus niger*.

Concentração (%)	Fosfato solubilizado ($\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$)	Massa seca (mg mL^{-1})	pH	Acidez titulável (mg NaOH mL^{-1})
0	685,62 A	6,71 C	2,64 C	2,06 C
1	809,27 A	7,53 AB	2,12 D	1,75 D
2	854,63 A	7,03 BC	2,05 D	2,26 B
3	857,37 A	7,66 A	2,09 D	2,39 A
4	872,47 A	7,24 ABC	1,89 D	2,27 B
5	860,86 A	5,78 D	3,07 B	1,56 E
6	554,41 A	2,20 E	4,10 A	0,71 F

Médias com letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey 5% de probabilidade.

diminuir com o aumento da concentração. Com relação ao crescimento do micélio (Tabela 40), houve variação de 2,20 a 7,66 mg mL^{-1} peso seco, com diferença significativa. A concentração 3% foi a quantidade de metanol que proporcionou maior crescimento do micélio 7,66 mg mL^{-1} peso seco. O pH final diminuiu para 2,1. A acidez titulável (Tabela 40) produzida pelo fungo, foi maior e significativa na concentração 3% com 2,39 mg NaOH mL^{-1} .

A concentração de 3% de etanol (Tabela 41) favoreceu a solubilização de CaHPO_4 pelo *A. niger* com 901,22 $\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$, no entanto não houve diferença significativa entre os tratamentos com 0, 1 e 3% de etanol. A maior produção de massa seca foi obtida com 2% de etanol. O pH diminuiu de 7 para 1,89 no tratamento com 1% de etanol, por outro lado, foi observado que aumentando a concentração de etanol o valor do pH tende a aumentar (Tabela 41). A quantidade de acidez titulável (Tabela 41) produzida foi maior no tratamento com quantidade de 3% de etanol com 8,35 mg NaOH mL^{-1} , diferenciando-se significativamente dos demais tratamentos.

Tabela 41. Efeito das concentrações crescente de etanol na solubilização de CaHPO_4 pelo *Aspergillus niger*.

Concentração (%)	Fosfato solubilizado ($\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$)	Massa seca (mg mL^{-1})	pH	Acidez titulável (mg NaOH mL^{-1})
0	894,96 A	9,11 C	3,03 C	1,91 E
1	893,30 A	8,61 C	1,89 F	3,86 D
2	874,34 BC	10,50 A	1,98 E	7,72 B
3	901,22 A	9,73 B	1,95 EF	8,35 A
4	885,75 AB	6,32 D	2,27 D	4,24 C
5	865,88 C	4,53 E	4,12 B	0,79 F
6	37,05 D	3,88 F	4,89 A	0,03 G

Médias com letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey 5% de probabilidade.

Nas Figuras 6 e 7 foram observadas as quantidades de açúcar residual no meio MS adicionado com etanol e metanol. Nos tratamentos com 2 e 3% de etanol houve maior redução do açúcar com 0,40 e 0,36 mg mL^{-1} , indicando que o maior consumo açúcar (manitol) pelo *A. niger* ocorreu nestes tratamentos.

4.9 Efeito da combinação de metais na solubilização de FePO_4

Os efeitos dos metais sobre o crescimento do *A. niger* foram claramente observados (Figura 8 e 9). Os dados da Figura 8A, indicaram que a maior quantidade de FePO_4 solubilizado pelo *A. niger* ocorreu no meio adicionado com Fe^{3+} com 672,33 $\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$, diferenciando-se significativamente dos demais tratamentos e coincidiu com a maior produção da biomassa 5,89 mg mL^{-1} (Figura 8B).

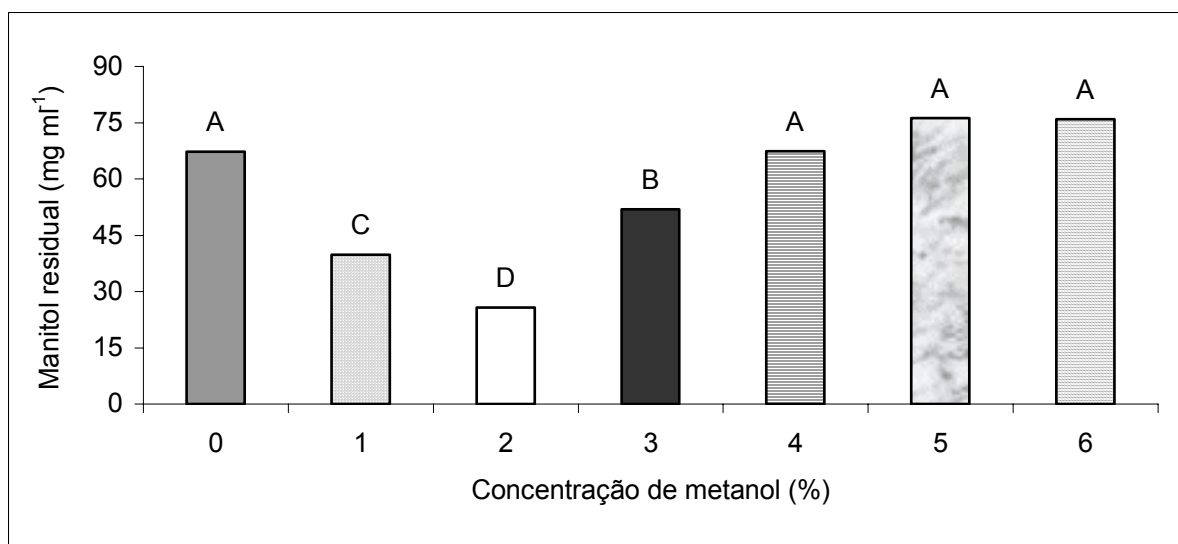


Figura 6. Consumo de manitol por *Aspergillus niger* cultivado em meio MS, adicionado de concentrações crescentes de metanol. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre o consumo de manitol, conforme o valor LSD ($p < 0,05$).

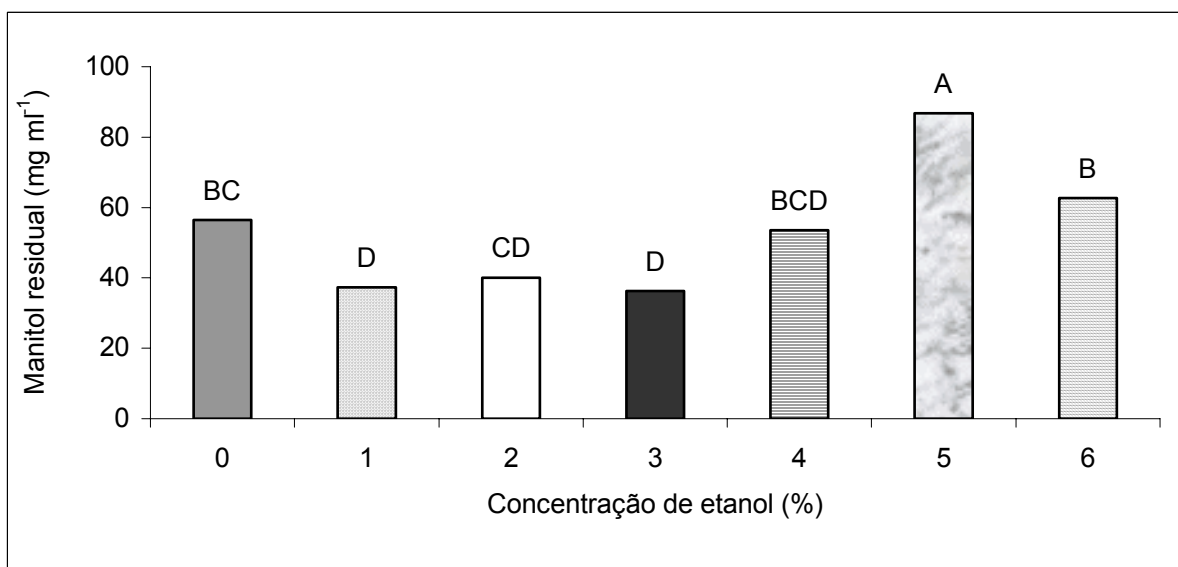


Figura 7. Consumo de manitol por *Aspergillus niger* cultivado em meio MS, adicionado de concentrações crescentes de etanol. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre o consumo de manitol, conforme o valor LSD ($p < 0,05$).

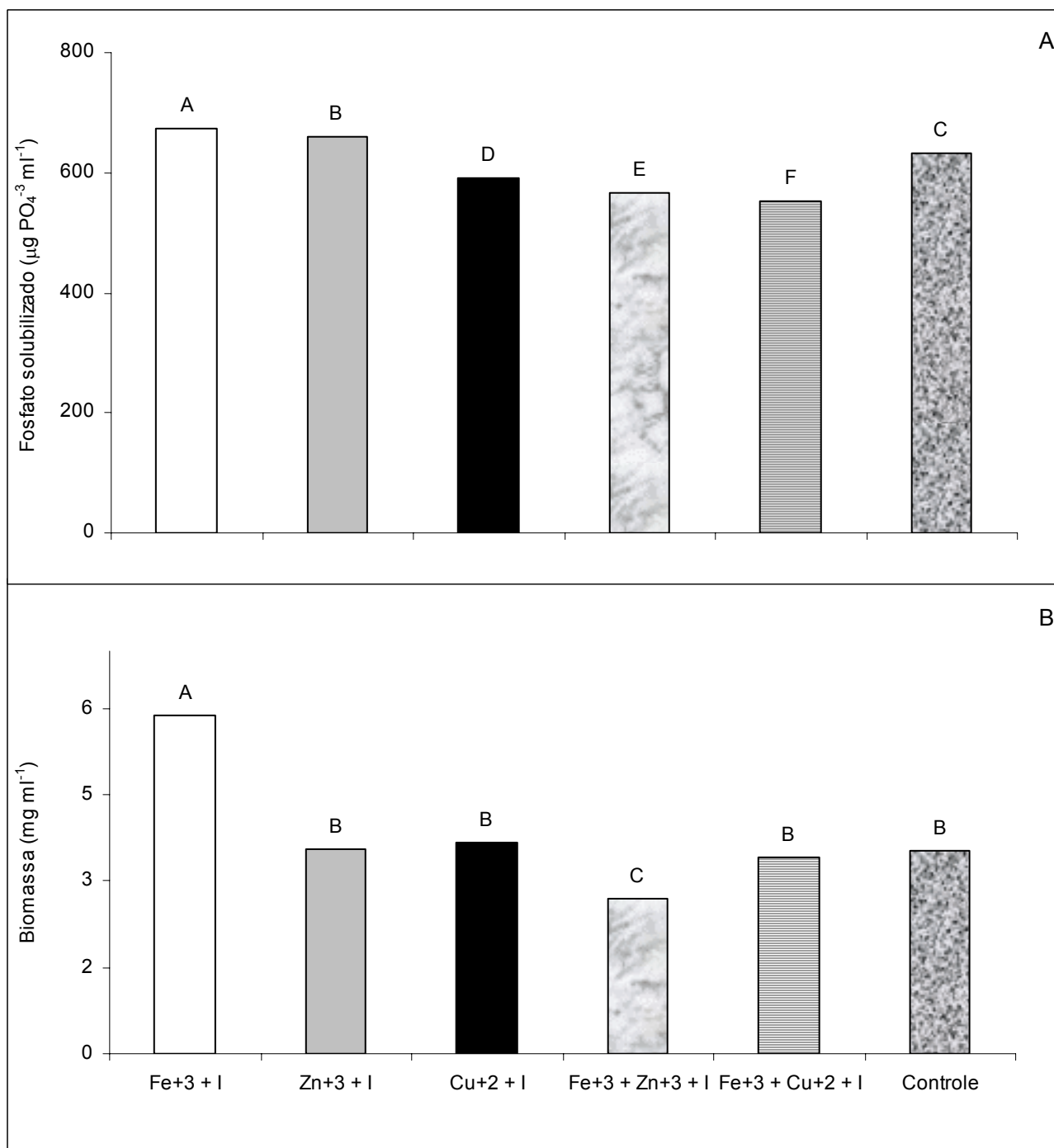


Figura 8. Efeito das combinações dos metais na solubilização de FePO_4 pelo *Aspergillus niger* (I - inóculo). (A) solubilização e (B) biomassa. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre as fontes de metais, conforme o valor LSD ($p < 0,05$).

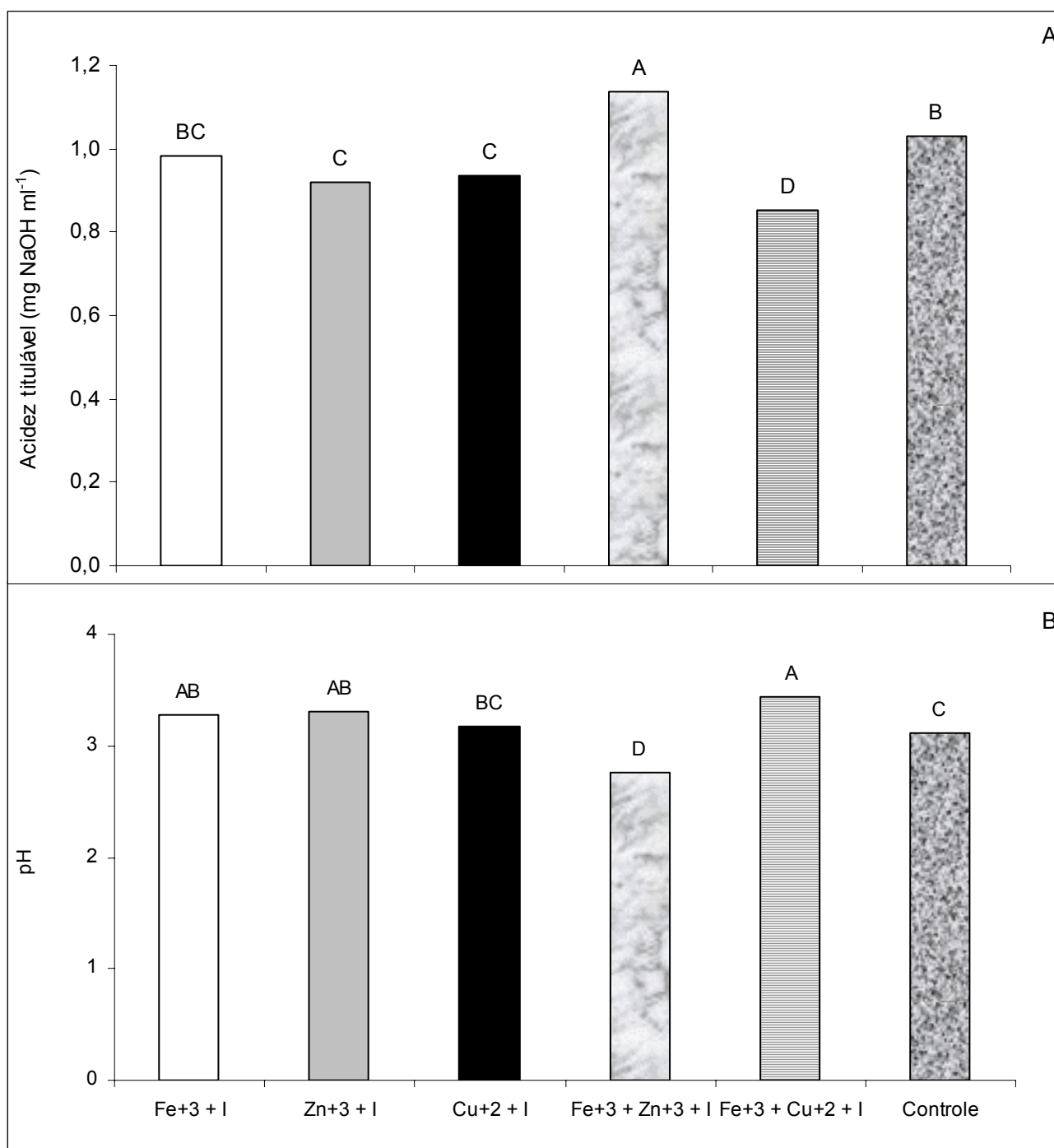


Figura 9. Efeito das combinações dos metais na acidez titulável (A) produzida pelo *Aspergillus niger* (I - inóculo) e no pH (B) em meio contendo FePO₄. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre as fontes de metais conforme o valor LSD ($p < 0,05$).

Analisando os resultados da Figura 9A, foi observado que a maior quantidade de acidez titulável produzida foi de 1,44 mg NaOH mL⁻¹, determinada com a combinação do Fe⁺³ + Zn⁺³. Este tratamento diferenciou-se significativamente dos demais e coincidiu com a menor diminuição do pH 2,76 (Figura 9B).

4.10 Efeito da combinação de metais e metanol na solubilização de FePO₄

Com o intuito de aumentar a solubilização do FePO₄ pelo *A. niger* os metais FeCl₃.6H₂O, FeSO₄.7H₂O, CuSO₄.5H₂O e ZnSO₄.7H₂O foram combinados com metanol (Figura 10 e 11). Com a adição somente do metanol no meio de cultura, o *A. niger* solubilizou mais de 1100 µg PO₄³⁻ mL⁻¹ de FePO₄ (Figura 10A). As maiores produções da biomassa microbiana (Figura 10B) foram observadas nas combinações com Cu⁺² + metanol e Fe⁺² + metanol com 3,86 e 3,75 mg mL⁻¹, e as menores produções foram obtidas no meio adicionado com Fe⁺³ + metanol ou somente metanol.

Os dados relacionados com a produção da acidez titulável (Figura 11A) demonstraram que não houve diferenças significativas entre os tratamentos suplementados com metais e metanol. Mas em todos os tratamentos a produção foi significativamente maior que o controle. A produção de ácidos variou de 1,62 a 1,93 mg NaOH mL⁻¹. O menor valor de pH (Figura 11B) foi determinado no meio suplementado com Cu⁺² + metanol com 3,96, diferenciando-se dos demais tratamentos.

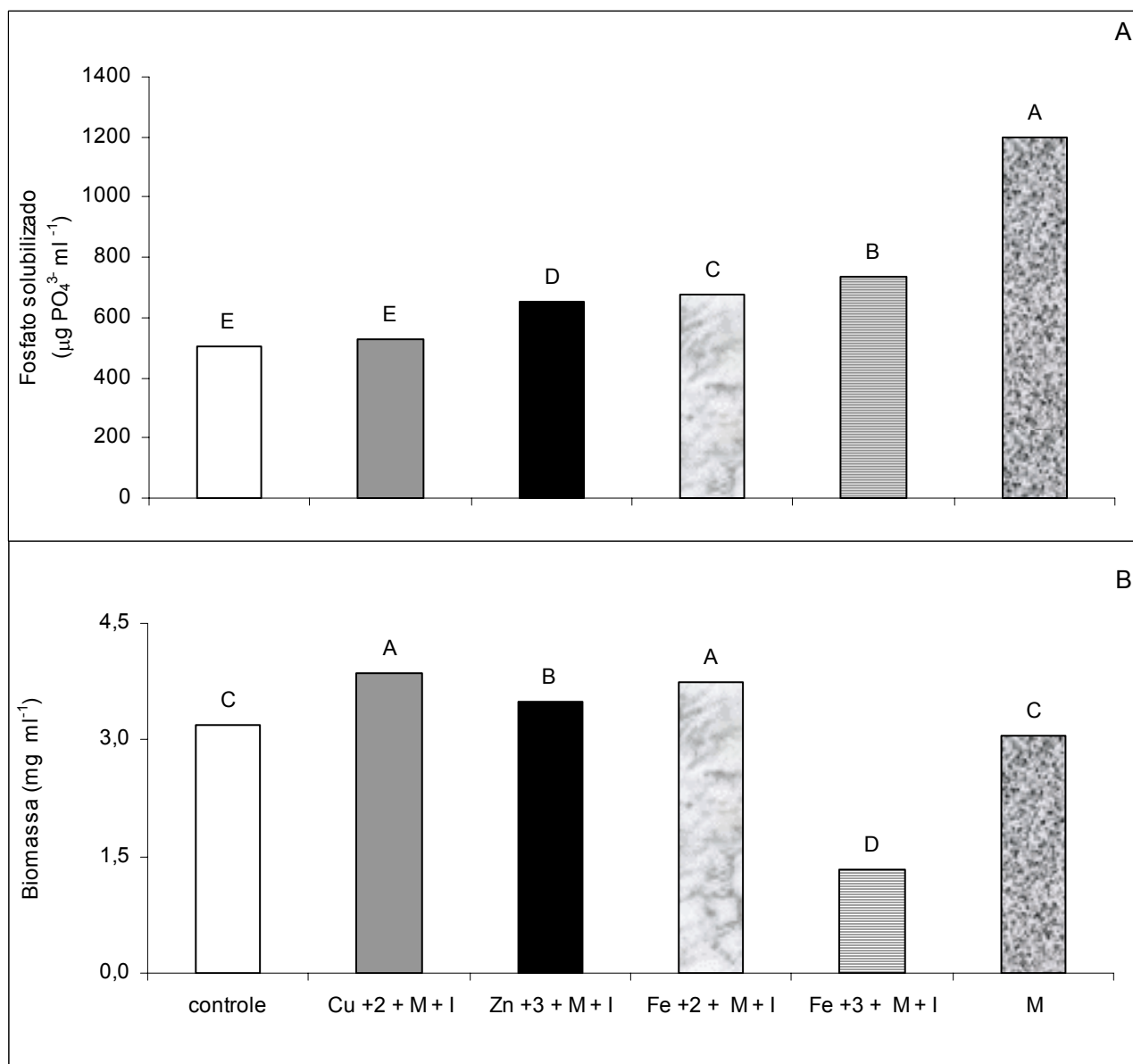


Figura 10. Efeito das combinações dos metais e metanol na solubilização (A) e a biomassa (B) do *Aspergillus niger* (I-inóculo) em meio contendo FePO_4 . Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre as combinações dos metais e metanol, conforme o valor LSD ($p < 0,05$).

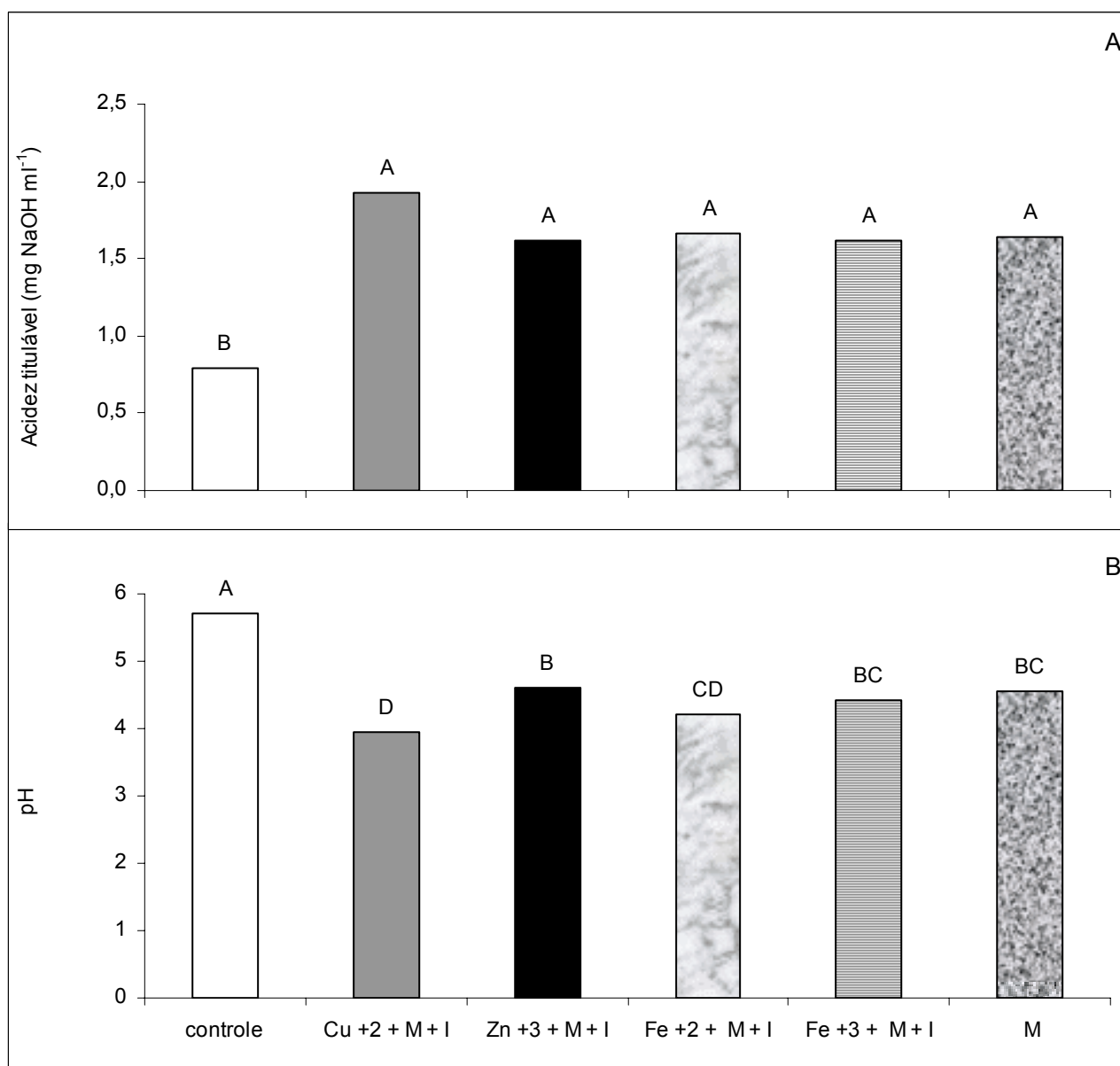


Figura 11. Efeito das combinações dos metais e metanol na acidez titulável (A) produzida pelo *Aspergillus niger* (I- inóculo) e no pH (B) em meio contendo FePO_4 . Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre as combinações dos metais e metanol, conforme o valor LSD ($p < 0,05$).

V. DISCUSSÃO

5.1 Produção e inoculação de pellets do *A. niger* na solubilização de fosfatos

Em meio de cultura agitado, o fungo *A. niger* cresce formando pequenas esferas (pellets) contendo hifas que se entrelaçam na superfície e um centro oco. De acordo com RYOO & CHOI (1999), a formação de pellets por *A. niger* é do tipo coagulante no qual os esporos são coagulados no início do cultivo cedo e as hifas formadas sobrepõem umas as outras para formar os pellets.

DYNESEN & NIELSEN (2000) reportaram que a produção dos pellets por *Aspergillus nidulans* diminuiu com o aumento da quantidade de ácido no meio de cultura porque em pH baixo, os conídios carregam cargas altamente positivas que inibem a coagulação.

De acordo com XU et al. (2000) alguns parâmetros influenciam a formação dos pellets como: a quantidade do inóculo, o pH do meio de cultura, a agitação, a composição do meio, sendo que o parâmetro mais importante é a quantidade do inóculo para o desenvolvimento do tamanho dos pellets.

Neste estudo, pellets com diâmetro maior que 4 mm não limitaram a habilidade de solubilização do fungo. Contudo, as condições ótimas de produção de destruxina B por *Metarhizium anisopliae* foram dependentes do tamanho dos pellets (FENG et al., 2003). IWAHORI et al. (1995) obtiveram a produção de pellets com diâmetro variando entre 2 a 10 mm utilizando o fungo *A. niger* em meio de Czapek - Dox, durante 5 dias de incubação com agitação, como também a produção de ácidos orgânicos.

Resultados semelhantes foram obtidos utilizando pellets ou micélio livre de *Aspergillus*. INFANTE MAJOLLI & AGUIRRE (1999) observaram o desenvolvimento do fungo *Aspergillus wentii* em forma de pequenos pellets de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro; a quantidade dos pellets aumentou com o tempo a medida que crescia a produção de ácido cítrico no meio de cultura, e o rendimento de ácido cítrico foi de aproximadamente de 90%.

Os pellets do *A. niger* F111 podem ser de grande importância, uma vez que a produção pode ser obtida com 3 a 4 dias de incubação no meio cultura de Sabouraud.

O reuso de microrganismos constitui importante benefício no processo biológico. Enquanto os esporos livres foram as piores formas utilizadas para a solubilização de FePO_4 , a inoculação de pellets livres possibilitou a produção das maiores quantidades de fosfato solúvel, tanto no uso como no reuso. Resultados semelhantes foram obtidos com os esporos imobilizados porém apenas a partir de seus reusos. Principalmente com o segundo reuso, houve diminuição drástica da quantidade de fosfato solubilizada.

A secreção de ácidos orgânicos é um dos mecanismos que explica a solubilização de fosfatos inorgânicos por *A. niger* (CEREZINE et al., 1988). Portanto, a diminuição da solubilização pode estar relacionada à diminuição da produção de ácido cítrico por esporos de *A. niger* imobilizados em Ca-alginato com o aumento do reuso em decorrência da obstrução dos poros das cápsulas (DEMIREL et al., 2005). VASSILEVA et al. (1998) reportaram que houve diminuição da solubilização por *A. niger* quando esporos foram encapsulados em Ca-alginato mas não em ágar ou k-carrageenan.

Estes relatos explicam os resultados obtidos neste estudo com os esporos imobilizados em Na-alginato. Alguns dos esporos imobilizados incham, outros se aglomeram formando um único pellet e em outros a cápsula se rompe. Com relação às outras formas utilizadas, a limitação da produção de metabólitos é devida à limitação na transferência de nutrientes e oxigênio para os interior dos pellets (WHITTILER et al., 1986 in PAMBOUKAIN). Os pellets livres, quando inoculados, aumentam de tamanho mantendo o formato esférico ou produzem outros pellets menores devido à desagregação de hifas (SMITH et al., 1990). Os pellets imobilizados mantêm a forma original, mas alguns de rompem. Os esporos livres formam pequenos pellets (< 1 mm) no seu uso e reuso. Contudo, neste estudo, o tamanho dos pellets não seria um fator limitante porque foi mostrado que a maior solubilização ocorreu com pellets com tamanho > 4 mm.

5.2 Efeito da fonte de nitrogênio e carbono na solubilização de AlPO_4 , FePO_4 e CaHPO_4

A. niger é um fungo heterotrófico que depende de uma fonte de C para seu crescimento e atividade. Portanto, a quantidade de ácidos produzidos e a diminuição do pH do meio de cultura dependem da produção de micélio, e como consequência, a solubilização de diferentes quantidades de AlPO_4 , FePO_4 e de CaHPO_4 . O crescimento foi influenciado tanto pelas fontes de C e de N como pelo fosfato utilizado no meio de cultura. Por conseguinte, o fungo utiliza diferentes mecanismos para solubilizar fosfatos inorgânicos, como ficou claro neste trabalho, da produção de ácidos, da diminuição do pH e do seu crescimento. Esses mecanismos têm sido relatados por diversos autores (ILLMER & SCHINNER, 1995; REDDY et al., 2002; BARROSO & NAHAS, 2005).

A secreção de ácidos orgânicos é um dos principais mecanismos assim como a diminuição do pH que explica a solubilização de fosfatos inorgânicos (CEREZINE et al., 1988; REYES et al., 1999; WAHID & MEHANA, 2000). Em decorrência da diferenciação da ação quelantes dos ácidos orgânicos, diferentes graus de solubilização podem ser esperados.

ILLMER et al., (1995) relataram que a produção de ácidos por *A. niger* é um mecanismo importante para solubilização de fosfatos. SAYER & GADD (1997) relataram que o ácido cítrico é o maior produto no processo de solubilização de fosfatos. Outros ácidos como oxálico, glicólico, succínico e glucônico são secretados pelo fungo (SPERBER, 1958). Estes ácidos formam complexos com íons metálicos como Ca, Fe e Al liberando fosfato solúvel.

Entre as fontes de nitrogênio, o nitrato de amônio, ácido glutâmico e a glicina foram as fontes que proporcionaram maior solubilização dos FePO_4 , AlPO_4 e CaHPO_4 de 28, 56 e 70,5 % respectivamente. Esses resultados divergem dos obtidos por CEREZINE et al. (1988) que observaram maior solubilização de fosfato na presença de sais de amônio com 66 a 70% de solubilização. WHITELAW et al. (1999) constataram alta solubilização de CaHPO_4 e AlPO_4 em meio com adição de cloreto de amônio decorrente da excreção de prótons (H^+) resultante da assimilação de NH_4^+ e produção

de ácidos orgânicos. No entanto, obtiveram pouca solubilização do FePO_4 , devido à baixa solubilidade do mineral.

Segundo SILVA FILHO & VIDOR (2001), independentemente da fonte de nitrogênio, cloreto de amônio e nitrato de potássio nenhum microrganismo isolado do solo entre os quais os fungos do gênero *Aspergillus* foi capaz de solubilizar fosfato de ferro, mas por outro lado os mesmos fungos tiveram o crescimento estimulado pelas fontes de nitrogênio.

No estudo realizado com fontes de carbono, foi constatado que as maiores quantidades de fosfatos solubilizados foram observados no meio adicionado com maltose, manitol e d-galactose. A solubilização dos FePO_4 , AlPO_4 e CaHPO_4 foram de 26,9, 60, e 60,1% respectivamente, resultados diferentes foram obtidos por SILVA FILHO & VIDOR (2000) que constataram alta solubilização de fosfatos por fungo do gênero *Aspergillus* na presença de xilose, glicose, frutose e sacarose.

5.3 Efeito dos álcoois na solubilização de FePO_4 e CaHPO_4

Alguns fatores podem ser considerados que influíram na solubilização de FePO_4 e CaHPO_4 pelos álcoois. Acidez titulável, consumo de açúcar e massa seca aumentaram enquanto os valores de pH diminuíram até as concentrações ótimas. As seguintes conclusões podem ser delineadas: 1º) a solubilização de fosfatos inorgânicos depende de vários fatores estudados conforme tem sido relatado por vários autores (LAPEYRIE et al., 1991; NAHAS, 1996; REYES, et al., 1999; FILHO & VIDOR, 2000); 2º) os álcoois utilizados devem ter influenciado o metabolismo do manitol, utilizando como fonte de C, e conseqüentemente o crescimento e a produção de ácido cítrico pelo fungo. Nenhum efeito resultante da utilização de álcoois no meio de cultura na solubilização de FePO_4 e CaHPO_4 tem sido reportado. É possível que aumentem a permeabilidade celular favorecendo a liberação de ácidos orgânicos (YAYKASH et al., 2005). NAVARATNAM et al. (1998) sugeriu que o manitol estimularia a produção ou a secreção de ácido cítrico por *A. niger*. Efeito estimulante do etanol e metanol tem sido reportado por SAHA et al. (1999) e Hang & WOODAMS (1998).

Porém, acima da concentração ótima dos álcoois utilizados, acidez titulável, consumo de açúcar e massa seca diminuíram e o pH aumentou. Este efeito inibitório pode ser devido ao fato de que os álcoois em altas concentrações inibem enzimas da membrana (GRISHAM & BARNETT, 1972). HAQ et al. (2002) atribuíram o decréscimo da produção de ácido cítrico à um distúrbio do metabolismo fúngico e da morfologia celular. Foi mostrado em bactérias que altas concentrações de álcoois alteram a composição de ácidos graxos em resposta a interações físico-químicas destes álcoois com lipídios da membrana citoplasmática (INGRAM, 1976).

A quantidade ótima de metanol ou etanol para a produção de ácidos, depende do microrganismo e da composição do meio, geralmente varia entre 1 a 3% (GREWAL & KALRA, 1995), por outro lado, o aumento da concentração de álcoois no meio inibe a produção de ácidos (EI-HOLI & AI-DELAIFY, 2003).

Em conclusão, o metanol favoreceu a solubilização do FePO_4 quando utilizado isolado ou associado aos metais no meio de cultura. Em decorrência deste efeito, a solubilização do FePO_4 foi aumentada com a adição de Fe^{3+} e, além do mais, o efeito inibitório do Zn^{2+} e do Fe^{2+} foi revertido. Como observado na Tabela 42, vários ácidos orgânicos foram responsáveis pela solubilização do FePO_4 neste estudo, tendo sido encontrados o oxálico, cítrico, tartárico, maléico, succínico, láctico e glutâmico no meio suplementado com manitol como fonte de carbono. No entanto, alguns autores atribuíram ao ácido cítrico como principal responsável pela solubilização dos fosfatos inorgânicos (Tabela 42).

5.4 Efeito dos metais na produção de ácidos

O efeito de íons metálicos na solubilização de FePO_4 e CaHPO_4 não tem sido relatado na literatura. Aumento do crescimento de *A. niger* e da produção de ácido cítrico foram encontrados quando CuSO_4 foi adicionado em meio baseado em vinhaça (HAQ et al., 2002).

Tabela 42. Ácidos orgânicos produzidos pelo *Aspergillus niger* na solubilização de fosfatos inorgânicos.

Ácidos	Autores
Oxálico, cítrico, tartárico, maleico, succínico, lático, glutâmico	Resultados deste estudo (2006)
Cítrico	SPERBER (1958)
Cítrico	TSAY & TO (1987)
Itacônico	KAUTOLA et al. (1989)
Succínico, citrato e oxálico	SALIH et al. (1989)
Glucônico, lático e citrato	ILLMER & SCHINNER (1992)
Cítrico	RUIJTER et al. (1997)
Glucônico	KARA & BOZDEMIR (1998)
Cítrico	SANKPAL et al. (2001)
Oxálico	MANDAL & BANERJEE (2005)
Cítrico	DEMIREL et al. (2005)

O crescimento do *A. niger* inclui o requerimento de diminutas quantidades de zinco, ferro, cobre e manganês, em adição de carbono, nitrogênio, fósforo, potássio e magnésio (TOMLINSON et al., 1950). No entanto FASIN et al. (2002) constataram que a presença de compostos de metais insolúveis necessariamente não estimulam a produção de ácidos para a solubilização de fosfatos de metais.

Possivelmente, a maior solubilização de FePO_4 ou CaHPO_4 encontrada em meio adicionado de Fe^{2+} ou Fe^{3+} seja o resultado da produção de ácido cítrico, embora a acidez titulável tenha sido menor que o controle. Outra possibilidade é que o fungo apresentou menor crescimento que o controle e menor absorção do fosfato solubilizado. Apenas Fe^{2+} aumentou a produção de ácido cítrico quando concentrações

crescentes de Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} ou Mg^{2+} foram adicionados à resíduo de abacaxi (TRAN et al., 1998).

VI. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, foi possível obter as seguintes conclusões:

- 1- Os pellets formados no meio de Sabouraud foram os que mais solubilizaram o FePO_4 .
- 2- A produção de pellets do *A. niger* é de grande importância, sendo que os pellets podem ser obtidos com 3 a 4 dias e reutilizados.
- 3- Os pellets livres ou imobilizados promoveram maior solubilização de FePO_4 em meio de cultura e maior produção de CO_2 no solo.
- 4- A glicina, nitrato de amônio e l-glutâmico foram as fontes de nitrogênio que mais favoreceram a solubilização dos fosfatos inorgânicos pelo *A. niger*.
- 5- Os açúcares manitol, maltose e d-galactose foram as fontes de carbono que mais promoveram a solubilização dos fosfatos inorgânicos pelo *A. niger*.
- 6- Os álcoois nas concentrações 3 e 4% favoreceram o aumento da solubilização dos fosfatos inorgânicos, principalmente o FePO_4 .
- 7- Os metais $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ favoreceram a solubilização dos fosfatos inorgânicos.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMCZAK, M.; BEDNARSKI, W. Enhanced activity of intracellular lipases from *Rhizomucor miehei* and *Yarrowia lipolytica* by immobilization on biomass support particles. **Process Biochem.**, v.39, p.1347-1361, 2004.

ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. New York: John Wiley, 1977 v.1, p.333-339.

ALLEONI, L. R. F. Disciplina LSN 5877: Química de solos com carga variável. Pós-Graduação em solos e nutrição de plantas. Piracicaba: ESALQ, 2003. 50p.

AMES, B. N. Assay of inorganic phosphate and phosphatases. **Methods Enzymol.**, v.8, p.115-116, 1966.

ANGELOVA, M.; SHEREMETSKA, P.; LEKOV, M. Enhanced polymethylgalacturonase production from *Aspergillus niger* 26 by calcium alginate immobilisation. **Process Biochem.**, v. 33, p.299-305, 1998.

ASEA, P. E. A.; KUCEY, R. M. N.; STEWART, J. W. B. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. **Soil Biol. Biochem.**, v.20, p.459-464, 1988.

BARROSO, C. B. Solubilização microbiana de fosfatos de ferro e de alumínio. 2002. 84p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Faculdade de Ciências e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

BARROSO, C. B.; OLIVEIRA, L. A. Ocorrência de bactérias solubilizadoras de fosfato de cálcio nas raízes de plantas na Amazônia Brasileira. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 25, p. 575-581, 2001.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. **Appl. Soil Ecol.**, v.29, p. 73-83, 2005

BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnol. Advances**, v.16, p. 4, p.729-770, 1998.

BEEVER, R. E.; BURNS, D. J. W. Phosphorus uptake, storage and utilization by fungi. **Adv. Bot. Res.**, v.8, p.127-219, 1980.

BIZUKOJE, M.; LEDAKOWIEZ, S. The kinetics of simultaneous glucose and fructose uptake and product formation by *Aspergillus niger* in citric acid fermentation. **Process Biochem.**, v. 39, p.2261-2268, 2004.

BOLAN, N. S.; ROBSON, A. D.; BARROW, N. J. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhiza on the availability of iron phosphates to plants. **Plant Soil**, v.99, p.401-410, 1987.

BRADY, N. C.; WEIL, R. R. **The nature and properties of soils**, 13th ed. New Jersey Prentice Hall 2002.

CEREZINE, P. C.; NAHAS, E.; BANZATTO, D. A. Soluble phosphate accumulation by *Aspergillus niger* from fluorapatite. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.29, p.501- 505, 1988.

COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A.; HOFER, D.; GUBITZ, G.M. 2004 Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilisation of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourization of textile dyes. **Bioresource Technology**, v. 95, p.67-72, 2004.

CUNNINGHAM, J. E.; KUIACK, C. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.58, n.5, p.1451-1458, 1992.

CHABOT, R.; ANTOUN, H.; CESCAS, M.P. Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. **Can. J. Microbiol.**, v.39, p.941-947, 1993.

CHAUDHARY, K. et al. Citric acid production from Indian cane molasses by *Aspergillus niger* under solid state fermentation conditions. **J. Fermentation**, v.56, p.554-557, 1978.

DAS, K.; KATIYAR, V.; GOEL, R. 'P' solubilization potential of plant growth promoting *Pseudomonas mutants* at low temperature. **Microbiol. Research.**, v.158, p.359-362, 2003.

DATTA, M.; BANIK, S.; GUPTA, R.K. Studies on the efficacy of a phytohormone producing phosphate solubilizing *Bacillus firmus* in augmenting paddy yield in acid soils of Nagaland. **Plant Soil**, v.69, p.365-373, 1982.

DATTA, M.; BANIK, S.; LASKAR, S. Effect of inoculation of phosphate-dissolving bacteria on rice (*Oryza sativa*) in acid soil. **Indian J. Agric. Sci.**, v.62, p. 482-485, 1992.

DEMIREL, G; KURSAT, O. Y.; AHMET, Y. The production of citric acid by using immobilized *Aspergillus niger* A-9 and investigation of its various effects. **Food Chemistry**, v.89, p.393-396, 2005.

DI SIMINE, C. D.; SAYER, J. A.; GADD, G. M. Solubilization of zinc phosphate by a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from a forest soil. **Biol. Fertil. Soils**, v.28, p. 87-94, 1998.

DIXON-HARDY, J. E. et al. Influence of the carbon, nitrogen and phosphorus source on the solubilization of insoluble metal compounds by *Aspergillus niger*. **Mycol. Res.**, v.102, p.1050-1054, 1998.

DORNENBURG, H. Evaluation of immobilisation effects on metabolic activities and productivity in plant cell processes. **Process Biochemistry**, v.39, p.1369-1375, 2004.

DYSEN, J.; NIELSEN, J. Surface hydrophobicity of *Aspergillus nidulans* conidiospores and its role in pellet formation. **Biotechnol. Prog.**, v.19, p.1049 - 1052, 2000.

EL-HOLI, M. A.; AL-DELAIFY, K. S. Citric acid production from whey with sugars and additives by *Aspergillus niger*. **African J. Biotechnol.** v.10, n.10, p.356-359, 2003.

FASIN, F.; AHMED, N.; PARSONS, R.; GADD, M. G. Solubilization of zinc salts by a bacterium isolated from the air environment of a tannery. **FEMS Microbiol. Letters**, v.213, p.1-6, 2002.

FENG, K. et al. Effect of fungal pellet size on the high yield production of destruxin B by *Metarhizium anisopliae*. **Enzyme Microbial Technology**, v.34, p.22-25, 2004.

FREITAS, J. R. et al. Estimativa da atividade da microflora heterotrófica em solo Terra Roxa Estruturada usando respirometria com glicose-¹⁴C. **Energ. Nucl. Agric.**, v. 1, n.2, p. 123-130, 1979.

GAIND, S.; GAUR, A. C. Shelf life of phosphate-solubilizing inoculants as influenced by type of carrier, high temperature, and low moisture. **Can. J. Microbiol.**, v.36, p.846-849, 1990.

GOLDSTEIN, A. H. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. **Am. J. Alter. Agric.**, v.1, p.51- 57, 1986.

GREWAL, H. S.; KALRA, K. L. Fungal production of citric acid. **Biotechnol. Advances**, v.13 n.2, p.209-234, 1995.

GRISHAM, C.M.; BARNETT, R. E. The interrelationship of membrane and protein structure in the function of the ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-activated ATPase. **Biochim. Biophys. Acta**, v.266, p.613-624, 1972.

HAMMOND, L. L.; CHIEN, S. H.; MOKWUNYE, A. U. Agronomic value of unacidulated and partially acidulated phosphate rocks indigenous to the tropics. **Adv. Agron.**, v.40, p.89-140, 1986.

HANG, Y. D.; E. E. WOODAMS. Production of citric acid from corncobs by *Aspergillus niger*. **Biores. Technology**, v.65, p.251-253, 1998.

HAQ, I. et al. Citric acid fermentation by mutant strain of *Aspergillus niger* GCMC-7 using molasses based medium. **J. Biotech.**, v.5, n.2, p. , 2002.

HAQ, I. U; ALI, S.; QADEER, M.A.; IQBAL, J. Stimulatory effect of alcohols (methanol and ethanol) on citric acid productivity by a 2-deoxy D-glucose resistant culture of *Aspergillus niger* GCB-47. **Bioresource Technol.**, v.86, p.227-233, 2003.

HOFFLAND, E.; FINDENEGG, G. R.; NELEMANS, J. A. Solubilization of rock phosphate by rape. I. Evaluation of the role of the nutrient uptake pattern. **Plant Soil**, v.113, p.155-160, 1989.

ILLMER, P.; SCHINNER, F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. **Soil Biol. Biochem.**, v.24, p. 389-395, 1992.

ILLMER, P.; SCHINNER, F. Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms. **Soil Biol. Biochem.**, v.27, n.3, p.265-270, 1995.

INFANTE MAJOLLI, M. V.; AGUIRRE, S. N. Efecto de metales traza sobre la morfología celular, actividad enzimática y producción de ácido cítrico en una cepa de *Aspergillus wentii*. **Rev. Argentina Microbiol.**, v.31, p.65-71, 1999.

INGRAM, L O. Adaptation of membrane lipids to alcohols. **J. Bacteriol.**, v.125, n.2. p. 670–678, 1976.

IWAHORI, K. et al. Substrate permeability in pellets formed by *Aspergillus niger*. **J. Fermentation Bioengineering**, v.79, p.387 - 390, 1995.

JAGNOW, G.; DAWID, W. **Biotecnología: introducción com experimentos modelo**. Zaragoza-Espanã: Acribia, 1991. 466p.

JONES, D. et al. Phosphate solubilizing fungi in a scottish upland soil. **Mycol. Res.**, v.95, p.1090-1093, 1991.

JIANLONG, W. et al. The radial distribution and bioactivity of *Pseudomonas*. sp immobilized in calcium alginate gel beads. **Process Biochem.**, v.35, p.465-469, 1999.

JURINAK, J. J. et al. The role of calcium oxalate in the availability of phosphorus in soils of semiarid regions: a thermodynamic study. **Soil Sci.**, v.142, p.255-261, 1986.

KANABO, I. A. K.; GILKES, R. J. The role of soil pH in the dissolution of phosphate rock fertilizers. **Fert. Res.**, v.12, p.165-174, 1987.

KARA, A.; BOZDEMIR, T. O. Optimization of the growth parameters of *Aspergillus foetidus*. **Acta Biotechnol.**, v.18, n.4, p.327-338, 1998.

KER, J. C. Mineralogia sorção e desorção de fosfato, magnetização e elemento traços de Latossolos do Brasil. 1995. 181f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, 1995.

KUBICEK, C.P.; ROHR, M. Influence of manganese on enzyme synthesis and citric acid accumulation in *Aspergillus niger*. **European J. Appl. Microbiol.**, v.4, p.167-175, 1977.

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. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.53, p.2699-2703, 1987.

KUCEY, R.M.N. Effect of *Penicillium bilaji* on the solubility and uptake of P and micronutrients from soil by wheat. **Can. J. Soil Science**, v. 68, p.261-270, 1988.

LAPEYRIE, F.; RANGER, J.; VAIRELLES, D. Phosphate-solubilizing activity of ectomycorrhizal fungi *in vitro*. **Can. J. Bot.**, v.69, p.342-346. 1991.

LIDE, D. R.; FREDERIKSE, H. P. R. (Ed.). **CRC handbook o chemistry and physics**. Boca Raton: CRC, 1998. não pag.

MANDAL, S.K.; BANERJEE, P.C. Submerged production of oxalic acid from glucose by immobilized *Aspergillus niger*. **Process Biochem.**, v.40, p.1605-1610, 2005.

MEDVEDEFF, M.G. et al. Comparación *in vitro* de la acción fungicida de solución saturada de azúcar y nitrato de econazol. **Ars Pharmaceutica**, v.42, p.203-207, 2001.

MBA, C. C. Rock phosphate solubilizing streptosporangium isolates from cast of tropical earthworms. *Soil Biol. Biochem.*, v.29, p.381-385, 1997.

MINHONI, M. T. A.; CARDOSO, E. J. B. N.; EIRA, A. F. Efeito de cinco tipos de matéria orgânica na solubilização microbiana de fosfato de rocha. **Rev. Bras. Ciên. Solo**, Campinas, v.15, p.29-35, 1991.

MOFIDI, N.; AGHAL-MOGHADAM, M.; SARBOLOUKI, M. N. Mass preparation and characterization of alginate microspheres. **Process Biochem.**, v.35, p.885-888, 2000.

McLAUGHLIN, M.J.; ALSTON, A.M.; MARTIN, J.K. Phosphorus cycling in wheat-pasture rotations. II. Role of the microbial biomass in phosphorus cycling. **Austr. J. Soil Res.**, v.26, p.333-342, 1988.

NAHAS, E. **Ciclo do fósforo: transformações microbianas**. Jaboticabal – SP: FUNEP, 1991. 67p.

NAHAS, E.; ASSIS, L. C. Solubilização de fosfatos de rocha por *Aspergillus niger* em diferentes tipos de vinhaça. **Pesqui. Agropec. Bras.**, v.27, n.2, p.325-331, 1992.

NAHAS, E.; CENTURION, J. F.; ASSIS, L. C. Microrganismos solubilizadores de fosfatos e produtores de fosfatases de vários solos. **Rev. Bras. Ci. Solo**, v.18, p.43-48, 1994a.

NAHAS, E. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. **World J. Microbiol. Biotech.**, v.12, p.567-572, 1996.

NAHAS, E. Solubilização microbiana de fosfatos e de outros elementos. In: INTER-RELAÇÃO FERTILIDADE BIOLOGIA DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 1999, LAVRAS. *Anais...* Lavras: 1999. p. 467-486.

NARLOCH, C.; OLIVEIRA, V. L.; ANJOS J. T.; SILVA FILHO, G. N.. Resposta da cultura do rabanete à inoculação de fungos solubilizadores de fosfatos. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.37, p.841-845, 2002.

NAVARATNAM, P.; ARASARATNAM, V.; BALASUBRAMANIAM, K. Channelling o glucose by methanol for citric acid production from *Aspergillus niger*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.14, p.559-563, 1998.

NAUTIYAL, C. S. Na efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiol. Letters**, v.170, p.265 -270, 1999.

PAPAGIANNI, M.; MATTEY, M. Physiological aspects of free and immobilized *Aspergillus niger* cultures producing citric acid under various glucose concentrations. **Process Biochem.**, v.39, p.1963 -1970, 2004.

PEIX, A. et al. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. **Soil Biol. Biochem.**, v.33, p.103-110, 2001.

PLENCHETTE, C.; STRULLU, D. G. Long-term viability and infectivity of intraradical forms of *Glomus intraradices* vesicles encapsulated in alginate beads. **Mycol. Res.**, v.107, p.614-616, 2003.

RAIJ, B. VAN.; VAN DIEST, A. Phosphate supplying power of rock phosphates in na oxisol. **Plant Soil**, v.55, p.97-104, 1980.

RAIJ, B.V. Importância do fósforo na agricultura brasileira - atual e futura. In: ENCONTRO NACIONAL DE ROCHA FOSFÁTICA, 3., 1986, Brasília. *Anais...* Brasília: 1986. p.376-387.

REDDY, M. S. et al. Biosolubilization of poorly soluble rock phosphates by *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*. **Biores. Techn.**, v.84, p.187-189, 2002.

REYES, I. et al. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV- induced mutants. **Microbiol. Ecology**, v.28, p.281-290, 1999.

REYES, I. et al. Characteristics of phosphate solubilization by an isolate of a tropical *Penicillium rugulosum* and two UV- induced mutants. **Microbiol. Ecology**, v.28, p.291-295, 1999b.

REYES, I. et al. Solubilization of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV-induced mutants of *Penicillium rugulosum*. **Soil Biol. Biochem.**, v.33, p.1741-1747, 2001.

REZENDE, L. A. Transformações microbianas do carbono, nitrogênio e fósforo em solos tratados com levedura. 2002. 92p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

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

ROOS, W.; LUCKENER, M. Relationships between proton extrusion and fluxes of ammonium ions and organic acids in *Penicillium cyclopium*. **J. Gen. Microbiol.**, v.130, p.1007-1014, 1984.

RUIJTER, G. J.G.; PANNEMAN, H.; VISSER, J. Overexpression of phosphofructokinase and pyruvate kinase in citric acid-producing *Aspergillus niger*. **Biochim. Biophysica Acta**, v.1334, p.317-326, 1997.

RYOO, D.; CHOI, C. S. Surface thermodynamics of pellets formation in *Aspergillus niger*. **Biotechnol. Lett.**, v.21, p.97-100, 1999.

SAHA, M, L.; SAKAI, Y.; TAKAHASHI, F. Citric acid fermentation by magnetic drum contactor: Use of methanol and ethanol for higher production. **J. Biosci. Bioenginebring**, v.87, p.394-396, 1999.

SALIH, H. M. et al. Availability of phosphorus in a calacareous soil treated with rock phosphate or superphosphate as affected by phosphate-dissolving fungi. **Plant Soil**, v.120, p.181-185, 1989.

SANKPAL, N. V.; JOSHI, A. P.; KULKARNI, B. D. Citric acid production by *Aspergillus niger* immobilized on cellulose microfibrils: influence of morphologi and fermenter conditions on productivity. **Process Biochem.**, v.39, p.1129-1139, 2001.

SAPTCHENKO, L. Melaço em pó – mais um produto para exportação. **SACCHARUM**, v 4, n.16, p.45-52, 1981.

SAYER, J. A.; GADD, G. M. Solubilization and transformation of insoluble inorganic metal compounds to insoluble metal oxalates by *Aspergillus niger*. *Mycol. Res.*, v.10, p.653-661, 1997.

SAYER, J. A.; KIERANS, M.; GADD, G. M. Solubilisation of some naturally occurring metal-bearing minerals, limescale and lead phosphate by *Aspergillus niger*. **FEMS Microb. Letters**, v. 154, p. 29-35, 1997.

SESHADRI, S. et al. Solubilization of inorganic phosphates by *Azospirillum halopraeferans*. **Current. Science**, v.79, n.5, p.565-567, 2000.

SHENBAGARATHAI, R. Isolation and characterization of mutants of *Rhizobium* SBS-R100 symbiotic with *Sesbania procumbes*. **Soil Biol. Biochem.**, v.25, n.10, p.1339-1342, 1993.

SILVA FILHO, G. N. Solubilização de fosfatos pela microbiota do solo. 1998. 140p. Tese (Doutorado em Microbiologia)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Rev. Bras. Ci. Solo**, v.24, p.311 - 319, 2000.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.36, p.1495 - 1508, 2001.

SINGH, C. P.; AMBERGER, A. Solubilization and availability of phosphorus during decomposition of rock phosphate enriched straw and urine. **Biol. Agric. Hort.**, v.7, p.261-269, 1991.

SMITH, J. J.; LILLY, M. D.; FOX, R. I. The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. **Biotechn. Bioengineering**, v.35, p.1011-1023, 1990.

SPERBER, J. I. The incidence of apatite- solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. **Aust. J. Agric. Res.**, v.9, p.778-781, 1958a.

STAMFORD, N. et al. Biofertilizers with natural phosphate, sulphur and *Acidithiobacillus* in a soil with low available-P. **Scien. Agricola**, v. 60, p.767-773, 2003.

SUNDARA, B.; NATARAJAN, V.; HARI, K. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. **Field Crops Res.**, v.77, p.43-49, 2002.

SWART, P. H.; DIEST, A.Van. The rock- phosphate solubilizing capacity of *Pueraria javanica* as affected by soil pH, superphosphate priming effect and symbiotic N₂ fixation. **Plant Soil**, v.100, p.135-147, 1987.

TISDALE, S. L.; NELSON, W. L.; BEATON, J. D. **Soil and fertilizers**. New York: Macmillan, 1985. 754p.

TRAN, C.T.; SLY, L.I.; MITCHELL, D. A. Selection of a strain of *Aspergillus* for the production of citric acid from pineapple waste in solid-state fermentation. **World J. Microbiol. Biotechn.**, v.72, p.399-404, 1998.

TRUMPY, H.; MILLIS, N. F. Nutritional requirements of an *Aspergillus niger* mutant for citric acid production. **J. Gen. Microbiol.**, v.30, p.381-293, 1963.

TSAY, S. S.; TO, K.Y. Citric acid production using immobilized conidia of *Aspergillus niger* TMB 2022. **Biotechn. Bioengineering**, v.24, p.297-304, 1987.

VAN VEEN, J. A. et al. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.61, n.2, p.121-135, 1997.

VASSILEVA, M. et al. Application of na encapsulated filamentous fungus in solubilization of inorganic phosphate. **J. Biochn.**, v.63, p.67-72, 1998.

VASSILEVA, M. et al. Effect of encapsulated cells of *Enterobacter* sp on plant growth and phosphate uptake. **Bioresource Technology**, v.67, p.229-232, 1999.

VASSILEV, N. et al. Application of free and Ca-alginate-entrapped *Glomus deserticola* and *Yarrowia lipolytica* in a soil-plant system. **J. Biochn.**, v.91, p.237-242, 2001.

VILLEGAS, J.; FORTIN, J. A. Phosphorus solubilization and pH changes as a result of the interactions between soil bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on a medium containing NH_4^+ as nitrogen source. **Can. J. Bot.**, v.79, p.865-870, 2001.

VORA, M. S.; SHELAT, H. N. Impacto of addition of different carbon and nitrogen sources on solubilization of rock by phosphate-solubilizing micro-organisms. **Indian J. Agric. Sci.**, v. 68, n.6, p.292-294, 1998.

WAHID, O. A. A.; MEHANA, T. A. Impact of phosphate-solubilizing fungi on the yield and phosphorus-uptake by wheat and faba bean plants. **Microbiol. Research**, v.155, n.3, p.221-227, 2000.

WANG, Y. J. Development of new polycations for cell encapsulation with alginate. **Materials Science Engineering C.**, v.13, p.59-63, 2000.

WATANABE, F. S.; OLSEN, S. R. Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and NaHCO_3 extracts from soil. **Soil Sci. Soc. Am. Proc.**, v.29, p. 677-678, 1968.

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

WHITELAW, M. A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. **Adv. Agron.**, v.96, p.99 -151, 2000.

WU, S.C. et al. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. **Geoderma**, v.125, p.155-166, 2005.

XU, D. B.; MADRID, C. P.; RÖHR, M.; KUBICEK, C. P. The influence of type and concentration of the carbon source on production of citric acid by *Aspergillus niger*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.30, p.553-558, 1989.

XU, J. et al. Increased heterologous protein production in *Aspergillus niger* fermentation through extracellular proteases inhibition by pelleted growth. **Biotechnol. Prog.**, v.16, p. 222 - 227. 2000.

YAHYA, A. I.; AL-AZAWI, S. K. Ocorrence of phosphate-solubilizing bacteria in some Iraqi soils. **Pant Soil**, v.117, p.135-141, 1989.

YAYKASH, K. O.; DEMIREL, G.; YASAR, A. Influence of alcohols on citric acid production by *Aspergillus niger* A-9 entrapped in polyacrylamide gels. **J. Food Engineering**, v.70 p.518-522, 2005.

YOUNG, C. C. Effects of phosphorus-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of tree species in subtropical- tropical soils. **Soil Sci. Plant Nutr.**, v.36, p.225-231, 1990.

ZAYED, G. Can immobilization of *B. megaterium* cells in alginate beads protect them against bacteriophages. **Plant Soil**, v.197, p.1-7, 1997.