UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA
Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

"AVALIAÇÃO DA BIOSSOLUBILIZAÇÃO DE POTÁSSIO A PARTIR DE AGROMINERAIS EMPREGANDO FUNGOS FILAMENTOSOS."

Luana de Oliveira Barbosa

Orientadoras:
Profª. D.Sc. Selma Gomes Ferreira Leite – EQ/UFRJ
D.Sc. Maria Inez de Moura Sarquis– IOC/FIOCRUZ

Rio de Janeiro
2011

AVALIAÇÃO DA BIOSSOLUBILIZAÇÃO DE POTÁSSIO A PARTIR AGROMINERAIS EMPREGANDO FUNGOS FILAMENTOSOS.

Luana de Oliveira Barbosa

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de
Processos Químicos e Bioquímicos,
Universidade Federal do Rio de Janeiro, como
parte dos requisitos necessários à obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Orientadoras:
Prof. Dsc. Selma Gomes Ferreira Leite – EQ/UFRJ
D.Sc. Maria Inez de Moura Sarquis– IOC/FIOCRUZ

EQ / UFRJ
Rio de Janeiro
2011

AVALIAÇÃO DA BIOSSOLUBILIZAÇÃO DE POTÁSSIO A PARTIR DE AGROMINERAIS EMPREGANDO FUNGOS FILAMENTOSOS.

Luana de Oliveira Barbosa

Dissertação submetida Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovada por:

_____
Profª. D.Sc. Selma Gomes Ferreira Leite – EQ/UFRJ
(Orientadora – Presidente da Banca)

_____
D.Sc. Maria Inez de Moura Sarquis – IOC/FIOCRUZ
(Orientadora)

_____
Profª. D.Sc. Andréa Medeiros Salgado – EQ/UFRJ

_____
D.Sc. Claudia Duarte da Cunha – CETEM/MCT

_____
D.Sc. Aurea Maria Lage de Moraes – IOC/FIOCRUZ

Escola de Química / UFRJ
Rio de Janeiro
2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Barbosa, Luana de Oliveira.

Avaliação da Biossolubilização de Potássio a partir de Agrominerais Empregando Fungos Filamentosos. Luana de Oliveira Barbosa. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2011.

XVII, 60p.; il.

Orientadoras: Selma Gomes Ferreira Leite e Maria Inez de Moura Sarquis.

Dissertação (mestrado) – UFRJ / Escola de Química, Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2011.

1. Biossolubilização. 2. Potássio. 3. Fungos. 4. Solo. 5. Rochagem. 6. Glauconito. 7. Flogopitito - Tese. I. Título. II. Dissertação
(Mestrado - UFRJ/EQ).

Dedico este trabalho a minha avó Irene,
meu avô Sebastião Lopes de Oliveira
(*in Memorian*), minha mãe Irenice,
meu pai Luiz e meu marido Carlos.
Agradeço por tudo o que
fizeram por mim. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, meu Pai, que me sustenta, fortalece e me dá sabedoria, guiando os meus passos a cada dia.

A minha mãe e meu pai que durante toda minha caminhada me incentivaram e foram meu porto seguro.

A minha irmã, Lílian, meu cunhado, Jean e meu sobrinho, Miguel, por todo o amor.

Ao meu marido Carlos pelo amor e compreensão dedicados, além de toda a ajuda dada no preparo e execução dos experimentos.

Aos meus avós que eu tanto amo.

A toda minha família que sempre estão presentes em minha vida me dando amor, apoio e incentivo.

Aos meus amigos de infância, graduação e pós-graduação pelos momentos de ternura e conforto nos estudos: Flavia Lima, Gisele Costa, Sabrina Dias, Sylviane Charret, Leonardo Ferreira, Raquel Mendonça, Renata, Claudia Affonso e muitos outros que não teria como citar aqui, mas que comigo passaram por muitos momentos difíceis nesta caminhada.

Ao CETEM e a FIOCRUZ, por concederem as suas instalações para a condução dos experimentos deste trabalho e a todos que direta ou indiretamente me ajudaram;

As minhas orientadoras Selma Leite, EQ/UFRJ e Maria Inez, IOC/FIOCRUZ, por acreditarem em mim, pelo valioso auxílio neste trabalho e por me concederem a honra de ser orientada por elas;

Aos meus amigos do CETEM e FIOCRUZ, principalmente à bolsista de Iniciação Científica (CETEM/MCT), Daniele Leonel e ao Doutorando Diego Cara, pela força e imensa ajuda nessa trajetória.

Às Dra. Andréa Rizzo e Claudia Cunha que tanto me auxiliaram no andamento desse trabalho e por toda paciência concedida.

Á Dra. Ana Carolina Paulo Vicente que me introduziu na área da Biologia Molecular e muito me incentivou no campo da pesquisa.

A Escola de Química, à UFRJ e todos os seus docentes por colaborarem em mais uma etapa da minha formação.

A CAPES, pelo apoio financeiro através da bolsa de mestrado.

RESUMO

BARBOSA, Luana de Oliveira. **Avaliação da Biossolubilização de Potássio a partir de Agrominerais Empregando Fungos Filamentosos.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

O território brasileiro é constituído, em sua maior parte, por solos pobres em nutrientes, como o potássio (K). Para manter a atividade agrícola brasileira é necessária a utilização e importação de elevadas quantidades de fertilizantes. Tal situação tende a agravar o déficit da balança comercial brasileira. Por isso, rochas contendo quantidades razoáveis de flogopita ou biotita podem constituir fontes alternativas de potássio para uso agrícola. Neste trabalho, foram isolados e identificados fungos filamentosos provenientes da rizosfera de girassol, os quais foram testados quanto a capacidade de biossolubilização de potássio usando como fonte dois tipos de pó de rochas: glauconito e flogopitito. Foram isolados 10 microrganismos, sendo 5 identificados como fungos filamentosos e 5 como leveduras, dentre os 5 fungos filamentosos dois eram pertencentes ao gênero *Aspergillus*, dois ao gênero *Fusarium* e um ao gênero *Mucor*. Também foi realizada lixiviação química do flogopitito em solução Mehlich-1 para comparação com a lixiviação biológica. Os resultados foram obtidos pelas metodologias de fotometria de chama e absorção atômica. O melhor resultado foi obtido pela metodologia de fotometria de chama após 14 dias (272,6 mg/L), representando 3,65% de K extraído. Durante a lixiviação biológica os isolados foram avaliados em meio de cultura GEL liquido, sem extrato de levedura, suplementado com os dois tipos de pós de rocha. Após 14 dias de incubação, o teor de K foi determinado a partir de alíquotas do meio de cultura através da metodologia de fotometria de chama. Todos os isolados apresentaram bom desempenho na extração de K a partir de glauconito, sendo o isolado GC4A2 (*Fusarium sp*.) eficiente na biossolubilização dos dois tipos de rochas. O potencial dos microrganismos em disponibilizar nutrientes para as plantas a partir dessas fontes, foram avaliados através de novos cultivos de girassol em vasos. A liberação de K variou de acordo com o microrganismo e o tipo de rocha. Os isolados apresentaram potencial para serem utilizados na inoculação de plantas visando à solubilização de K, a partir do flogopito e glauconito. A inoculação de microrganismos solubilizadores de

nutrientes tem potencial como insumo biológico para favorecer a produção agrícola e deve ser alvo de novos estudos visando o desenvolvimento de novas tecnologias que resultem na diminuição de insumos químicos na agricultura.

ABSTRACT

BARBOSA, Luana de Oliveira. **Evaluation of the Biosolubilization of Potassium from Agrominerals Using Filamentous Fungi.** Dissertation (Master in Sciences) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

The Brazilian territory is constituted, in its bigger part, for poor ground in nutrients, as the potassium (K). To keep the Brazilian agricultural activity it is necessary the use and importation of raised amounts of fertilizers. Such situation tends to aggravate the deficit of the Brazilian trade balance. Therefore, rocks containing reasonable amounts of phlogopite or biotite can constitute alternative potassium sources for agricultural use. This study reports results concerning the isolation and identification of filamentous fungi from the rizosfera of sunflower, which were evaluated according to their capacity of the solubilizing potassium using as source two types of rocks, glauconite and phlogopite. During microbial isolation 10 microorganisms were obtained being 5 identified as filamentous fungi and 5 as yeast, among 5 filamentous fungi two species pertaining of *Aspergillus*, two of *Fusarium* and one *Mucor*. Chemical leaching of the flogopitito for comparison with the biological leaching was carried through, the results had been gotten by the methodologies of fotometria of flame and atomic absorption. Optimum result was gotten by the methodology of fotometria of flame after 14 days (272,6 mg/L) representing 3,65% of K. The isolated had been evaluated in medium of culture GEL liquid, without extract of yeast, supplemented with the two dust of rocks. After 14 days of incubation, the proportion of K was determined from aliquot of the medium of culture through the methodology of photometry of flame. The potential of the microorganisms in solubilize nutrient for the plants from these sources, had been studied through new culture of sunflower in vases. The release of K varied in accordance with the microorganisms and the type of rock. All the isolated had presented good performance in the extration of K in glauconito, having been the isolated GC4A2 (*Fusarium sp*.) efficient in the biossolubilização of the two types of rocks. The isolated had presented potential to be used in the inoculation of plants aiming at to the solubilization of K, from the phlogopite and glauconite. Inoculation of nutrient solubilizing microorganisms has a good potential as a biological input to improve agriculture production and must be the target of new studies aiming to develop new technologies able to reduce the use of chemicals in agriculture.

Lista de Tabelas

Tabela 3: Características físico-químicas e de fertilidade do solo usado nos cultivos.....20

Tabela 4: Composição do meio GEL 22

Tabela 4.1: Composição do meio AGAR SABOURAUD (SAB).....24

Tabela 4.2: Composição dos meios utilizados e as linhagens isoladas testadas nos ensaios de biossolubilização.....26

Tabela 5.1: Concentração (%) dos elementos determinados na amostra de glauconita.....32

Tabela 5.2: Composição elementar da amostra de flogopitito (%peso) expressa em óxidos.....33

Tabela 5.3: Isolados obtidos da rizosfera de girassol.....34

Tabela 5.4: Identificação dos isolados fúngicos.....34

Tabela 5.5: Resultados obtidos para flogopitito através da metodologia de fotometria de chama e total de solubilização calculado para cada isolado.....43

Tabela 5.6: Resultados obtidos para glauconito através da metodologia de fotometria de chama e total de solubilização calculado para cada isolado.....45

Tabela 5.7: Quantidade de mudas germinadas de acordo com vaso cultivado....49

Tabela 5.8: Quantidade e medidas das mudas remanescentes até o 20º dia de cultivo.....50

Lista de Figuras

Figura 3.1: Planta apresentando carência de potássio (K).....6

Figura 3.2: Disposição do potássio nos solos (Rehm e Schmitt, 2002).....7

Figura 3.3: Consumo aparente em t de K_2O e preço da t de K_2O no mercado em US$-FOB.....9

Figura 3.4: Comparação entre a produção interna e importação de potássio, desde 1983 e previsão até 2025. Fonte: ANDA 9

Figura 3.5: A ação dos microrganismos sobre a rocha. 1- microrganismos ocorrendo sobre a superfície da rocha; 2- microrganismos agindo sobre cristais de rochas; 3- microrganismos crescendo sobre fendas das rochas; 4- microrganismos crescendo no interior de cavidades e 5 - microrganismos capazes de ativamente penetrar na rocha. (Gadd *et al.*, 2005).....11

Figura 3.6: Envolvimento dos microrganismos do solo no ciclo de nutrientes e nutrição das plantas.....15

Figura 3.7: Estrutura da flogopita (BIGHAM *et al*., 2001).....16

Figura 4.1: Muda de girassol retirada para isolamento de microrganismos presentes na rizosfera.....21

Figura 5.1: Difratogramas de raios X da amostra de glauconito.....31

Figura 5.2: Difratogramas de raios X da amostra de flogopitito.....31

Figura 5.3: Isolados da rizosfera de girassol. Da esquerda para a direita: GC6A1(*Aspergillus sp*.), FC5B1 (*Aspergillus sp.*), GC4A1 (*Fusarium sp*.), GC4A2 (*Fusarium sp*.) e FC4A1 (*Mucor sp*.).....35

Figura 5.4: Gráfico da curva de calibração mostrando a leitura do fotômetro de chama em diferentes concentrações.....36

Figura 5.5: Resultado da lixiviação química de potássio de flogopitito com extratante Merlich 1 por absorção atômica.....37

Figura 5.6: Resultado da lixiviação química de potássio de flogopitito com extratante Mehlich 1 por fotometria de chama.....38

Figura 5.7: Resultado da concentração de K encontrado no meio Gel líquido com extrato e levedura e sem extrato de levedura.....39

Figura 5.8: Variação do pH do meio (inicial) e após 14 dias dos ensaios obtidos das amostras fúngicas com flogopitito.....40

Figura 5.9: Solubilização de potássio a partir de flogopitito utilizando as linhagens de fungos em meio líquido contendo 10% p/p do mineral, em 14 dias.....42

Figura 5.10: Solubilização de potássio a partir de glauconito utilizando as linhagens de fungos em meio líquido contendo 10% p/p do mineral, em 14 dias.....44

Figura 5.11: Análise comparativa da biossolubilização do potássio a partir do glauconito e do flogopitito.....46

Figura 5.12: Muda começando a apresentar sintomas referente à carência de potássio.....47

Figura 5.13: Mudas em processo de morte.....48

Figura 5.14: Mudas remanescentes (20º dia).....51

Lista de Equações

Equação 1 Cálculo do total de potássio solubilizado pelo isolado (Dalcin, 2008)..27

Lista de Siglas

Ca	Cálcio
CCFF	Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos
CETEM	Centro de Tecnologia Mineral
COAM .	Coordenação de Análises Minerais
COPM	Coordenação de Processos Minerais
COPPE	Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-graduação e Pesquisa de Engenharia
DRX	Difração de Raios X
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
ha	hectare
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
K	Potássio
Kg	quilograma
MCT	Ministério da Ciência e Tecnologia
Mg	Magnésio
MG	Minas Gerais
N	Nitrogênio
PCR	“Polimerase Chain Reaction”
PIB	Produto Interno Bruto
P	Fósfoto
S	Enxofre
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
t	toneladas

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO.....1

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS.....4
2.1 Objetivo Geral.....4
2.2 Objetivos Específicos.....4

CAPÍTULO 3: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....5
3.1 Nutrição Vegetal.....5
3.2 Potássio e sua importância econômica.....7
3.3 Microrganismos solubilizadores.....10
3.4 Fungos e Rizosfera.....13
3.5 Rochas como fontes de potássio.....15
3.5.1Flogopitito.....16
3.5.2 Verdete do Cedro de Abaeté ou Glauconito.....17

CAPITULO 4: MATERIAIS E MÉTODOS.....18
4.1 Caracterização da Amostra de Glauconita e Flogopitito.....18
4.1.1 Difração de Raios-X.....18
4.1.2 Analise elementar.....18
4.1.3. Fluorescência de Raios X.....19
4.2 Lixiviação Química com Flogopitito.....19
4.3 Solo.....19
4.4 Isolamento e Seleção de Potenciais Microrganismos Solubilizadores de Potássio.....20
4.5 Obtenção e Classificação dos Isolados.....23
4.5.1 Classificação do isolados.....23
4.6 Lixiviação Biológica.....25
4.6.1 Avaliação da concentração de potássio encontrado no meio Gel.....25
4.6.2. Avaliação da biossolubilização por linhagens fúngicas.....25
4.6.3 Determinação do pH.....27
4.6.4 Reação de Furt-Herman.....27

4.7 Cultivo de girassol utilizando pó de rocha e fungo.....28
4.7.1 Preparo do inóculo.....28
4.7.2 Cultivo.....28
4.8 Curva de calibração.....29

CAPÍTULO 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....30
5.1 Caracterização da Amostra de Glauconito e Flogopitito.....30
5.1.1 Difração de Raios-X.....30
5.1.2 Análise Elementar.....32
5.1.3 Fluorescência de Raios X.....32
5.2 Identificação dos isolados da rizosfera de girassol.....33
5.3 Curva de Calibração.....36
5.4 Lixiviação Química Utilizando Flogopitito.....37
5.4.1. Avaliação através da Metodologia de Absorção Atômica.....37
5.4.2. Avaliação através da Metodologia de Fotometria de Chama.....38
5.5 Teste da concentração de K em meio Gel.....39
5.6 Análise da variação de pH.....40
5.6.1 Reação de Furt-Herman.....42
5.7 Avaliação da biossolubilização por linhagens fúngicas isoladas.....42
5.7.1 Biossolubilização do flogopitito.....42
5.7.2 Biossolubilização do glauconito.....44
5.7.3 Análise comparativa da biossolubilização do potássio pelos isolados fúngicos a partir de flogopitito e glauconito.....45
5.8 Avaliação do cultivo de girassol em solo suplementado com pó de rocha.....47

CAPÍTULO 6. CONCLUSÕES.....53

CAPÍTULO 7: CONSIDERAÇÕES FINAIS: PROBLEMAS E SUGESTÕES.....54

CAPÍTULO 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....55

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

Todo o hemisfério Sul é pobre em depósitos de potássio (NASCIMENTO *et al.*, 2008). Os solos brasileiros não fogem a esta regra e são, em geral, ácidos e carentes dos macronutrientes como nitrogênio, potássio e fósforo, o que, associado à insuficiente produção interna de matérias primas para fertilizantes, constitui um ponto fraco da agricultura nacional. Esse fato é ainda mais acentuado com relação ao potássio tendo em vista que a única mina em produção (mina Taquari-Vassouras, em Sergipe) satisfaz apenas 8% das necessidades do País. O Brasil encontra-se, assim, em uma situação crítica, fortemente dependente de importações. Cerca de, 92% do potássio consumido na agricultura brasileira é importado do Canadá, Rússia ou Alemanha, especialmente sob a forma de cloreto de potássio (KCl), criando assim, uma forte dependência econômica e política (NASCIMENTO & LAPIDO-LOUREIRO, 2004; MARTINS *et al*.2008). O Déficit anual de nutrientes nos solos brasileiros é de 900.000 t para N, 400.000 t para P_2O_5 e 400.000t para K_2O.

O agronegócio representa, atualmente, cerca de 40% do produto interno bruto (PIB) nacional. O País vem apresentando um crescimento contínuo da produção agrícola como conseqüência direta da maior e mais eficiente aplicação de fertilizantes. Assim, além de se tornar um dos maiores produtores de alimentos no mundo, vem se tornando também um dos maiores consumidores de fertilizantes. Além do aumento da produção agrícola voltada para a geração de alimentos, há ainda o crescente aumento do plantio de espécies relacionadas à produção de biocombustíveis (cana de açúcar, soja, mamona, etc). No entanto, a abertura de novas fronteiras agrícolas torna-se cada vez mais limitada em função, muitas vezes, das deficiências nutricionais dos solos ainda disponíveis para o plantio e cultivo das espécies adequadas.

O potássio é um nutriente essencial para todos os organismos vivos e um dos dez mais abundantes na crosta terrestre. Na fisiologia vegetal, em particular, desempenha função importante na ativação de mais de 60 enzimas envolvidas em diversos processos metabólicos como fotossíntese, síntese de proteínas e carboidratos. Além disso, o potássio tem influência direta no balanço hídrico e no crescimento de meristemas (VAN STRAATEN, 2007). A sua assimilação, em

quantidades adequadas, tem como principais conseqüências maior resistência a pragas e doenças e melhor qualidade do produto colhido. Pode-se afirmar que o potássio é um fator de qualidade na produção. Nos solos o potássio existe essencialmente sob três formas, normalmente em equilíbrio dinâmico: potássio mineral (minerais primários e secundários), potássio trocável e potássio da solução do solo (solúvel) (NASCIMENTO & LAPIDO-LOUREIRO, 2004).

Rochas contendo quantidades razoáveis de flogopita ou biotita podem constituir fontes alternativas de potássio para uso agrícola. Dentre estas podem-se citar rochas magmáticas alcalinas (carbonatitos, kimberlitos, kamafugitos, flogopititos), rochas metassedimentares cálcio-silicáticas e produtos de metassomatismo potássicos (biotita xisto, flogopita xisto, biotito, flogopitito), todas amplamente distribuídas em todo território nacional (RESENDE *et al*, 2006). No entanto, o seu possível aproveitamento irá requerer, trabalhos complexos, e os resultados que venham a ser conseguidos, se positivos, terão enorme impacto na indústria dos fertilizantes potássicos (NASCIMENTO & LAPIDO-LOUREIRO, 2004).

A utilização de rochas na fertilização de solos é usual, incluindo a aplicação de diferentes rochas silicáticas que contenham concentrações consideráveis de potássio. No entanto, a liberação do nutriente pode ser lenta e incompatível com a dinâmica de sistemas de produção agrícola. Porém, a utilização de pó de rocha, a chamada rochagem, têm sido uma alternativa atraente ao uso de fertilizantes industriais. Por ter uma solubilidade mais lenta que os fertilizantes comerciais, o pó de rocha se constitui em fonte de nutrientes para plantas cultivadas durante longos períodos, promove o aumento da capacidade de troca catiônica dos solos, devido a formação de novos minerais de argila durante o processo de alteração da rocha (MELAHMED *et al*., 2009). O modelo de rochagem constitui uma alternativa viável em termos econômicos e ecológicos devido ao baixo custo de processo de beneficiamento, que envolve o processo de moagem das rochas usadas na composição do produto, e devido à liberação gradual de nutrientes que diminui as perdas por lixiviação e favorece uma ação de longo prazo do insumo aplicado. Em alguns casos, as rochas podem também apresentar efeitos alcalinizantes, atuando como condicionadores de solo (LOPES-ASSAD *et al.*, 2006).

Uma tendência atual é a possibilidade de se maximizar a liberação de potássio (K) das rochas silicáticas mediante processos de biossolubilização (RESENDE *et al*., 2006).

O uso da inoculação microbiana na agricultura, como forma de “manipulação biológica”, teve início com as leguminosas, devido a sua associação com bactérias fixadoras de nitrogênio (DALCIN, 2008).

Alguns estudos (BIGHAM *et al*., 2001; YUAN *et al*., 2004; BADR *et al*., 2006; PARIS *et al*., 2006 (a e b); CALVARUSO *et al.*, 2006), demonstram a existência de microrganismos capazes de promover a solubilização de rochas potássicas, o que abre caminho para a geração de tecnologias de produção de fertilizantes diferenciados. Neste sentido alguns autores indicam que o desenvolvimento de processos biotecnológicos para solubilização destes agrominerais configura-se como uma alternativa atrativa. O contato da rocha com microrganismos e/ou subprodutos derivados do metabolismo microbiano, poderá resultar na biossolubilização da mesma e na conseqüente liberação do nutriente para o meio. No entanto, os mecanismos envolvidos neste processo ainda não são claros o suficiente para uma aplicação em maior escala. Além disso, uma vez que existam evidências do envolvimento direto de ácidos como o cítrico e o oxálico e/ou enzimas no processo de biossolubilização, faz-se necessária a seleção de linhagens capazes de produzir quantidades significativas de ácidos orgânicos.

Os trabalhos mais comumente encontrados relatam a extração de fosfato, porém, trabalhos mais antigos, desenvolvidos por Ivanov, datam de 1958, e propõem o desenvolvimento de rotas de calcinação de feldspatos potássicos como agentes liberadores de potássio. Trabalhos para extração de potássio de glauconita da Índia foram realizados por Mazunder et al. em 1993, e o CETEM/MCT e a COPPE/UFRJ também desenvolvem metodologia para extração de potássio a partir de rocha potássica (NASCIMENTO *et al*, 2008). Mesmo assim, poucos são os trabalhos que relatam a extração de potássio por processo biológico.

Este trabalho faz parte do projeto CT-AGRO (CNPq) intitulado “*Estudo prospectivo sobre processos biotecnológicos para biossolubilização de agro-minerais”* realizado em parceria entre o CETEM, a Escola de Química e a EMBRAPA Agro-Indústria.

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visa realizar o isolamento de fungos filamentosos rizosféricos presentes em um solo brasileiro (pobre em potássio), suplementado com dois diferentes tipos de pós de rocha como fonte única de potássio e semeados com girassol (*Helianthus annuus L*.) como sistema vegetal e utilizá-los como agentes de solubilização de potássio presente em rochas como o flogopitito e glauconito.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O objetivo geral deverá ser atingido a partir dos seguintes objetivos específicos, a saber:

- Isolar de rizosfera de um cultivo de girassol (*Helianthus annus* L. EMBRAPA 122), submetido a um processo de rochagem, fungos filamentosos com potencial de solubilização de silicatos.
- Caracterizar e identificar os fungos filamentosos obtidos, por metodologia de taxonomia clássica.
- Realizar o crescimento *in vitro* dos isolados e quantificar a extração do potássio obtido por fermentação em meio líquido.
- Analisar possíveis diferenças no desenvolvimento e crescimento das plantas de girassol em solos acrescidos ou não de inoculantes (isolados fúngicos) e pó de rocha.

CAPÍTULO 3: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Nutrição vegetal

A partir do século XIX, químicos e botânicos descobriram que as plantas requerem elementos químicos para o crescimento. O número de elementos químicos varia de acordo com o critério adotado para cada necessidade nutricional da planta, mas, em geral, são citados 17, que, de acordo com as quantidades requeridas pelas plantas, podem ser classificados em: macronutrientes - como o nitrogênio (N), o fósforo (P), o potássio (K), o enxofre (S), o cálcio (Ca) e o magnésio (Mg) - e micro-nutrientes, como por exemplo, o ferro (Fe) (LONERAGAN, 1997). Na ausência de qualquer um desses elementos as plantas exibem sintomas de deficiência nutricional, anomalias de crescimento e, freqüentemente, não se reproduzem normalmente (DALCIN, 2008).

Desde a Antiguidade que se conhece, empiricamente, a importância do potássio para o metabolismo das plantas. Há referências da utilização, como fertilizantes de cinzas resultantes da queima de árvores, material que contém uma expressiva concentração de potássio, desde o século III a.C. (NASCIMENTO *et al.*, 2008).

O K^+ é o cátion mais abundante no citoplasma e, juntamente com os ânions que o acompanham, tem importantes funções nas células e tecidos das plantas (DALCIN, 2008). O potássio regula a osmose da planta atuando sobre a abertura e fechamento de estômatos através de alterações da turgidez das células-guarda induzidas por uma bomba de potássio na parede celular. Como os estômatos são importantes na regulação da perda de água pelas plantas, o potássio ajuda a diminuir perdas de água e aumenta a tolerância a secas, ativa a catálise biológica de enzimas e promove o metabolismo do N e a síntese de proteínas. Tem importância fundamental para o desenvolvimento dos frutos, translocação de metais e balanço iônico. Tudo isso o torna um macronutriente responsável por produtos de boa qualidade e alta produtividade (LOPES-ASSAD *et al*., 2006).

O primeiro sintoma visível da deficiência de potássio é a clorose em manchas ou nas margens da folha, evoluindo para a necrose, principalmente nos ápices foliares, margens e entre nervuras, estendendo-se posteriormente em direção à

base. Como o potássio pode ser remobilizado para as folhas mais jovens, esses sintomas aparecem inicialmente nas folhas mais maduras da base da planta. As folhas podem curvar-se e o caule deficiente em potássio é delgado e fraco, apresentando regiões internodais anormalmente curtas, acarretando o tombamento do vegetal (Figura 3.1) (AMARAL & LAGE, 2010).

A complementação de potássio em solos deficientes produz melhoria no rendimento das colheitas e torna o vegetal mais resistente a pragas e doenças (NASCIMENTO & LOUREIRO, 2004).

Particularmente o potássio é importante na produção de batata, cana-de-açúcar, beterraba, uvas, frutas, cereais, côco, cacau e seringueira (VAN STRAATEN, 2007).

Figura 3.1: Planta apresentando carência de potássio (K). (Fonte: http://www.aquahobby.com/articles/b_nutricao_vegetal.php, acessado em outubro de 2010).

A maioria dos solos de plantio contém concentrações significativas do íon metálico (K^+). São centenas de quilos de potássio por hectare, mas somente uma pequena quantidade está disponível para as plantas durante todo o período do seu desenvolvimento, provavelmente menos do que 2%, devido as suas diferentes formas de ocorrência no solo:

i) estrutural-presente nas fases minerais formadoras do solo;

ii) entre as camadas lamelares nas principais fases formadoras do solo, feldspatos, entre outros;

iii) na forma solúvel, em contato com a matéria orgânica ou em minerais de potássio de alta solubilidade.

Dessa forma acontece a reposição de potássio retirado da solução do solo pelas plantas (Figura 3.2) (NASCIMENTO *et al*, 2008).

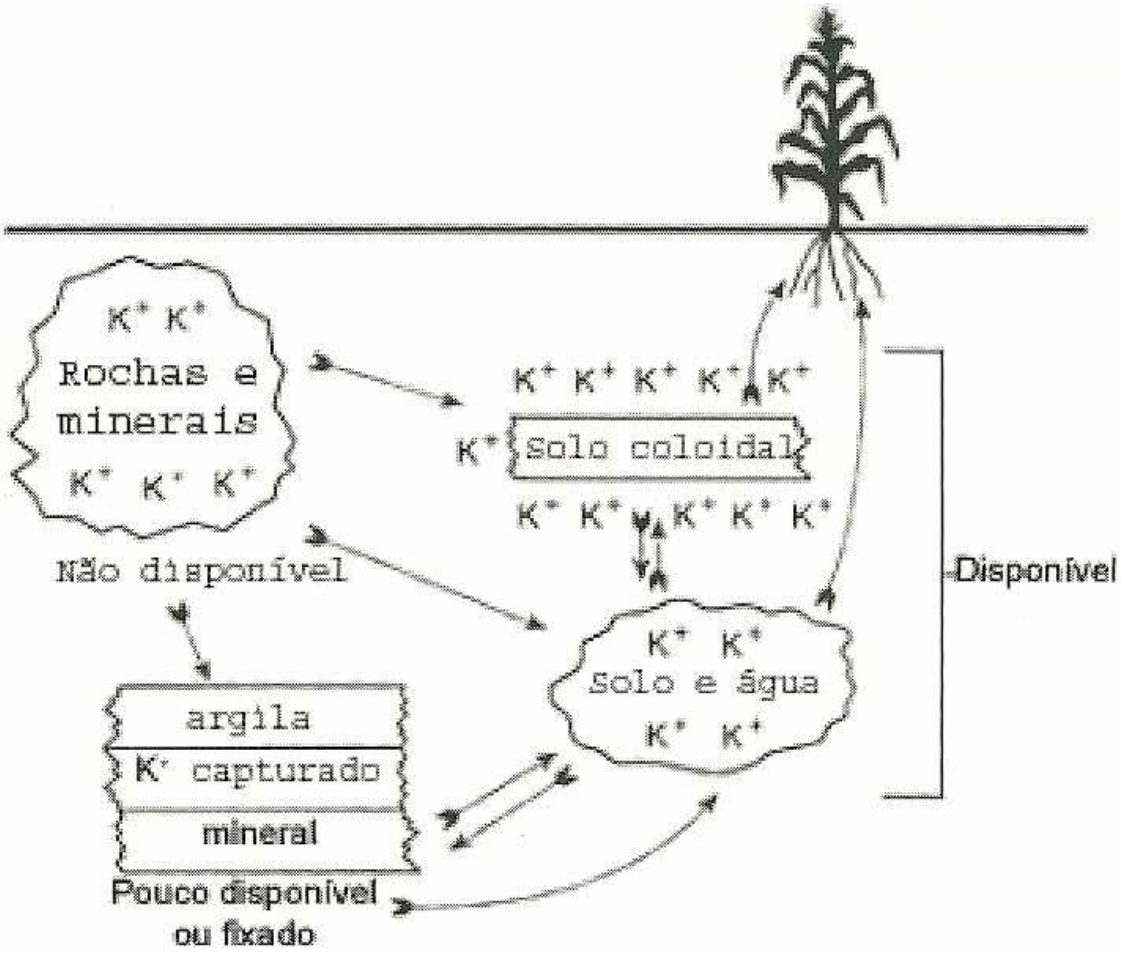

Figura. 3.2: Disposição do potássio nos solos (Rehm e Schmitt, 2002).

Uma vez que as plantas requerem K em altas quantidades, ele é considerado um dos três principais nutrientes vegetais.

3.2 Potássio e sua importância econômica

O elemento potássio, é um dos dez mais abundantes na crosta terrestre e ocorre na natureza somente sob a forma de compostos, podendo ser encontrado em minérios e águas salgadas. Além dos minérios formados por cloretos e sulfatos, o potássio está presente em outros com teores acima de 10% e em muitos outros com valores de 2% a 10%. Com o tempo o intemperismo provoca

sua alteração química gerando compostos de potássio solúveis que são transportados pelo rio para o mar (NASCIMENTO *et al.*, 2008).

É o segundo macronutriente em quantidade utilizada no manejo da adubação das culturas, ficando atrás apenas do fósforo (LOPES-ASSAD *et al*. 2006).

Cerca de 95% da produção mundial de potássio é utilizada na fabricação de fertilizantes, sendo desses, 90% são para a fabricação de cloreto de potássio (KCl) e 5% para a fabricação de sulfato de potássio (K_2SO_4) (NASCIMENTO *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*,2008).

O crescente aumento da produção agrícola e consequente uso de potássio na agricultura, aliado ao seu preço crescente (950 US$-FOB em 2008, preço cerca de 10 vezes maior do que o praticado em 2001, como mostra a figura 3.3) demonstra previsões de que a demanda de óxido de potássio (K_2O) cresça 50% até 2015 (MARTINS *et al*. 2008). Além disso, a importação de até 92% das necessidades internas (Figura 3.4), impulsionou o desenvolvimento de pesquisas sobre fontes alternativas para a produção de fertilizantes de potássio. Neste sentido, rochas ou minerais que apresentem teores elevados de potássio (maiores que 6% de K_2O) poderão ser fontes alternativas potenciais para a produção de sais de potássio, termofosfatos potássicos ou ainda para aplicação direta nos solos como fertilizantes de potássio de liberação lenta (NASCIMENTO & LAPIDO-LOUREIRO, 2004).

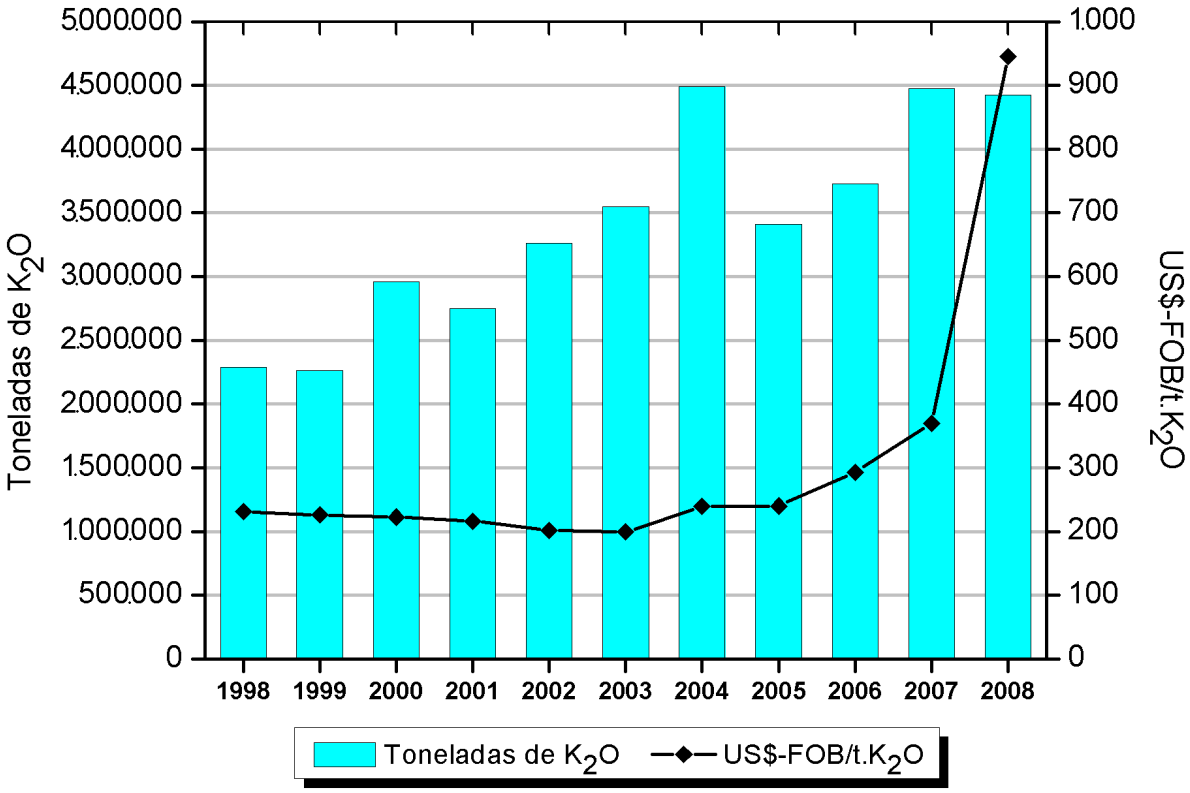

Figura 3.3: Consumo aparente em t de K_2O e preço da t de K_2O no mercado em US$-FOB.

Figura 3.4: Comparação entre a produção interna e importação de potássio, desde 1983 e previsão até 2025. Fonte: ANDA Projeções MB Agro.

O potássio está presente em numerosos minerais, a maioria com presença significativa na sua rede cristalina, mas apenas um pequeno número deles,

constituídos por cloretos e/ou sulfatos, são considerados de interesse econômico devido, principalmente, ao seu conteúdo em potássio e à sua fácil solubilização. A maioria dos minerais contendo potássio em sua rede cristalina (caso do grupo dos feldspatos e alguns do grupo da mica) são insolúveis e o processo de dissolução só é possível a partir de forte ataque químico acompanhado de tratamento térmico (NASCIMENTO & LAPIDO-LOUREIRO, 2004).

As formas mais comuns em que o K é encontrado no solo são:

i) em solução;

ii) sob a forma iônica unido eletrostaticamente aos materiais que constituem a parte sólida;

iii) ligado fortemente à fase sólida mineral (“K” fixado e “K” estrutural), é o potássio de reserva ou de reposição dos solos.

A microbiota tem papel especial na disponibilidade de K, particularmente em solos pobres, podendo competir com as plantas pelo nutriente. Essa mobilização é temporária, pois com a morte dos microrganismos, o K é liberado das células por mineralização. A microbiota também pode contribuir na liberação de K pela decomposição de minerais silicatos (DALCIN, 2008).

3.3 Microrganismos solubilizadores

A exposição de minerais às águas da chuva, mudanças de temperaturas e condições oxidativas resultam em reações de intemperismo, incluindo dissolução e cristalização de minerais. Entende-se por intemperismo o processo em que ocorre a erosão da rocha e a diminuição do tamanho das suas partículas. Plantas e microrganismos também estão envolvidos na formação e destruição de minerais. Eles podem colonizar superfícies minerais, especialmente poros e fendas (Figura 3.5) (UROZ *et al.*, 2009).

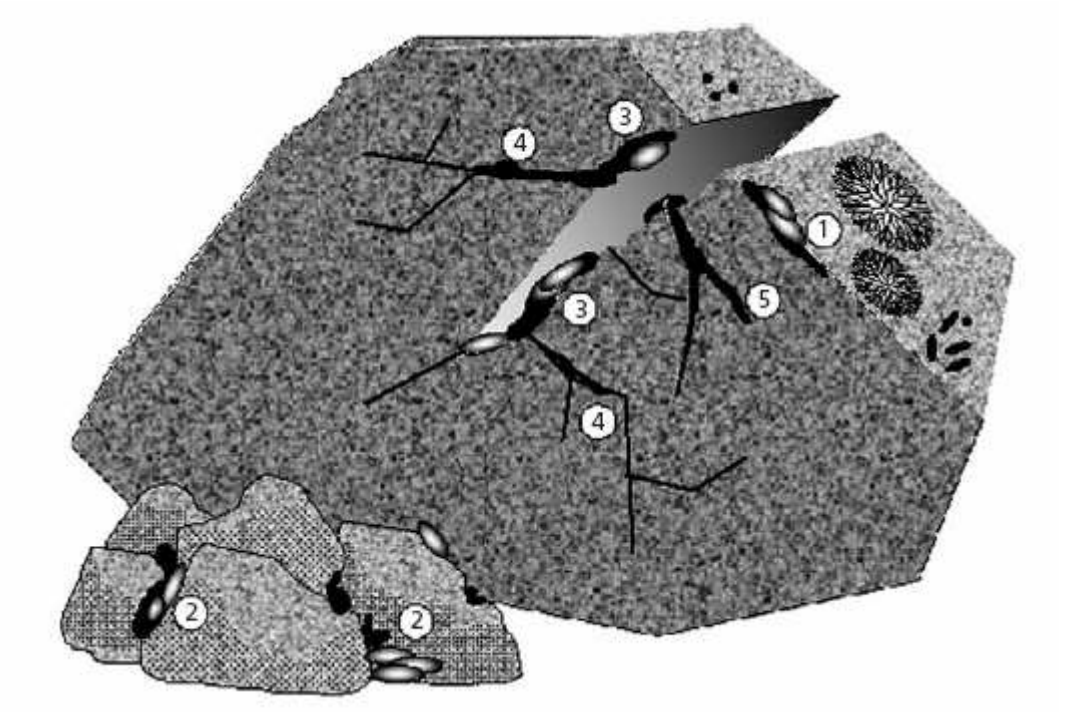

Figura 3.5: A ação dos microrganismos sobre a rocha. 1- microrganismos ocorrendo sobre a superfície da rocha; 2- microrganismos agindo sobre cristais de rochas; 3- microrganismos crescendo sobre fendas das rochas; 4- microrganismos crescendo no interior de cavidades e 5- microrganismos capazes de ativamente penetrar na rocha. (Gadd *et al.*, 2005)

Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e vitais na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares, na reciclagem de nutrientes e nos diversos ciclos biogeoquímicos existentes. Apesar de sua grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 5% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos (LEITE, 2009).

Microrganismos podem existir em ambientes com condições extremas de temperatura, pressão hidrostática, pH, e potenciais redox. Microrganismos que promovem formação e degradação de minerais são oportunistas que exploram situações ambientais nas quais outros microrganismos possuem desvantagem (EHRLICH, 1996).

Os fungos, por exemplo, representam um dos organismos mais ativos do solo, e algumas espécies podem secretar antibióticos ou toxinas capazes de eliminar competidores e até matá-los, em alguns casos (SOUZA-MOTA *et al.* 2003).

Muitas bactérias e fungos são capazes de acelerar a dissolução de silicatos e aluminiosilicatos. Os mecanismos pelos quais eles agem podem envolver a produção de produtos metabólicos tais como ácidos orgânicos que podem agir como acidulantes e/ou ligantes, base na forma de NH_3 e muco capsular especialmente em bactérias. Entre os ácidos, está o ácido 2-ceto-glucônico formado por bactérias e ácidos cítrico e oxálico formados por alguns fungos, têm sido mostrados muito eficientes na dissolução de silicatos (EHRLICH, 1996; NARLOCH, 2002).

Bactérias são mencionadas, entre outros motivos, dada a sua capacidade de formar biofilmes. A fixação à superfície do mineral cria microambientes que protegem a bactérias contra estresses ambientais. Nesses microambientes, bactérias extraem nutrientes inorgânicos e energia diretamente da matriz mineral e/ou da parte circundante do microrganismo (UROZ *et al*., 2009).

Muitos trabalhos preocupados com a interação no solo entre mineral-microrganismo têm focado em fungos sapróficos, bactérias e liquens (PARIS *et al.,* 1995a).

Muitos são os estudos que contemplam os microrganismos solubilizadores de fosfato (PSMs). Song *et al*. (2008) relatam a solubilização de fosfato inorgânico insolúvel por *Burkholderia cepacia* e o relaciona com o decréscimo do pH no meio.

No estudo de Narloch *et al*. (2002) e Souchie *et al*. (2007), pode-se encontrar uma extensa revisão dos microrganismos solubilizadores de fosfato, onde citam-se vários gêneros de bactérias e fungos, incluindo fungos micorrízicos.

Estudos realizados por Reyes *et al*. (2001) comparam a solubilização de rochas fosfáticas por cepas mutantes e cepas naturais de *Penicillium rugulosum*.

Sabe-se que líquens (associação simbiótica entre fungos e algas fotossintetizantes ou cianobactérias) são os primeiros organismos à desgastar rochas. Eles são capazes de colonizar e desgastar a superfície mineral de rochas e monumentos ao longo de décadas (UROZ *et al*. 2009).

Os microrganismos envolvidos na solubilização de fosfatos também podem auxiliar o crescimento da planta por outros mecanismos, além daquele advindo da solubilização, como por exemplo, pelo aumento da eficiência da fixação biológica de nitrogênio. Sabe-se que o fósforo é o fator limitante para fixação de nitrogênio pela simbiose rizóbio-leguminosas, aumentando a disponibilidade de outros

elementos ou produzindo substâncias promotoras de crescimento de plantas (citocinas, giberelinas, ácidos indol-3-acético) e vitaminas (riboflavina, niacina e vitamina B12) (NARLOCH *et al.*, 2002; DALCIN, 2008).

Barroso e Nahas (2005) destacam em seu trabalho, uma grande quantidade de fungos isolados de solo e muitos com capacidade de dissolver fosfato inorgânico.

Porém, o número de trabalhos contendo dados sobre a atuação de fungos na solubilização de potássio ainda é pequeno. Alguns estudos relatam o isolamento e utilização de linhagens fúngicas na biossolubilização de potássio a partir de diferentes minerais (YUAN *et al*. 2004; GLEESON *et al.* 2005; LIAN *et al*. 2008), onde podemos destacar os gêneros *Aspergillus*, *Paxillus*, *Cenococcum*, *Pisolithus*, *Piloderma*, dentre outros.

Lopes-Assad *et al*. (2006) avaliou em seu trabalho o processo de biossolubilização de minerais, a partir da ação de *Aspergillus niger* em dois pós de rochas silicáticas contendo minerais ricos em potássio e observou que a acidificação do meio promovida pelo fungo aumentou a solubilização de K.

3.4 Fungos e rizosfera

Os fungos constituem um grupo de organismos heterotróficos, eucarióticos e aclorofilados, portanto, que não realizam fotossíntese. Podem ser unicelulares ou pluricelulares, mais tipicamente filamentosos. Possuem parede celular rígida constituída de quitina e/ou celulose. Sua reprodução pode ser sexuada ou assexuada, esta última podendo ocorrer por fragmentos do talo, mas a forma usual é a formação de esporos. A estrutura vegetativa é constituída de hifas que são filamentos de células que formam uma rede chamada micélio. As hifas podem ser asseptadas ou cenocíticas quando não apresentam células individualizadas e são preenchidas por massa citoplasmática continua e, septadas quando apresentam septos delimitando compartimentos (PUTZKE & PUTZKE, 1998; TRABULSI, 1999 e MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

A classificação dos fungos baseia-se em características morfológicas das hifas, corpos de frutificação e esporos, assim como seus ciclos de vida.

Os fungos são organismos quimiorganotróficos cuja principal função no solo é a decomposição de resíduos orgânicos; além disso, são patógenos importantes de plantas e animais, podendo também agir como agentes de controle biológico e formar simbiose mutualísticas com plantas (micorrizas) e algas verdes ou cianobactérias (Liquens) (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

O solo é um meio altamente complexo, um ecossistema com múltiplos componentes bióticos e abióticos, constituído de inúmeros micro-habitats. Cada micro-habitat, microambiente ou microssítio é um local particular onde células, populações ou comunidades microbianas co-existem em um dado momento, sendo seu comportamento influenciado pelas condições físico-químicas e químicas que, por sua vez, também influenciam o ambiente dentro desse espaço (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Este é o habitat mais rico em espécies de fungos, que geralmente distribuem-se segundo a disposição da matéria orgânica.

A rizosfera é o paraíso dos microrganismos. Devido não só à quantidade, mas também à diversidade de compostos orgânicos depositados na rizosfera, assim como ao ambiente físico-químico. A quantidade e os tipos de microrganismos na rizosfera podem exceder mais de mil vezes aquela do solo não rizosférico (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

O termo rizosfera é definido por Souza-Motta *et al*. (2003) como o volume de solo adjacente às raízes e influenciado por elas, e representa uma área de intensa atividade microbiana, na qual os nutrientes orgânicos que chegam das raízes favorecem o desenvolvimento de microrganismos.

O desgaste mineral é mais rápido na rizosfera que no solo sem raízes. A intensificação desse desgaste mineral na rizosfera pode ser atribuída, em parte, a associação entre as raízes e comunidades de bactérias e fungos (Figura 3.6) (UROZ, 2009).

A atividade fúngica promove a dissolução do mineral e consequentemente seu rompimento através de diferentes rotas que compreendem a produção de ácidos orgânicos, a catálise microbiana de reações redox envolvendo metais e a formação diagênica e autigênica de minerais e rochas sedimentares. Os fungos apresentam uma contribuição significativa nos processos de intemperização na superfície das rochas, através da ruptura física após contato com as hifas, expondo ainda mais a superfície ao ataque. Além disso, secretam grande

quantidade de ligantes que auxiliam na solubilização de minerais, suprindo nutrientes solúveis para toda a comunidade microbiana presente (GLEESON *et al*. 2005).

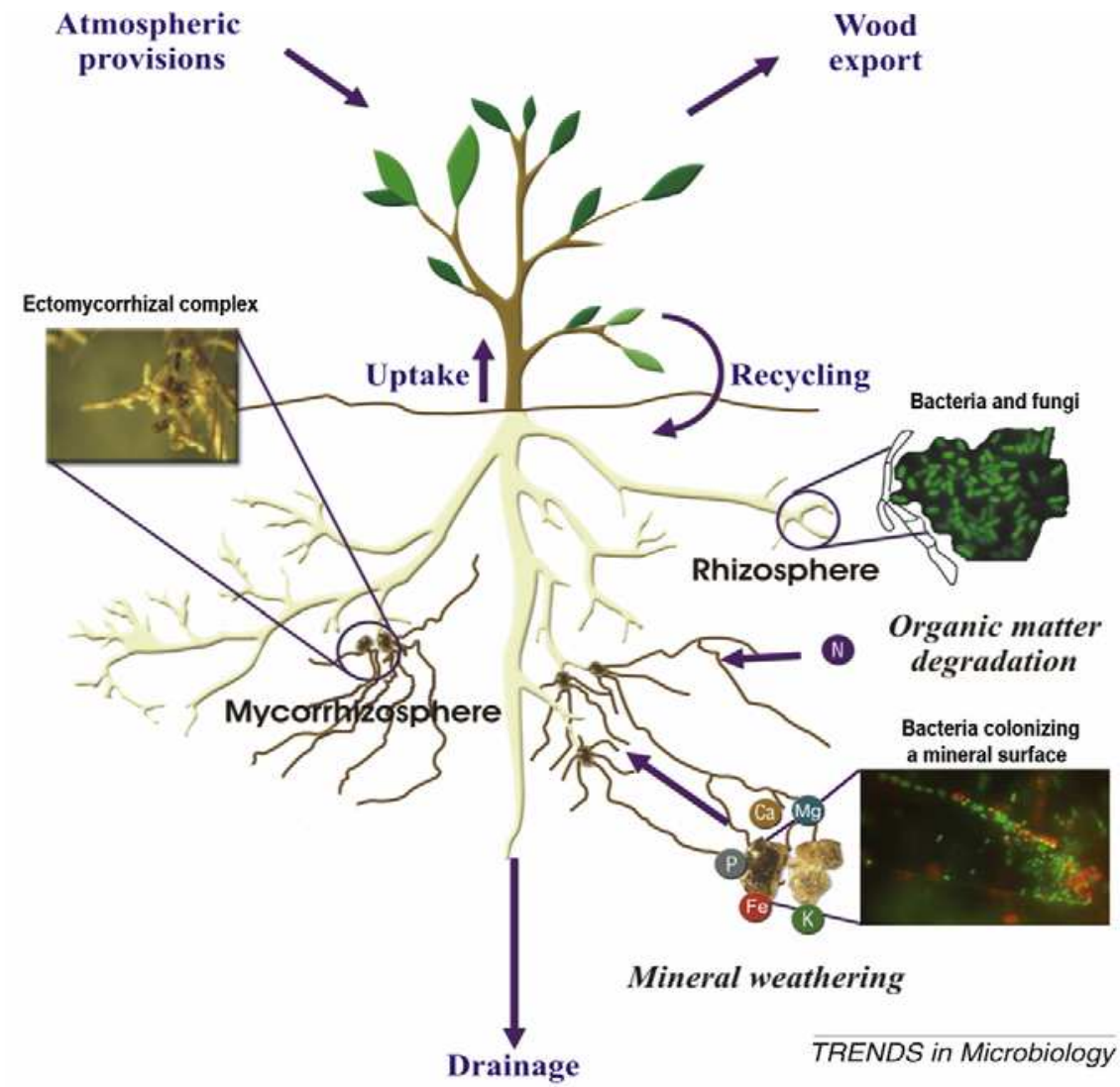

Figura 3.6: Envolvimento dos microrganismos do solo no ciclo de nutrientes e nutrição das plantas. O ciclo dos nutrientes nos ecossistemas de florestas é composto de cinco componentes principais: uptake, recycling, atmospheric supplies, wood export e drainage. Dois deles (uptake e recycling) são fortemente influenciados pelos microrganismos do solo de diferentes nichos: a rizosfera, a micorrizosfera e a superfície mineral (mineralosfera). (Uroz *et al.*, 2009)

3.5 Rochas como fontes de potássio

As micas, pela sua estrutura aberta e teores significativos de potássio, são bons indicadores de rochas favoráveis para aplicação na remineralização dos solos. A seguir, são apresentados alguns teores de K_2O em micas: biotita (7-12%),

flogopita (17-11%), muscovita (7-10%), ilita (4-8%) e glauconita (5-8%) (NASCIMENTO *et al*., 2008).

3.5.1 Flogopitito

A flogopita [$KMg_3Al(OH)Si_4O_{10}$] (PINHEIRO, 2009) está classificada dentro do grupo das micas, as quais possuem características de grande interesse industrial tais como: clivagem fácil, que permite a separação em lâminas muito finas; flexibilidade; baixa condutividade térmica e elétrica; resistência a mudanças abruptas de temperatura. A flogopita é um filossilicato de estrutura 2:1 (tetraedro-octaedro-tetraedro) com uma intercamada de cátions não hidratados equilibrando a alta carga negativa das camadas. Sua estrutura é composta de folhas empilhadas bidimensionalmente que se encontram ligadas por uma rede de octaedros e tetraedros (Figura 3.7). A alteração da flogopita se dá por troca iônica. A suscetibilidade ao intemperismo parece ter ligação com sua estrutura dioctaédrica, que justificaria a forte fixação do potássio na estrutura. A forma como o íon potássio está preso à estrutura cristalina da flogopita implica na dificuldade da sua remoção (SILVA *et al*., 2008)

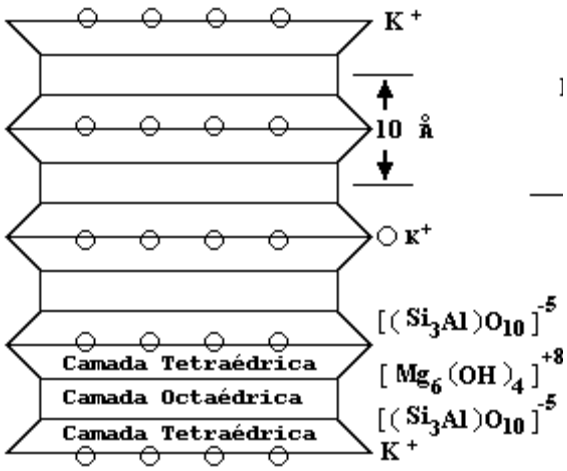

Figura 3.7: Estrutura da flogopita (Bigham *et al*., 2001).

Várias rochas são consideradas efetivas no suprimento de K, mesmo quando aplicados *in natura*. O flogopitito está entre essas rochas, onde a flogopita é um dos minerais portadores de K que possui solubilidade elevada entre os silicatos.

Esse mineral, juntamente com outros, mostrou significativa liberação de K em testes de laboratório e em solos incubados (LOPES-ASSAD *et al.*, 2006 e NASCIMENTO *et al.*, 2008).

3.5.2 Verdete do Cedro de Abaeté ou Glauconito

O glauconito também é um membro do grupo das micas. É constituído por metassedimentos pelíticos, com predominância de glauconita, quartzo e outros minerais. A rocha ocorre na Serra da Saudade, no município Cedro de Abaeté, na região do Alto Parnaíba (MG). Geologicamente, encontra-se no Cráton do São Francisco, no Grupo Bambuí, na Formação Serra da Saudade. A formação é constituída por folhelhos intercalados com verdetes, em alternância centimétrica a métrica, com alguns níveis de fosforita no topo (VARELLI *et al.*, 1992). O cátion interlamelar predominante é o K^+.

A coloração verde é dada pela presença de ferro. Inicialmente ferroso, ele substitui cátions neutralizados, como K^{+2}, Na^{+2}, Ca^{+2} e Mg^{+2}, e parcialmente ferro férrico. A mineralogia é composta por quartzo, feldspato potássico, albita, mica branca, glauconita, dando a cor verde à rocha, clorita e opacos. E a porcentagem de K_20 varia entre 7 e 14% (PIZA *et al.*, 2009). Segundo Eichler (1983), o verdete de Abaeté apresenta cerca de, 11,4% de K_2O.

Desta forma, o verdete de abaeté pode ser considerado uma potencial fonte alternativa de potássio.

CAPITULO 4: MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Caracterização da Amostra de Glauconito e Flogopitito

Foram utilizados dois diferentes tipos de rochas, glauconito e flogopitito, ambas cedidas gentilmente pela Coordenação de Processos Minerais (COPM)/ Centro de Tecnologia Mineral/ Ministério da Ciência e Tecnologia (CETEM/MCT). O material passou por moagem e peneiramento e foi utilizado na fração menor que 40 mesh.

As amostras foram encaminhadas para a Coordenação de Análises Minerais (COAM) / (CETEM), para que fosse feita a caracterização tecnológica envolvendo as técnicas de Difração de Raios X, Análise Elementar e Fluorescência de Raios X.

4.1.1 Difração de Raios-X

Na análise por Difração de Raios-X (DRX) foi utilizado o método do pó. Os difratogramas das amostras foram obtidos no equipamento Bruker-D4 Endeavor, nas seguintes condições de operação: radiação Co Kα (35kV/40 mA); velocidade do goniômetro de 0,02o 2θ por passo com tempo de contagem de 1 segundo por passo e coletados de 2 a 80º 2θ. As interpretações qualitativas dos espectros foram efetuadas por comparação com padrões contidos no banco de dados PDF02 fornecidos pelo Centro Internacional para Dados de Difração (ICDD – *International Center for Diffraction Data*) através do software Bruker DiffracPlus.

4.1.2. Análise Elementar

A análise dos elementos Fe, Al, Mg e K foi realizada através de absorção atômica com chama de acetileno ou óxido nitroso. A análise de Si foi realizada através de gravimetria.

4.1.3. Fluorescência de Raios X

As amostras foram preparadas por fusão do material a 11000ºC utilizando como fundente tetraborato de lítio. A pérola fundida foi analisada em espectrômetro de fluorescência de raios X BRUKER-AXS modelo S4-Explorer, equipado com tubo de Rh. Para obtenção da análise química semi-quantitativa, o espectro gerado a partir da amostra foi avaliado pelo software *Spectra plus* v.1.6 no modo *standardless method*, sem curva de calibração específica.

É importante ressaltar que o método usado para quantificação não é preciso, pois utiliza apenas o banco de dados do equipamento para realizar os cálculos de concentração. Para se fazer uma análise quantitativa é indispensável a confecção de uma curva de calibração baseada em padrões (materiais com características semelhantes aos analítos e com composições conhecidas) que cubram a faixa de concentração das amostras de interesse.

4.2 Lixiviação Química com Flogopitito

Erlenmeyers de 250 ml de capacidade contendo 10 g de flogopitito e 100 ml de solução Mehlich-1 (extratante), relação de 10% (p/v), composto de uma solução ácida H_2SO_4 0,0125N + HCl 0,05 N, foram mantidos sob agitação em mesa agitadora com rotação constante de 150 rpm e temperatura de 30ºC. Os ensaios foram realizados em triplicatas (frascos de sacrifício), em diferentes tempos de contato (7, 14, 21 e 28 dias), a fim de se avaliar a cinética de extração do potássio. O método analítico empregado para a determinação do potássio foi a absorção atômica e a fotometria de chama. As amostras foram filtradas e armazenadas em geladeira até a analise. Objetivou-se com o estudo da lixiviação química obter resultados para posterior comparação com os obtidos na lixiviação biológica.

4.3 Solo

O solo utilizado nos cultivos foi coletado na região Nordeste do Brasil, próximo a uma área de exploração de petróleo.

As características físico-químicas do solo, que foram realizadas em laboratório externo, estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Características físico-químicas e de fertilidade do solo usado nos cultivos. (adaptado de TELHADO, 2009)

Propriedades físico-químicas														
pH		Densidade Bulk (g/ml)				Densidade de Partícula (g/ml)				Porosidade (%)			CRA (%)	
6,0		0,96				1,86				48			42	
Fertilidade														
Na	Ca	Mg	K	H+Al	Al	S	T	V	m	n	C.org	P	K	N
----------Cmol/dm^3----------								----------%----------				--mg/L--		-%-
0,066	24	7,7	0,02	9,2	0	31,79	40,99	78	0	0	6	10	8	1,4

4.4 Isolamento e Seleção de Potenciais Microrganismos Solubilizadores de Potássio

Foram cultivados cinco aquênios de girassol (aquênio EMBRAPA V 122) distribuídos em forma de X, no período de julho a setembro. As relações nutricionais de nitrogênio, fósforo e potássio utilizadas foram 40:70:80 N:P:K (em Kg por ha). O Nitrogênio foi adicionado na forma de nitrato de amônio (NH_4NO_3), o fósforo na forma de ácido fosfórico (H_3PO_4) e, posterior a semeadura, houve adição de cerca de 300 ml de água em cada vaso. Cada vaso, contendo 2 kg de solo, foi suplementado separadamente com os seguintes pós de rocha: flogopitito 2,4 g/kg de solo e glauconito 2,2 g/kg de solo. Análise prévia do conteúdo de potássio presente no flogopitito e glauconito era de 9% de K_2O e 9,5 % de K_2O, respectivamente, sendo esses valores utilizados para o cálculo de adição de K no solo para que fosse equivalente a 40 mg/kg de K no solo, como é o recomendado para a cultura de girassol. A granulometria de ambas as rochas utilizadas em todos os experimentos foi menor que 40 mesh.

Após o crescimento das plantas e desenvolvimento dos respectivos aquênios, o que levou cerca de 90 dias, realizou-se o isolamento de microrganismos presentes na rizosfera do girassol. As plantas foram colhidas e o solo das respectivas rizosferas separados (Figura 4.1).

Figura 4.1. Muda de girassol retirada para isolamento de microrganismos presentes na rizosfera.

Foram pesados 20 g do solo e colocados em erlenmeyers contendo 250 mL meio GEL líquido descrito por Dalcin (2008), cuja composição encontra-se na tabela 4, sem adição de ágar, onde foi adicionado 0,05 g de cloranfenicol, contendo o potássio sob a forma de pó-de-rocha, para cada cultivo. O meio GEL foi autoclavado a 0,5 atm por 15 minutos e os minerais a 1 atm por 15 minutos. O potássio foi adicionado na forma do pó-de-rocha flogopitito ou glauconito, na proporção de 50 g/l, o mesmo utilizado por Dalcin (2008).

Tabela 4. Composição do meio GEL.

Componente	Quantidade
Glicose	10,0 g
Extrato de levedura	1,0 g
NaCl	0,01 g
Na_2HPO_4	4,0 g
NH_4NO_3	0,005 g
Solução de $MgSO_4.7H_2O$ 10%	2 ml
Solução de $CaCl_2$ 1%	2 ml
Solução de micro-nutrientes	2 ml
Solução de Fe-EDTA	4 ml
Ágar	15 g
Água	1000 ml
Solução de micro-nutrientes	
$NaMoO_4.2H_2O$	0,2 g
$MnSO_4.2H_2O$	0,235 g
H_3BO_3	0,28 g
$CuSO_4.5H_2O$	0,008 g
$ZnSO_4.7H_2O$	0,024 g
Água	200 ml

Os frascos erlenmeyers foram submetidos à agitação em mesa agitadora (200 rpm) e temperatura controlada de 30℃, por um período de 28 dias. O meio GEL fermentado foi trocado semanalmente, mantendo-se o mineral e 10% de volume do mesmo meio original como inóculo. Após o procedimento supracitado, uma amostra (1 ml) de cada erlenmeyer foi retirada e realizada as diluições sucessivas (até 10^{-7}) em solução salina estéril NaCl 0,9% (p/v) e posterior plaqueamento em meio GEL agarizado (15g/L), também adicionado de 0,05 g/L de cloranfenicol, obtendo-se assim as colônias individuais. O pó de rocha foi distribuído superficialmente nas placas com o auxílio de uma alça de Drigalsky, utilizando 0,04 g de flogopitito e glauconito por placa de Petri, esterilizado em tubos Eppendorfs à 1atm/ 20 min. De acordo com o mineral usado, inicialmente foram obtidos os isolados codificados (Esquema 4.1). As placas foram

armazenadas em estufa incubadora a 25±1 ºC e a avaliação do crescimento das colônias foi visual e diária, sendo selecionadas as colônias de acordo com suas características macroscópicas (cor, textura e diâmetro das colônias).

Esquema 4.1: Codificação dos isolados obtidos de acordo com o pó de rocha adicionado ao solo.

XC4A1

X – mineral contido no vaso de isolamento de origem (G ou F)
C – presença de cloranfenicol no meio.
4 – número referente à diluição utilizada na amostra
A – placa origem do isolamento (placas feitas em duplicatas – A e B)
1 – número da colônia no isolamento.

4.5 Obtenção e Classificação dos Isolados

Das placas de contagem, preparadas conforme etapa anterior, foram selecionadas as colônias com características compatíveis a aquelas apresentadas por fungos filamentosos, através da observação do seu verso e reverso. Após a seleção das colônias, procedeu-se o isolamento, utilizando-se o método de esgotamento, com o auxílio de uma alça de platina esterilizada para repicar o inóculo na superfície de 10 ml de meio GEL agarizado previamente depositado em placa de Petri. O processo foi repetido até obtenção de colônias puras, homogêneas a olho nu e posteriormente estas foram verificadas ao microscópio.

4.5.1 Classificação do isolados

Os isolados foram mantidos e cultivados continuamente no meio GEL em tubos e placas, armazenados a 4 ºC e mantidos através de repiques sucessivos. Estes foram levados a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), ao Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos para serem classificados e

devidamente preservados na Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos (CCFF) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), sob a curadoria da Dra. Maria Inez de Moura Sarquis.

Após crescimento das cepas em meio Sabouraud (SAB) (Tabela 4.2) adicionado de 0,05g de cloranfenicol, durante 7 e 14 dias, as colônias foram avaliadas com relação a seus aspectos macro e micromorfológicos através do método de microcultivo, onde um pequeno bloco do meio nutritivo, específico é inoculado sobre a lâmina, recoberto em seguida por uma lamínula, visando o crescimento da colônia por baixo da mesma, segundo modificação de Rivalier & Seydel, 1986. Em seguida, após 7 e 14 dias, respectivamente, as lâminas foram retiradas para visualização das estruturas reprodutivas e vegetativas em microscópio e analisadas mediante bibliografia específica para cada gênero fúngico, segundo Raper &Fennell (1965), Gerlach & Nirenberg (1982) e O`Donnell (1979).

Tabela 4.1 Composição do meio AGAR SABOURAUD (SAB)

Reagentes	Quantidades
Glicose	30,0 g
Extrato de levedura	3,0 g
Peptona	10,0 g
Ágar-ágar	18,0 g
Água destilada	1.000 ml

Os meios utilizados para crescimento das colônias durante o processo de identificação foram: Batata Dextrose Agar (PDA – Difco), Extrato de Malte (MEA - Difco) e CZAPECK Dox Agar (CZ - Merck), usados de acordo com o gênero classificado.

Após a identificação, cada cepa foi catalogada e recebeu um acrônimo IOC.

4.6 Lixiviação Biológica

4.6.1 Avaliação da concentração de potássio encontrado no meio Gel

Durante a utilização do meio Gel no processo de crescimento das cepas e lixiviação biológica os resultados nos levaram a indagar sobre sua composição e possível influência nas concentrações de K encontrados.

Visando responder tal questionamento, foram preparados 100ml de meio Gel, conforme tabela 4, e 100ml de meio Gel modificado, sem adição do extrato de levedura.

Posteriormente as concentrações de K foram avaliadas pela fotometria de chama, e assim, pôde-se analisar as possíveis diferenças nos valores obtidos para K.

4.6.2. Avaliação da biossolubilização por linhagens fúngicas

Dos dez isolados, cinco foram confirmados como sendo cepas fúngicas e foram avaliadas quanto ao seu potencial em liberar potássio em meio de cultura GEL líquido (DALCIN, 2008), sendo este modificado pela retirada do extrato de levedura, como mencionado acima, afim de se extinguir toda e qualquer fonte de potássio que não fosse proveniente do pó de rocha; uma vez que a adição do extrato de levedura representava uma elevada concentração de potássio do meio.

Foram utilizados 34 erlenmeyers de 250 mL de capacidade, cada um contendo 100 mL de meio Gel liquido sem extrato de levedura, onde em 12 foram adicionados 10g de glauconito, em outros 12, 10 g de flogopitito e em 10 somente meio Gel e as amostras fúngicas.

Para cada cepa fúngica foram inoculados 2 erlenmeyers, com o seu respectivo meio, com ou sem mineral de acordo com a Tabela 4.3.

Para o inóculo, um cultivo crescido de cada cepa em meio Gel foi suspenso em água destilada estéril e foram adicionados aos erlenmeyers uma concentração de 10^7 de esporos/mL.

Tabela 4.2: Composição dos meios utilizados e as linhagens isoladas testadas nos ensaios de biossolubilização.

Condição do meio	Inóculo
Meio Gel + Glauconito	GC4A1 GC4A2 GC6A1 FC4A1 FC5B1 GG (Branco)
Meio Gel + Flogopitito	GC4A1 GC4A2 GC6A1 FC4A1 FC5B1 GF (Branco)
Meio Gel	GC4A1 GC4A2 GC6A1 FC4A1 FC5B1 GG (Branco)

Os erlenmeyers foram mantidos sob agitação em mesa agitadora com rotação constante de 150 rpm e temperatura de 30ºC durante 14 dias. As amostras foram centrifugadas a 6.000 rpm por 10 min, filtradas em membrana de 0,45μm e armazenadas em geladeira a 4ºC.

O método analítico empregado para a determinação do potássio das amostras foi a fotometria de chama realizada pelo laboratório da Coordenação de

Processamento Mineral (COPM), do CETEM/MCT e a absorção atômica de chama com C_2H_2/ar, esta última realizada pela COAM/CETEM.

Para cálculo do teor de potássio solubilizado por cada isolado, foi utilizada a equação abaixo, conforme Dalcin (2008):

(Equação 1): Cálculo do total de potássio solubilizado pelo isolado (DALCIN, 2008)

$$TSIaRa = NMIaRa - NM_{00} - (NMIa_0 - NM_{00}) - (NM_0Ra - NM_{00})$$

Onde:

TSIaRa = Total solubilizado no meio de cultura pelo isolado A na presença da rocha A.

NMIaRa = teor do nutriente no meio de cultura do isolado A na presença da rocha A.

NM_{00} = teor do nutriente no meio de cultura não inoculado e sem rocha.

$NMIa_0$ = teor do nutriente no meio de cultura do isolado A sem rocha.

NM_0Ra = teor do nutriente no meio de cultura com a rocha A sem inoculação.

4.6.3 Determinação do pH

Cada amostra, após centrifugação e filtragem, teve seu pH medido em pHmetro para futura comparação quanto ao pH inicial.

4.6.4 Reação de Furt-Herman

As amostras foram testadas por meio da Reação de Furt-Herman com o objetivo de se observar a presença ou não do ácido cítrico.

A reação consiste em adicionar 0,5 ml de anidrido acético, 0,5 ml de piridina a 1 ml de alíquota da amostra. Durante a reação, que ocorre entre os reagentes com o ácido cítrico presente na amostra, é possível analisar qualitativamente a presença deste ácido através da mudança de cor do meio, que se torna um vermelho – carmim.

4.7 Cultivo de girassol utilizando pó de rocha e fungo

Os cinco isolados fúngicos, provenientes da rizosfera do girassol, foram avaliados quanto a eficiência na liberação do potássio, contido nos dois tipos de pó de rocha, auxiliando no crescimento vegetal.

4.7.1 Preparo do inóculo

As cinco cepas fúngicas, foram crescidas em tubo inclinado contendo meio Gel agarizado durante sete dias. Após a incubação, adicionaram-se a cada tubo, 5 ml de água destilada estéril, seguindo-se de agitação manual até obter-se uma suspensão microbiana homogênea. Em erlenmeyers de 500 ml de capacidade contendo 350 ml de meio Gel liquido, foram inoculados 1 ml da suspensão de esporos obtida.

Os cinco isolados crescidos em meio liquido foram: GC4A1, GC4A2, GC6A1, FC4A1 e FC5B1.

Os erlenmeyers foram mantidos em mesa agitadora a 130 rpm por 7 dias a temperatura ambiente.

4.7.2 Cultivo

Cada vaso contendo 1 kg de solo, adicionado das relações nutricionais para N:P:K conforme o cultivo feito para isolamento (item 4.4), foi suplementado separadamente com as seguintes concentrações de pós de rocha, flogopitito 1,2 g/kg de solo e glauconito 1,13 g/kg de solo, e cada composição solo-mineral foi inoculado com 50 mL de uma determinada cepa fúngica crescida em meio Gel liquido (conforme seção 4.8.1). Ainda foram adicionados 50 mL de água. Os materiais foram misturados manualmente. O período de cultivo ocorreu durante o mês de janeiro a fevereiro.

Como na lixiviação biológica, os vasos foram preparados em duplicatas. Além disso, foram feitos vasos contendo apenas solo e semente (representando o controle) e vasos com solo e cepas, sem mineral; totalizando assim 36 vasos. Em

cada vaso foram cultivadas três sementes de girassol (EMBRAPA V 122). Durante o período do ensaio, os vasos permaneceram em local arejado, com boa luminosidade natural e, a cada 24 h, foram regados para favorecer a germinação e crescimento das sementes. Após 20 dias, as plantas foram retiradas, e o comprimento do caule e raiz foram medidos, ainda foram contados o número de folhas.

4.8 CURVA DE CALIBRAÇÃO

Para a detecção da concentração de potássio nas amostras, realizadas através do fotômetro de chama, fez-se necessária a obtenção da curva de calibração, pois esta permitirá correlacionar o sinal lido com a concentração de potássio presente nas amostras.

Para determinação da concentração de K (em mg/L) das amostras através do método de fotometria de chama, estabeleceu-se uma curva padrão de calibração correlacionando a concentração real com o valor lido no aparelho por meio de diluições conhecidas de 0 a 100 (O; 12,5; 25; 50 e 100) utilizando-se solução padrão da *Analyser* potássio (KCl) 100ppm.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da Amostra de Glauconita e Flogopitito

Nesta etapa foi realizada determinação detalhada das características mineralógicas dos materiais selecionados e obtidos para o desenvolvimento do projeto. A mineralogia, indicador do potencial de solubilidade e da capacidade de liberação de K é fator extremamente importante na escolha das rochas.

5.1.1 Difração de Raios-X

Para a análise por Difração de Raios-X (DRX) foi utilizado, tanto para a amostra de verdete (glauconito), quanto para a amostra de flogopitito, o método do pó.

Na Figura 5.1 é apresentado do difratograma relativo à amostra do glauconito. As fases cristalinas encontradas no material são glauconita (picos em azul) e microclínio (picos em verde). Já na Figura 5.2 é apresentado o difratograma da amostra de flogopitito, onde foram identificados picos que correspondem aos minerais flogopita, clorita e talco. Os picos marcados como Co KB são resultantes de reflexões repetidas da flogopita (radiações Co Kb) e, portanto não devem ser considerados.

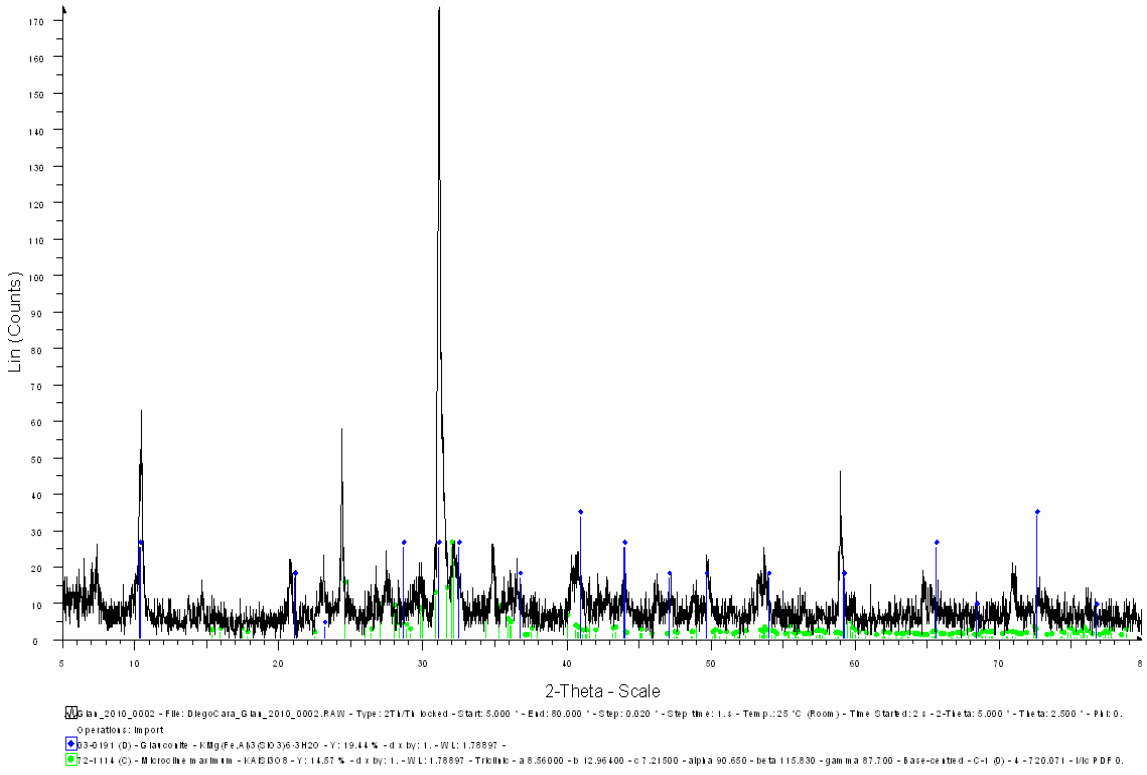

Figura 5.1. Difratogramas de raios X da amostra de glauconito.

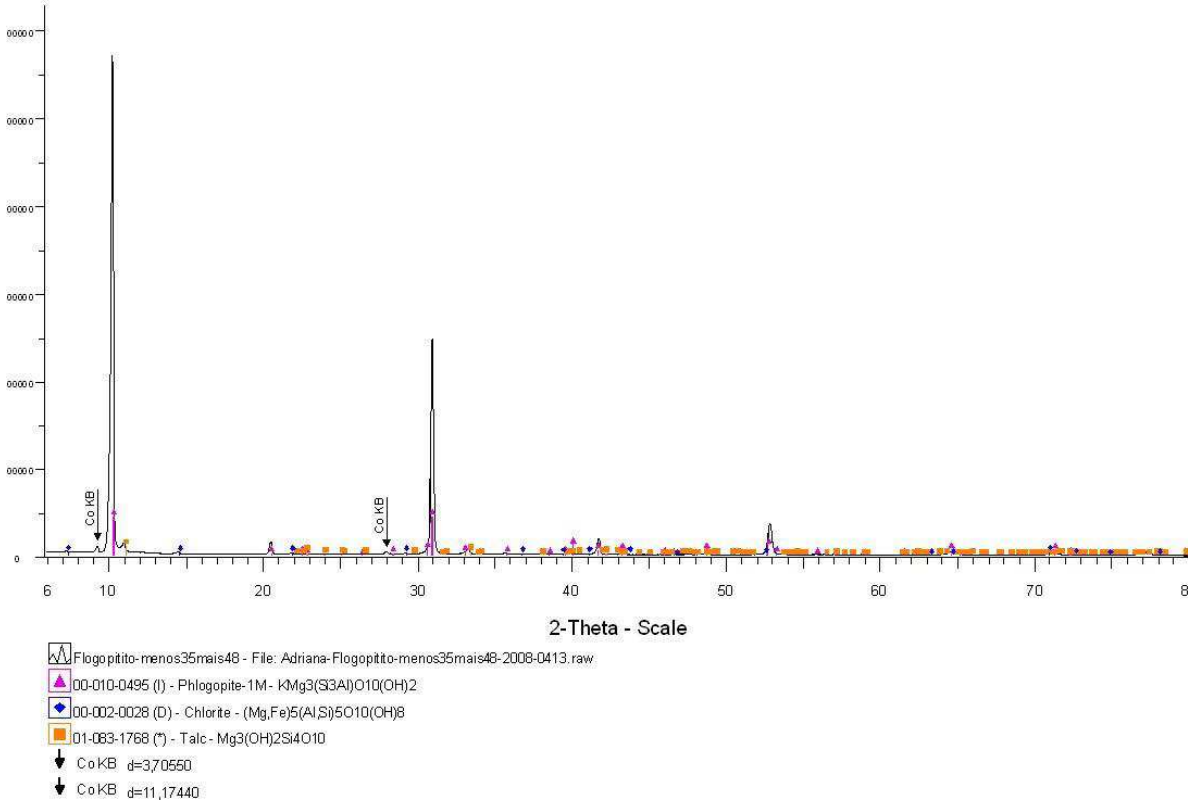

Figura 5.2. Difratogramas de raios X da amostra de flogopitito.

5.1.2 Análise Elementar

Os resultados obtidos após a análise elementar da amostra de glauconito mostraram os teores de Si, Fe, Al, Mg e K, observados na tabela 5.1.

Observa-se que a amostra do verdete de Abaeté usada apresenta 9,5% de K_2O, diferente do citado por Eichler (1983), onde o verdete de Abaeté apresenta cerca de, 11,4% de K_2O.

Tabela 5.1: Percentual (%) dos elementos determinados na amostra de glauconita

Elementos	**Concentração (%)**
SiO_2	63,7 %
Fe_2O_3	3,8 %
Al_20_3	13,9 %
MgO	1,2 %
K_2O	9,5 %

Mesmo assim, o teor de K_2O obtido confirma o potencial uso do glauconito para os ensaios de biossolubilização.

5.1.3 Fluorescência de Raios X

Os resultados da composição elementar da amostra de flogopitito, obtidos pela técnica de fluorescência de raios X, são apresentados na tabela 5.2.

Tabela 5.2: Composição elementar da amostra de flogopitito (p/p) expressa em óxidos.

Elementos	**Concentração (%)**
CaO	0,4%
Cr_2O_3	0,5%
SiO_2	43,9%
MnO	0,2%
NiO	0,2%
Fe_2O_3	8,1 %
Rb_2O	0,4%
Al_20_3	12,1 %
MgO	20,8%
TiO_2	0,2%
K_2O	9,0 %

Observa-se o teor de 9,0% de K_2O, indicando ser este, assim como o glauconito, uma rocha com potencial para o desenvolvimento no estudo de biossolubilização.

A concentração de MgO, cerca de 20,8%, também é interessante, uma vez que o magnésio é um macronutriente necessário ao vegetal e que tem, entre outras funções, a importância como componente da molécula de clorofila e produção de ATP.

5.2 Identificação dos isolados da rizosfera de girassol

Foram isoladas da rizosfera de girassol 10 colônias. Desses isolados, 5 eram compostos por leveduras e 5 por fungos filamentosos, sendo a maior parte deles (60%) obtidos do solo adicionado de glauconito na forma de pó de rocha, 6 cepas. Da mesma forma a maioria dos isolados classificados com fungos filamentosos, 60%, foram obtidos do solo adicionado desse mineral, um total de 3 cepas (Tabela 5.3).

Tabela 5.3. Isolados obtidos da rizosfera de girassol.

Isolado	**Grupo**	**Origem**
GC4A1	Fungo Filamentoso	Solo + glauconito
GC4A2	Fungo Filamentoso	Solo + glauconito
GC5A1	Levedura	Solo + glauconito
GC6A1	Fungo Filamentoso	Solo + glauconito
GC4B1	Levedura	Solo + glauconito
GC5B1	Levedura	Solo + glauconito
FC4A1	Fungo Filamentoso	Solo + flogopitito
FC5A1	Levedura	Solo + flogopitito
FC6A1	Levedura	Solo + flogopitito
FC5B1	Fungo Filamentoso	Solo + flogopitito

As cepas foram classificadas através da taxonomia clássica e encontram-se preservadas na Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos/ IOC através dos métodos de preservação em óleo mineral, água destilada e liofilização. A identificação das espécies está relacionada na tabela 5.4, juntamente com o seu respectivo código de preservação. As características macroscópicas das cepas são apresentadas na figura 5.3.

Tabela 5.4 Identificação dos isolados fúngicos

Isolados	Espécies	Código de preservação na CCFF/IOC
GC4A1	*Fusarium sp.*	IOC 4605
GC4A2	*Fusarium sp.*	IOC 4608
GC6A1	*Aspergillus sp.*	IOC 4611
FC4A1	*Mucor sp.*	IOC 4607
FC5B1	*Aspergillus sp.*	IOC 4609

Figura 5.3: Isolados da rizosfera de girassol. Da esquerda para a direita: GC6A1(*Aspergillus sp*.), FC5B1 (*Aspergillus sp.*), GC4A1 (*Fusarium sp*.), GC4A2 (*Fusarium sp*.) e FC4A1 (*Mucor sp*.).

Durante o processo de identificação os fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus sp*. foram mantidos em meio Czapek Dox agar ou Extrato de Malte e os outros gêneros em meio BDA.

Santos *et al.* (1989) e Souza-Mota *et al.* (2003), descreveram resultados similares isolando fungos da rizosfera de cana-de-açúcar e girassol, respectivamente, encontrando predominância de fungos anamórficos.

De acordo com Garret (1976), as técnicas usadas na contagem de microrganismos como observação direta ao microscópio ou diluições sucessivas, mostram uma predominância de fungos anamórficos. Técnicas modernas, como *polymerase chain reaction* em tempo real (q-PCR), buscam ampliar o número de microrganismos encontrados nos mais diferentes ambientes, como por exemplo, no solo.

Fungos filamentosos, como ascomycetes, basidiomycetes, zygomycetes e fungos anamórficos, esses dois últimos grupos sendo predominante em nosso trabalho, são frequentemente encontrados em superfície, fissuras e fendas de rochas e em substratos minerais (GADD *et al.* 2005).

Os fungos do gênero *Aspergillus* têm grande importância na área médica, pois algumas espécies são patógenas oportunistas aos homens e animais. Além disso, são produtores de metabólicos secundários de interesse industrial tais como: antibióticos, ácidos orgânicos e uma gama de enzimas industriais (SARQUIS, 2002).

Já os fungos do grupo Zigomycetes são cosmopolitas, predominantemente encontrados no solo e muitas vezes fazendo parte da rizosfera. Também podem ser usados como controle biológico, produção de ácidos orgânicos etc.

Algumas espécies de *Fusarium* são consideradas cosmopolitas e muitas têm ganho importância na área da agricultura, meio ambiente e saúde por serem produtoras de micotoxinas. Existem ainda espécies que podem ser fitopatógenas e outras que vivem em simbiose com a planta.

5.3 Curva de Calibração

A equação da reta obtida para curva de calibração do potássio é descrita como: y = 1,0762x e o R^2 = 0,9528 (figura 5.4).

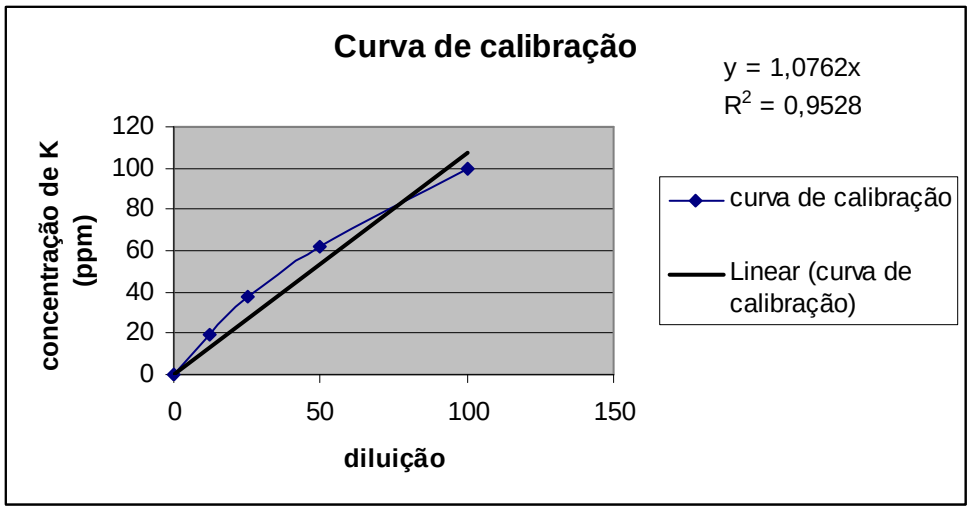

Figura 5.4: Gráfico da curva de calibração mostrando a leitura do fotômetro de chama em diferentes concentrações.

A equação da reta obtida através da curva de calibração foi utilizada nas leituras da concentração de K (mg/L) tanto para a lixiviação química como para a lixiviação biológica.

5.4 Lixiviação Química Utilizando Flogopitito

A lixiviação química é uma etapa importante para avaliar e, futuramente, comparar os resultados nela obtidos com os oriundos da solubilização biológica.

5.4.1. Avaliação através da Metodologia de Absorção Atômica

A figura a seguir mostra a extração do potássio do flogopitito (Figura 5.5), empregando o método de absorção atômica.

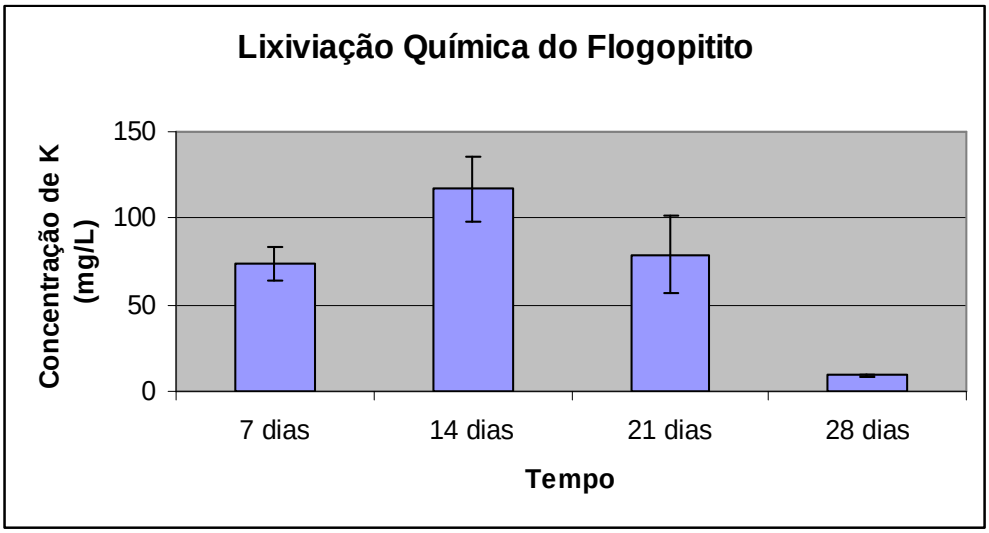

Figura 5.5: Resultado da lixiviação química de potássio de flogopitito com extratante Merlich 1 por absorção atômica.

Os resultados obtidos através do método de absorção atômica mostram uma melhor extração de K após 14 dias de ensaio, havendo um decréscimo depois deste período uma queda na extração de K no 28º dia, o que também pode indicar um erro de amostragem.

Esses resultados mostram-se inferiores aos obtidos por Silva (2009), porém, cabe ressaltar que o método analítico utilizado neste ensaio (Absorção Atômica) foi diferente do utilizado pelo autor (fotometria de chama).

5.4.2. Avaliação através da Metodologia de Fotometria de Chama

A figura a seguir mostra a extração do potássio do flogopitito (Figura 5.6), empregando o método de fotometria de chama.

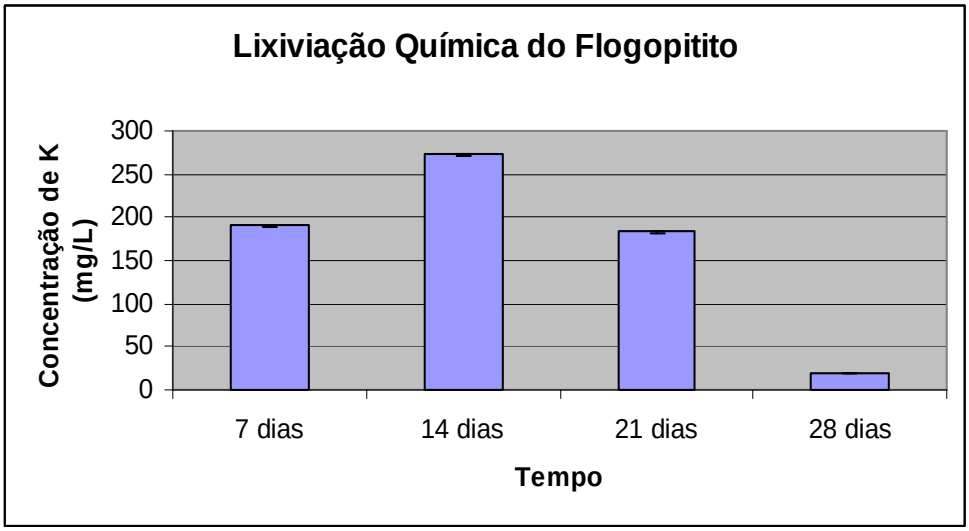

Figura 5.6: Resultado da lixiviação química de potássio de flogopitito com extratante Mehlich 1 por fotometria de chama.

É sabido que soluções ácidas podem favorecer o intemperismo dos minerais presentes na amostra uma vez que o aumento da concentração de íons em solução favorece a troca iônica do K^+ (SILVA *et al*. 2009), por isso acredita-se que a extração química utilizando ácido clorídrico (HCl) e ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácidos extremamente fortes, tenha sido tão eficiente. A constante de dissociação de prótons desses ácidos é alta, o que favoreceria uma maior troca iônica entre K^+ e H^+ da flogopita (SILVA, 2009).

A concentração máxima de K^+ extraído do flogopitito com o uso de solução Mehlich-1 foi de 272,6 mg/L, após 14 dias, os resultados demonstram uma tendência de queda na extração de K a partir desse período de tempo, o que pode também, como dito anteriormente, ser devido a um erro de amostragem, sendo necessária a repetição dos ensaios. Mesma cinética apresentada pela metodologia de absorção atômica. Sabendo-se que existem na amostra cerca de 9,0% de K_2O, este valor representa 3,65% do potássio presente no flogopitito.

Esses resultados encontram-se muito próximos aos encontrados por Silva (2009) para o mesmo tipo de solução (Mehlich-1), a autora após aproximadamente

180 horas (7,5 dias), obteve cerca de 120 mg/L de potássio em solução, por isso foi mantida a análise por fotometria de chama nos ensaios subseqüentes.

Alguns estudos apresentam melhores resultados para lixiviação química quando a amostra passa por algum tipo de pré-tratamento, como por exemplo, térmico. Tais tratamentos expandem as lamelas do mineral, aumentando a disponibilidade dos íons potássio (Silva, 2009), porém são onerosos e trabalhosos.

Por isso, a busca por métodos economicamente viáveis pelos quais esse tipo de rocha possa ser aplicada *in natura* se faz necessário.

5.5 Teste da concentração de K em meio Gel

Conforme descrito na seção 4.6.1, a concentração de K no meio Gel foi avaliada quanto a presença ou ausência do extrato de levedura em sua composição. A figura 5.7 mostra a variação da concentração de K nas duas diferentes composições do meio, analisada mediante metodologia de fotometria de chama.

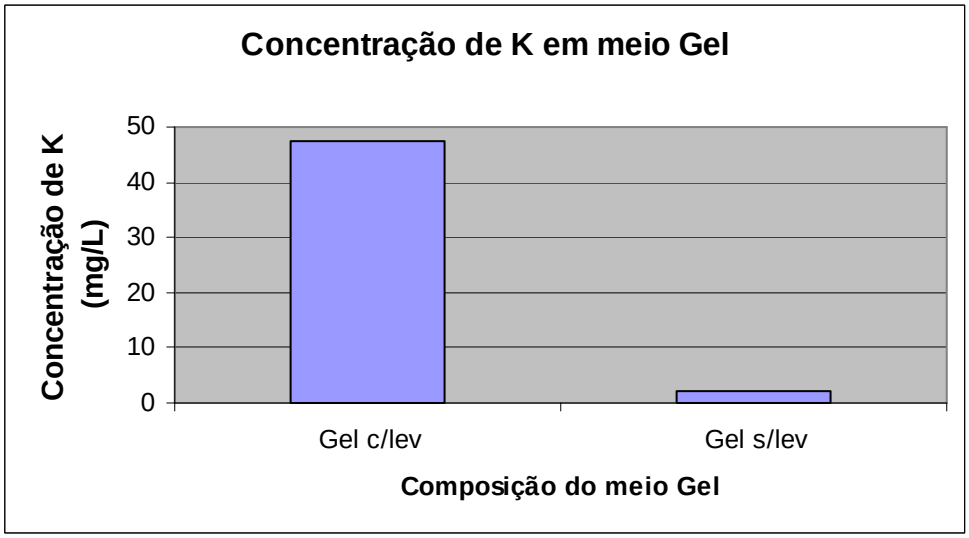

Figura 5.7: Resultado da concentração de K encontrado no meio Gel líquido com extrato e levedura e sem extrato de levedura.

Como mostra o gráfico, a concentração de K no meio Gel líquido contendo extrato de levedura é muito superior à encontrada no mesmo meio sem a sua adição, quase 25 vezes maior, uma vez que na composição do extrato de levedura

podemos encontrar uma gama de nutrientes, incluindo o potássio. Esta alta concentração de potássio no meio Gel, devido a presença do extrato de levedura, já havia sido relatada por Dalcin (2008), que visando diminuir este valor, já havia diminuído as concentrações deste nutriente. Porém visando estimular a solubilização pelos microrganismos, no meio Gel utilizado para lixiviação biológica o extrato de levedura foi retirado, a fim de tentar minimizar interferências de fontes de potássio que não fossem provenientes do pó de rocha.

5.6 Análise da variação de pH.

O pH inicial do meio gel liquido sem extrato de levedura foi ajustado para 6 e após 14 dias as amostras foram centrifugadas, filtradas e os valores de pH medidos em pHmetro. Os resultados da variação de pH das amostras de meio adicionado das cepas fúngicas e do mineral flogopitito estão apresentados na figura 5.8.

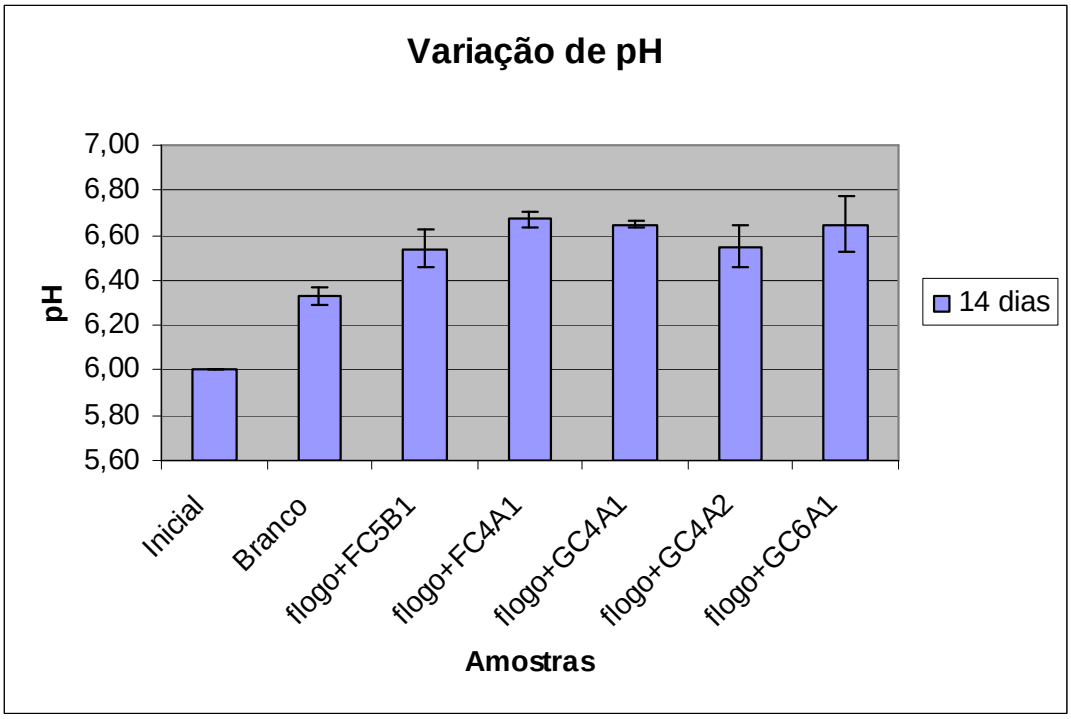

Figura 5.8: Variação do pH do meio (inicial) e após 14 dias dos ensaios obtidos das amostras fúngicas com flogopitito.

Da observação da figura 5.8, constata-se que as amostras não alteraram o pH do meio de forma significativa.

Todo o meio Gel liquido teve seu pH inicial ajustado para 6 (inicial), porém quando o meio foi adicionado com os isolados e o mineral ou o meio com o mineral, as amostras apresentaram um pequeno aumento com relação a este valor. No tratamento do meio com o pó de rocha, já foi observado um aumento do pH (6,3), podendo indicar uma possível liberação de sais para a solução (LOPES-ASSAD *et al.*, 2006). Este aumento foi um pouco maior no meio onde as mostras foram inoculadas com os isolados, podendo, também, ocorrer pela liberação de sais para a solução ou ser resultante da própria atividade metabólica dos fungos. O mesmo resultado foi verificado para as amostras contendo meio adicionado com os isolados e glauconito (resultados não demonstrados). Nenhuma das amostras foram capazes de alterar drasticamente o pH do meio. Todas permaneceram na faixa de valores de pH entre 6-7.

Lopes-Assad (2006), relata em testes de solubilização de uma linhagem de *Aspergillus niger* com rochas ultramárfica alcalina e flogopitito, o poder relativamente grande em acidificar o meio já nos primeiros 7 dias (pH 2,7 e 3,5, respectivamente), permanecendo até o 21º dia, com um leve aumento (3,7) para a rocha ultramárfica alcalina e diminuindo para o flogopitito (cerca de 2,5).

Max (2010), em sua revisão sobre produção de ácido cítrico, traz uma relação de fungos capazes de produzir este ácido, entre eles encontram-se muitos pertencentes ao gênero *Aspergillus*. O ácido citrico, assim como todos pertencentes ao grupo dos ácidos orgânicos, teria a capacidade de acidificar o meio, desestabilizando os minerais presentes e, possivelmente, liberando o potássio (LOPES-ASSAD *et al*, 2006). Porém tais resultados não puderam ser observados em nossas amostras, inclusive nas classificadas dentro do gênero *Aspergillus* (código: GC6A1 e FC5B1).

Se houve produção e liberação de ácidos orgânicos pelos isolados, estes não se mostraram capazes de acidificar o meio, alterando assim o seu valor de pH.

5.6.1 Reação de Furt-Herman

Todos os isolados foram testados através da reação de Furt-Herman, mas em nenhum foi possível detectar, qualitativamente, a presença do ácido cítrico. Pois em nenhuma das amostras houve mudança da coloração do meio, que caracterizasse a presença do ácido cítrico ou do ácido oxálico.

É possível concluir que não foram formados ácidos orgânicos pelas amostras ou estes foram produzidos em quantidades muito pequenas, não detectadas qualitativamente.

5.7 Avaliação da biossolubilização por linhagens fúngicas isoladas.

5.7.1 Biossolubilização do flogopitito.

Os resultados obtidos através da metodologia de fotometria de chama da biossolubilização de flogopitito em 2 semanas (14 dias) pelas cepas fúngicas isoladas de rizosfera de girassol está apresentado na Figura 5.9.

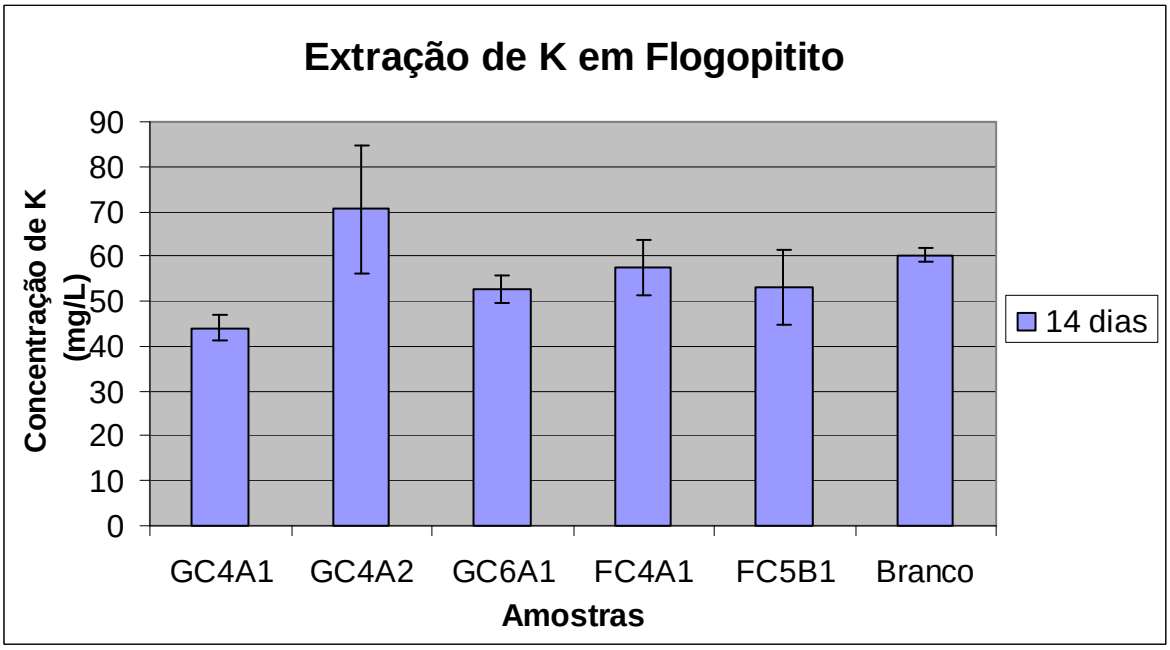

Figura 5.9. Solubilização de potássio a partir de flogopitito utilizando as linhagens de fungos em meio líquido contendo 10% p/p do mineral, em 14 dias.

Usando-se a equação 1 pode-se saber o quanto cada cepa fúngica foi capaz de solubilizar do potássio contido no mineral. Os resultados estão expressos na tabela 5.5.

Tabela 5.5: Resultados obtidos para flogopitito através da metodologia de fotometria de chama e total de solubilização calculado para cada isolado.

Amostras	Médias dos resultados obtidos (mg/L)	Total solubilizado pelo fungo (mg/L)
GC4A1	44,12	-17,23
GC4A2	70,49	8,07
GC6A1	52,73	-8,62
FC4A1	57,58	-5,38
FC5B1	53,27	-9,69
Branco	60,27	

Observando tanto a figura 5.9 quanto a tabela 5.5 podemos notar que somente a cepa GC4A2 (*Fusarium sp*.) apresentou teor de solubilização positiva, podendo esta ser uma solubilizadora de potássio em potencial. Observando a figura 5.9 vemos que a liberação de K por esta linhagem foi superior 17% aquela apresentada pelo controle.

A maioria dos isolados apresentaram valores de solubilização negativos. Como o mecanismo de solubilização ainda não é amplamente conhecido, é possível supor que os níveis das amostras abaixo daquele que é apresentado pelo controle possam ocorrer por algum consumo por parte do isolado do potássio que está sendo liberado; uma vez que os microrganismos podem adquirir nutrientes essenciais para o seu desenvolvimento através das superfícies minerais (GADD *et al.,* 2005); ou observando os desvios apresentados pelas amostras que essas não foram capazes de solubilizar o potássio, apresentando níveis de solubilização igual ao controle.

5.7.2 Biossolubilização do glauconito.

Os resultados obtidos através da metodologia de fotometria de chama da biossolubilização de glauconito em 2 semanas (14 dias) pelas cepas fúngicas isoladas de rizosfera de girassol está apresentado na Figura 5.10.

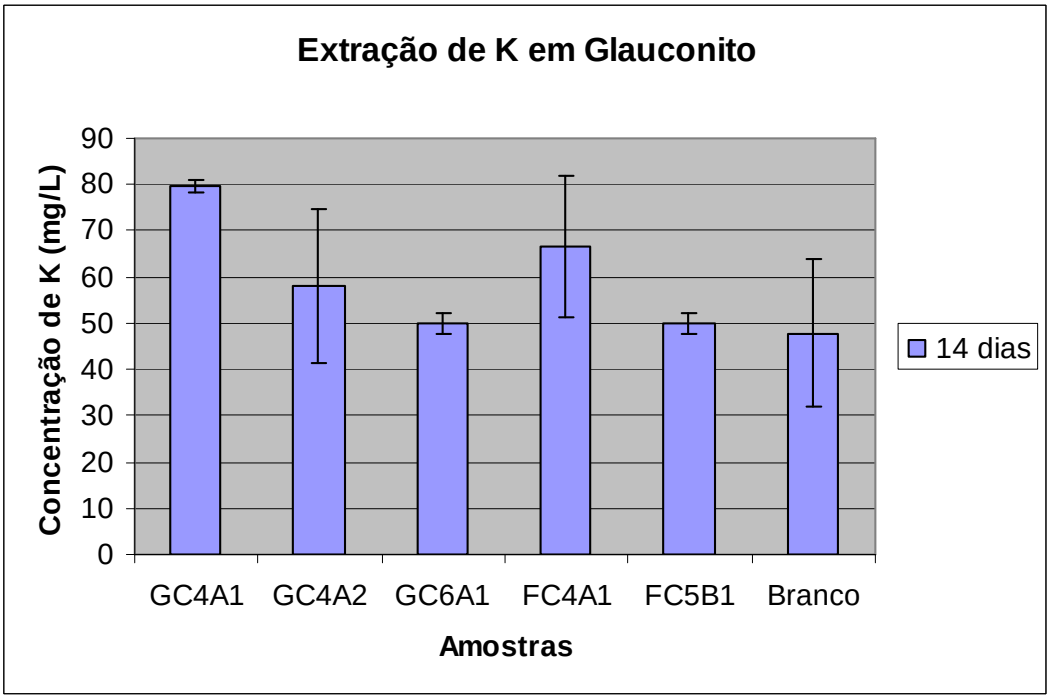

Figura 5.10. Solubilização de potássio a partir de glauconito utilizando as linhagens de fungos em meio líquido contendo 10% p/p do mineral, em 14 dias.

Novamente, aplicando-se a equação 1 pode-se saber o quanto cada cepa fúngica foi capaz de solubilizar o potássio contido no mineral. Os resultados estão expressos na tabela 5.6.

Tabela 5.6: Resultados obtidos para glauconito através da metodologia de fotometria de chama e total de solubilização calculado para cada isolado.

Amostras	Médias dos resultados obtidos (mg/L)	Total solubilizado pelo fungo (mg/L)
GC4A1	79,64	30,87
GC4A2	58,11	8,27
GC6A1	50,04	2,28
FC4A1	66,72	16,34
FC5B1	50,04	1,27
Branco	47,89	

Ao analisar a figura 5.10 e a tabela 5.6 podemos observar que todos os isolados apresentaram um potencial de solubilização positivo, ao contrário do ocorrido na biossolubilização do flogopitito, sendo o isolado que apresentou maior teor de solubilização o GC4A1 (*Fusarium sp*.) seguido do isolado FC4A1 (*Mucor sp.*), depois o GC4A2 (*Fusarium sp*.) e finalmente os isolados GC6A1 (*Aspergillus sp.*) e FC5B1 (Aspergillus sp.). Observando a figura 5.10, constatamos que o isolado GC4A1 obteve aproximadamente 60% de liberação de K a mais do que aquele apresentado pelo controle (branco).

5.7.3 Análise comparativa da biossolubilização do potássio pelos isolados fúngicos a partir de flogopitito e glauconito.

Para fins comparativos, na figura 5.11 foram plotados os valores da biossolubilização do glauconito, bem como os da biossolubilização para o flogopitito.

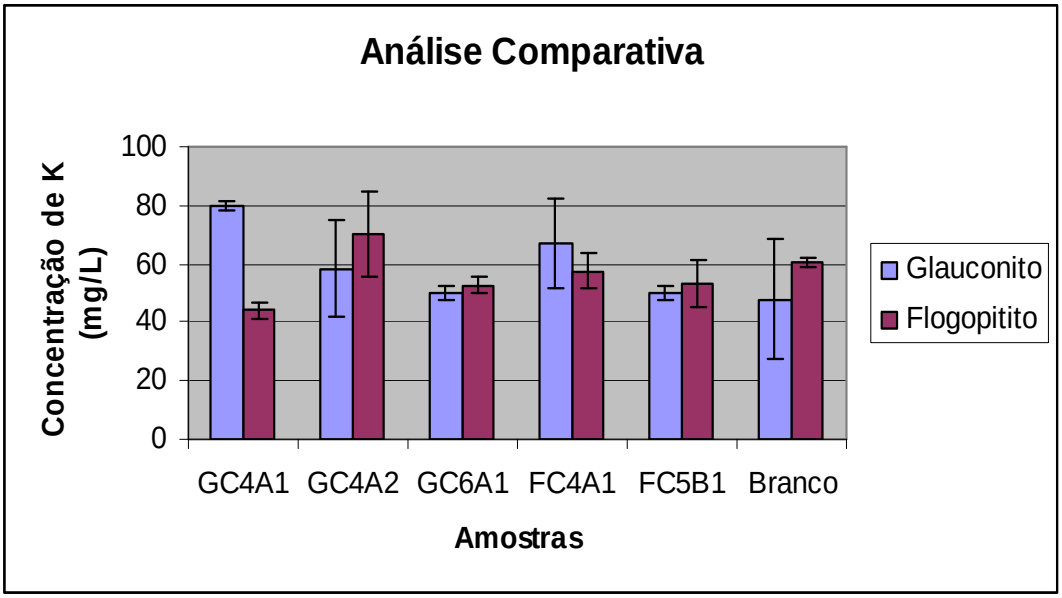

Figura 5.11: Análise comparativa da biossolubilização do potássio a partir do glauconito e do flogopitito.

Ao observar a comparação dos valores obtidos da biossolubilização do potássio para os dois pós de rocha, verifica-se que uma maior parte dos isolados foram capazes de liberar teores de K para o meio utilizando como fonte o glauconito.

A cepa GC4A2 (*Fusarium sp.*) foi a única que se mostrou eficiente na biossolubilização dos dois tipos de rochas.

O isolado GC4A1 na presença de glauconito apresentou o maior percentual de extração de K, 1,07% em relação ao branco, mesmo assim este ainda é muito inferior ao conseguido pela lixiviação química (3,65%).

Assim como relatado por Barbosa Filho *et al.* (2006) e Nascimento *et al.* (2008), podemos perceber que um dos fatores que influenciam a liberação de K das rochas é o tipo de rocha utilizada. Observamos que a maior extração obtida foi através da biossolubilização do glauconito. Tais autores também citam como fatores de influência, o tempo de contato das rochas com o microrganismo e as suas frações granulométricas, fatores esses não avaliados no presente trabalho.

5.8 Avaliação do cultivo de girassol em solo suplementado com pó de rocha.

Foram cultivados em vasos, suplementados com e sem os dois diferentes pós de rocha cada um com um dos 5 isolados, 3 sementes de girassol e estes foram observados diariamente durante 20 dias.

Uma semana após o plantio, as sementes começaram a germinar e as mudas começaram a aparecer. Porém, chegando ao 15º dia, várias mudas começaram a morrer, apresentando sintomas correspondentes aqueles mencionados como sendo conseqüência da carência de potássio (Figura 5.12) e continuaram a morrer até o 20º dia (Figura 5.13), quando as mudas foram retiradas para medida.

Figura 5.12: Muda começando a apresentar sintomas referente à carência de potássio.

Figura 5.13: Mudas em processo de morte.

A relação entre a quantidade de mudas germinadas com o vaso correspondente encontra-se representado na tabela 5.7.

Tabela 5.7: Quantidade de mudas germinadas de acordo com vaso cultivado.

Vaso	Quantidade de mudas germinadas
Glauconito + FC5B1	4
Glauconito + FC4A1	2
Galuconito + GC4A1	0
Glauconito + GC4A2	2
Glauconito + GC6A1	1
Flogopitito + FC5B1	0
Flogopitito + FC4A1	1
Flogopitito + GC4A1	2
Flogopitito + GC4A2	2
Flogopitito + GC6A1	1
GC4A2	0
GC4A2	2
GC6A1	2
FC4A1	5
FC5B1	2
Solo + Glauconito	0
Solo + Flogopitito	0
Solo + Girassol	0

Mesmo assim, podemos considerar como positiva, neste ensaio e nestas condições, a influência dos isolados no processo de germinação das sementes e crescimento das mudas, pois não foi observada germinação em nenhum dos vasos sem inóculo (controle). Além disso, 7 mudas permaneceram vivas até o 20º dia de cultivo, desse total 5 (71,4%) eram provenientes de vasos que continham isolados e mineral. As quais puderam ser medidas e observadas quanto ao seu maior desenvolvimento em detrimento daquelas que apresentavam somente o inoculo fúngico sem mineral (Tabela 5.8).

De um total de 108 sementes cultivadas, somente 26 germinaram, correspondendo a 24,07% do total.

Tabela 5.8: Quantidade e medidas das mudas remanescentes até o 20º dia de cultivo.

Vasos	Quantidade de mudas remanescentes	Média das raízes (cm)	Média dos caules (cm)
FC4A1	2	6,0	6,0
Glauconito + FC5B1	1	6,0	8,0
Glauconito + GC4A2	2	6,5	2,5
Flogopitito + GC4A1	2	5,5	6,0

Não há como relacionar os resultados obtidos com a eficiência dos isolados em liberar potássio para o solo, pois o maior número de mudas foi observado nos vasos com presença do inóculo: 9 mudas germinadas em vasos contendo glauconito, 6 em vasos com flogopitito, mas nos vasos contendo inóculo porém sem adição do pó de rocha 11 mudas germinaram. Por isso, não podemos negar a influência dos isolados na germinação, desenvolvimento e durabilidade das mudas. A figura 5.14 mostra a diferença no desenvolvimento de uma muda proveniente do cultivo com o mineral e com um isolado e de uma cultivada somente com a adição de outro isolado.

Figura 5.14: Mudas remanescentes (20º dia).

Acredita-se, que por ser o nível de potássio presente no solo utilizado muito baixo (8 mg/L), os vasos usados como controle do solo (sem pó de rocha e inóculo) , mesmo com a adição de nitrogênio e fósforo, não obtiveram germinação das sementes plantadas.

Deve-se, também, levar em consideração o período do plantio, pois as mudas plantadas para obtenção dos isolados germinaram e após 20 dias estavam vivas e com folhas. O período quente do verão, no qual os novos cultivos foram feitos, pode ter influenciado de alguma maneira o desenvolvimento das mudas.

Segundo Martins *et al.* (2008) a eficiência agronômica das rochas depende da sua origem e composição, de fatores correspondentes ao solo, do tempo de incubação, do tratamento químico ou térmico aplicado e das culturas utilizadas. Ele ainda destaca que a utilização direta das rochas é descartada devido à baixa disponibilidade de K para as plantas.

Porém, Alves (2010) obteve valores positivos no uso do complexo rocha-fungo como fonte alternativa de potássio para crescimento de eucalipto.

Uma maior análise da prospecção, caracterização geoquímica, definição de métodos de processamento e avaliação agronômica sistemática dessas rochas

faz-se necessário e poderá resultar em sua melhor utilização como fonte alternativa de potássio.

CAPÍTULO 6: CONCLUSÕES

Foram isoladas 10 colônias de fungos a partir de rizosfera de girassol, em meio GEL, sendo 6 delas na presença de glauconito e 4 na presença de flogopitito. Das 10 linhagens obtidas, cinco foram classificadas como fungos filamentosos e 5 como leveduras.

As cinco linhagens de fungos filamentosos isoladas, foram identificadas por taxonomia clássica como *Fusarium sp. (*GC4A1 e GC4A2), *Aspergillus sp.* (GC6A1 e FC5B1) e *Mucor sp* (FC4A1).

A utilização do meio Gel contendo extrato de levedura não foi considerado viável, uma vez que este componente aumenta consideravelmente o teor de K do meio.

Não foram obtidas mudanças de pH do meio após o processo de lixiviação biológica para nenhuma das amostras testadas.

Nos testes de biossolubilização utilizando linhagens fúngicas, o valor de liberação de K a partir de flogopitito (10% p/p) alcançado em 14 dias pela linhagem GC4A2 foi 17% superior ao controle, enquanto que para linhagem GC4A1 na presença de glauconito, esse percentual aumentou para 66%.

Os valores de liberação de potássio para o meio obtidos até o momento, sugerem potencial de aplicação destes isolados microbianos na biossolubilização de potásssio a partir de flogopitito e glauconito.

Notou-se uma influência positiva dos isolados para germinação e crescimento das mudas de girassol, porém não se pôde relacionar tal beneficio a biossolubilização do potássio existente no pó de rocha.

CAPÍTULO 7: CONSIDERAÇÕES FINAIS: PROBLEMAS E SUGESTÕES

- Realizar testes com outros meios de cultivo para ensaios de biossolubilização.

- Realizar lixiviação química do glauconito, afim de se comparar com os resultados obtidos pela lixiviação biológica.

- Aplicar planejamento estatístico (fatorial ou experimental) para ensaios de solubilização testando diferentes períodos de tempo e diferentes frações granulométricas da rocha.

- Otimizar as condições de cultivo das sementes na presença dos isolados e das rochas utilizando outras técnicas de inoculação., outros controles, etc...

CAPÍTULO 8: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, L.; Oliveira, V. L. & Silva Filho, G. N. Utilization of rocks and ectomycorrhizal fungi to promote growth of eucalypt. Brazilian Journal of Microbilogy. 41: 676-684, 2010.

Amaral, C. & Lage, D. A. Nutrição Vegetal: Funções e Deficiências. Disponível em: <http://www.aquahobby.com/articles/b_nutricao_vegetal.php.> acesso em outubro de 2010.

Barbosa Filho, M. P.; Fageria, N. K.; Santos, D. F. & Couto, O. A. Aplicação de rochas silicáticas como fontes alternativas de potássio para a cultura do arroz de terras altas. Espaço & Geografia, v. 9, n.1, 63:84, 2006.

Bigham, J. M., Bhatti, T. M., Vuorinen, A., Tuovinen, O. H. Dissolution and structural alteration of phlogopite mediated by proton attack and bacterial oxidation of ferrous iron. Hydrometallurgy, 59: 301 – 309, 2001.

Badr M A., Shafei AM, Sharaf-El-Deen SH. The dissolution of K and P-bearing minerals by silicate dissolving bacteria and their effect on sorghum growth. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. 2: 5-11, 2006.

Calvaruso, C.; Turpault, M-P.; FREY-KLETT, P. Root-Associated Bacteria Contribute to Mineral Weathering and to Mineral Nutrition in Trees: a Budgeting Analysis. Applied And Environmental Microbiology 72 (2): 1258–1266, 2006.

Dalcin, G. Seleção de Microrganismos Promotores da Disponibilidade de Nutrientes Contidos em Rochas, Produtos e Rejeitos de Mineração**.** 100p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis (Brasil)2008.

Ehrlich, H. L. How Microbes Influence Mineral Growth and Dissolution. Chemical Geology, 132 : 5-9, 1996.

Eichler, V. Disponibilidade do potássio do verdete de Abaeté calcinado com e sem calcário magnesiano, para a cultura do milho em solos de textura média e argilosa. Tese de mestrado. Escola Superior de Agricultura de Lavras, MG. 1983.

Gadd, G. M.; Semple, K. T. & Lappin-Scott, H. M. Micro-organisms and earth systems: advanceds in geomicrobiology. Society for General Microbiology, USA, 2005.

Garret, S. D.Soil fungi and soil fertility. Pergamon Press, Oxford, 165p,1976.

Gerlach, W. & Nirenberg, H.I. The genus Fusarium a pictorial atlas. Institut für Mikrobiologie Press, Berlin, germany. 1982.

Gleeson, D. B.; Clipson, N.; Melville, K.; Gadd, G. M.; Mcdermott, F. P. Characterization of fungal community structure on a weathered pegmatitic granite. Microbial Ecology 0:1-9. 2005.

Leite, M. V. Fungos Filamentosos do Lodo de Esgoto: Impacto na Microbiota Fúngica e Potencial Enzimático. 65p. Dissertação de Mestrado – Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife-PE (Brasil). 2009.

Lian, B.; Wang, B.; Pan, M.; Liu, C.; Teng, H. H. Microbial release of potassium from K-bearing minerals by thermophilic fungus *Aspergillus fumigatus*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 72: 87-98. 2008.

Lopes-Assad, M. L.; Rosa, M. M.; Erler, G. & Ceccato-Antonini, S. R.; Solubilização de pó-de-rocha por *Aspergillus niger*, Espaço & Geografia, v. 9, n.1, 1-17, 2006.

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

Martins, E. S.; Oliveira, C. G.; Resende, A. V.; Matos, M. S. F. Agrominerais – Rochas silicáticas como fontes minerais alternativas de potássio na agricultura. In:_____ Rochas e Minerais Industriais:Usos e especificações. Ed: Luz, A. B.; Lins, F. A. F.CETEM/MCT, Rio de Janeiro. 2008.

Max, B.; Salgado, J. M.; Rodriguez, N.; Cortés, S.; Converti, A. Dominguez, J. M. Biotechnological production of citric acid. Brazilian Journal of Microbiology, 41:862-875, 2010.

Mazunder, A. K.; Sharma, T.; Rao, T. C. Extraction of potassium from glauconitic sandstone by the roast-leach method. International Journal of Mineral Processing, v.38:111-123. 1993.

Moreira, F. M. S. & Siqueira, J. O. Microbiologia do Solo. 2 ed. Editora UFLA, 2006.

Melahmed, R., Gaspar, J.C. e Miekeley, N. Pó de rocha como fertilizante alternativo para sistemas de produção sustentável *in* Fertilizantes Agroindustriais e Sustentabilidade. Editores LAPIDO LOUREIRO, F.E.; MELAHMED, R. e FIGUEIREDO NETO, J. 2009.

Nascimento, M. & Lapido-Loureiro, F.E. Fertilizantes e sustentabilidade: o potássio na agricultura brasileira, fontes e rotas alternativas**.** Rio de Janeiro:CETEM/MCT, 66 p. (Série Estudos e Documentos, 61)2004.

Nascimento, M.; Monte, M. B. M. & Loureiro, F. E. L. Agrominerais: Potássio. In:_____Rochas & Minerais Industriais: Usos e especificações. Ed: Luz, A. B. & LINS, F. A. 2 ed. Cap8. p. 175-203. CETEM/MCT. Rio de Janeiro, 2008.

Narloch, G. et al. Resposta da cultura do rabanete à inoculação de fungos solubilizadores de fosfato. Pesquisa Agropecuária Brasileira**.** Brasília, v. 37, n. 6, 841-845, 2002.

O´Donnell, K. Zygomycetes in culture. Departament of Botany. University of Georgia, vol:1 e 2, 1979.

Paris, F.; Bonnaud, P.; Ranger, J.; Lapeyrie, F. In vitro weathering of phlogopite by ectomycorrhizal fungi. Plant and Soil, 177 (2). 191-201, 1995(a).

Paris, F.; Bonnaud, P.; Ranger, J.; Robert, M. & Lapeyrie, F. Weathering of ammonium or calcium-saturated 2:1 phyllosilicates by ectomycorrhizal fungi in vitro. Soil Biol. Biochem. 10 (27). 1237-1244, 1995(b).

Pinheiro, C. de M. Rocha Potássica no Crescimento Inicial, Comportamento Fotossintético e Colonização Micorrízica de Duas Espécies Arbóreas. 79p. Dissertação de Mestrado - Mestre em Produção Vegetal, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus – BA (Brasil), 2009.

Piza, P. A. T.; França, S. C. A. & Bertolino, L. C. Verdete do Cedro de Abaeté (MG) como fonte alternativa para potássio. XVII Jornada de Iniciação Científica – CETEM, 2009.

Putzke, J. & Putzke, M. T. L. Os Reinos dos Fungos. Editora EDUNISC, Santa Cruz do Sul, 1998.

Raper, K. B. &Fennell, D. I. The Genus Aspergillus. The Willians & Wilkns Co., Baltimore, USA.. 686p. 1965.

Rehm, G.; Schmitt, M.; Potassium for crop production, Extension Service, University of Minnesota, 2002. Disponível em: <http://www.extension.umn.edu>, acesso em outubro de 2010.

Resende, A. V., Martins, E. S., Oliveira, C. G., Sena, M. C., Machado, C. T. T., Kinpara, D. I, Filho, E. C. O. Suprimento de potássio e pesquisa de uso de rochas "*in natura*" na agricultura brasileira. Espaço e Geografia, 19 (1), 19-42, 2006.

Reyes, I.; Baziramakenga, R.; Bernier, L. & Antoun, H. Solubilization of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV-induced mutants of Penicillium rugulosum. Soil Biology & Biochemistry 33: 1741-1747, 2001.

Rivalier E. and Seydel S., Nouveau procede de cultura sur lames gelosées appliqué a l' étude microscopique dês champignos deteignes.Ann.Parasitol; v.10, nº5, p. 444-452, 1986.

Santos, A. C.; Cavalcanti, M. A. Q. C.; Fernandes, M. J. S. Fungos isolados da rizosfera da cana-de-açúcar da zona da Mata de Pernambuco. Rev. Bras. Bot.12:23-29, 1989.

Sarquis, M. I. M. Seleção de linhagens fúngicas produtoras de L-asparaginase: efeito da fonte de nitrogênio na produção da enzima por Aspergillus tamarii IOC-186 e Aspergillus terreus IOC-217. Tese de Doutorado em Biologia Parasitária. Instituto Oswaldo Cruz, 126p. 2002.

Silva, D. S.; França, S. C. A. & Silva, A. A. S., Beneficiamento do flogopitito para uso como fertilizante de liberação lenta. XVI Jornada de Iniciação Cientifica, CETEM. 2008.

Silva, D. S.; França, S. C. A.; Silva, A. A. S., Estudo de Flogopitito da Bahia Como Fertilizante Alternativo de Potássio. XVII Jornada de Iniciação Cientifica, CETEM. 2009.

Silva, A. A. S. Caracterização de flogopitito da Bahia para uso como fertilizante alternativo de potássio. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 73 p. 2009.

Song, O.-R; Lee, S.-J.; Lee, Y.-S.; Lee, S.-C; Kim, K.-K. & Choi, Y.-L. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by Burkholderia cepacia DA23 isolate from cultivated soil. Brazilian Journal of Microbiology. 39:151-156. 2008.

Souchie, E. L.; Abboud, A. C. S. Solubilização de fosfato por microrganismos rizosféricos de genótipos de Guandu cultivados em diferentes classes de solo. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 28, n. 1, 11-18, jan./mar. 2007.

Souza-Motta, C. M.; Cavalcanti, M. A. Q.; Fernandes, M. J. S.; Lima, D. M. M.; Nascimento, J. P. & Laranjeira, D. Identification and characterization of filamentous fungi Isolated from the sunflwer (*Helianthus annus L.*) rhizosfhere according to their capacity to hydrolyse inulin. Brazilian Journal of Microbiology, 34: 273-280, 2003.

Trabulsi, L. R.Alterthum, F. Gompertz, O. F. Candeias, J. A. N. Microbiologia. 3ed. São Paulo, Atheneu, 1999.

Telhado, M.C.S.C.L. Avaliação da biodisponibilidade de contaminante orgânico em solo. 124p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Quimica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (Brasil), 2009.

Uroz, S.; Calvaruso, C.; Turpault, M.P.; Frey-Klett, P. Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. Trends in Microbiology. v.17 (8): 378-387, 2009.

Van Straaten, P. Agrogeology: The use of rocks for crops. Ed: Enviroquest Ltd. p. 440.Cambridge, ON, 2007.

Varelli, J.V.; Novais, R.H.; Melo, M.T.V. e Leal, E.D. Ardósias “Verdete” de Cedro do Abaeté na Produção de Termofosfato Potássico Fundido e sua Eficiência Agronômica *in* An. Acad. Bras. Ci. 65 (4):363 –375.1992.

Yuan, L.; Huang, J.; LI, X.; Christie, P. Biological mobilization of potassium from clay minerals by ectomycorrhizal fungi and eucalypt seedling roots. Plant and Soil 262: 351–361, 2004.