



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

GLALBER LUIZ DA ROCHA FERREIRA

SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO DO REJEITO DE MINÉRIO DE FERRO PELO
FUNGO *Aspergillus terreus*

Goiânia
2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
GERÊNCIA DE CURSOS E PROGRAMAS INTERDISCIPLINARES

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

[] Dissertação [**X**] Tese

2. Nome completo do autor

GLALBER LUIZ DA ROCHA FERREIRA

3. Título do trabalho

SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO DO REJEITO DE MINÉRIO DE FERRO PELO FUNGO
Aspergillus terreus

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento [**X**] SIM [] NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **GLALBER LUIZ DA ROCHA FERREIRA, Discente**, em 15/03/2021, às 17:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **José Daniel Gonçalves Vieira, Professor do Magistério Superior**, em 15/03/2021, às 17:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1928519** e o código CRC **F575AF15**.

GLALBER LUIZ DA ROCHA FERREIRA

SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO DO REJEITO DE MINÉRIO DE FERRO PELO
FUNGO *Aspergillus terreus*

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Ambientais da Universidade Federal de Goiás, como exigência para a obtenção do Título de Doutor em Ciência Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira

Goiânia

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Ferreira, Glalber Luiz da Rocha

Solubilização de fósforo do rejeito de minério de ferro pelo fungo *Aspergillus terreus* [manuscrito] / Glalber Luiz da Rocha Ferreira. - 2021.

cxxx, 130 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Pró-reitoria de Pós-graduação (PRPG), Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Goiânia, 2021.

Bibliografia. Apêndice.

Inclui siglas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Biossolubilização. 2. Fósforo. 3. *Aspergillus terreus*. 4. Rejeito de minério de ferro. 5. *Acutodesmus obliquus*. I. Vieira, José Daniel Gonçalves, orient. II. Título.

CDU 502/504



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

GERÊNCIA DE CURSOS E PROGRAMAS INTERDISCIPLINARES

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº **011** da sessão de Defesa de Tese de **GLALBER LUIZ DA ROCHA FERREIRA** que confere o título de Doutor(a) em **Ciências Ambientais**, na área de concentração em **Estrutura e Dinâmica Ambiental**.

Aos **dez dias do mês de março do ano de 2021**, a partir da(s) **9:00h**, por videoconferência, no Google Meet: <meet.google.com/dnw-zgiu-wgz>, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada **“SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO DO REJEITO DE MINÉRIO DE FERRO PELO FUNGO *Aspergillus terreus*”**. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor **José Daniel Gonçalves Vieira (IPTSP/UFG)**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora Doutora **Daniela de Melo e Silva (ICB/UFG)**, membro titular interno; Professora Doutora **Lilian Carla Carneiro (IPTSP/UFG)**, membro titular externo, Professor Doutor **Geraldo Sadoyama Leal (IPTSP/UFG)**, membro titular externo; Professora Doutora **Lara Stefania Netto de Oliveira Leão (IPTSP/UFG)**, membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do **trabalho**. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor **José Daniel Gonçalves Vieira (IPTSP/UFG)**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, ao(s) **dez dias do mês de março do ano de 2021**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **GLALBER LUIZ DA ROCHA FERREIRA, Discente**, em 08/03/2021, às 22:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **José Daniel Gonçalves Vieira, Professor do Magistério Superior**, em 10/03/2021, às 12:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lilian Carla Carneiro, Professor do Magistério Superior**, em 10/03/2021, às 12:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Lara Stefânia Netto De Oliveira Leão Vasconcelos, Professor**



do **Magistério Superior**, em 10/03/2021, às 12:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniela De Melo E Silva, Professor do Magistério Superior**, em 10/03/2021, às 12:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Geraldo Sadoyama Leal, Professor do Magistério Superior**, em 16/03/2021, às 18:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1872152** e o código CRC **FEE22902**.

DEDICATÓRIA

Faço essa dedicatória ao único que é digno de receber a honra, a glória, o louvor, a adoração e a majestade (Judas 1:25): Jesus Cristo, sendo o rei dos reis e Senhor dos senhores (Apocalipse 19:16), o Alfa e o ômega (Apocalipse 22:13), o autor e consumidor da fé (Hebreus 12:2). “porque Dele, por meio Dele e para Ele, são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente. Amém. (Romanos 11:36). E a minha rainha Aline Bandeira e princesas Luísa Bandeira e Beatriz Bandeira, respectivamente.

AGRADECIMENTOS

Sempre achei esta a pior parte da tese para escrever, talvez porque a vida não se coloca em análise regressão e não é pelo valor que descobrimos a significância das pessoas na nossa trajetória.

Primeiro de tudo, gostaria de agradecer a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

“és meu tudo, és meu senhor, és meu amigo, meu intercessor, meu braço forte, meu conselheiro maravilhoso, meu grande eu sou, eu não sou nada sem ti, eu não vivo sem ti, sem tua presença eu morro, como eu te amo, como eu te quero, sim eu me prostro aos seus pés, a minha vida eu te consagro, tudo que tenho é totalmente teu, tudo que sou é totalmente teu ...”

(Fernadinho)

A minha preciosa esposa por sua dedicação, companheirismo, intercessão e amor, você é meu grande exemplo de temor e amor a Deus. Te amo.

As minhas amadas filhas, Luísa Bandeira e Beatriz Bandeira, por participar ativamente de todos os momentos desse doutorado, até o fim. Acredito eu, já se sentindo parte de tudo, foi necessário muitas vezes dizer: “filhinha, agora não posso brincar, estou trabalhando neste momento”, ao brincar com as bonecas. Perdoe-me filhas por todos os momentos de ausência. O papai quer ser exemplo de perseverança e superação em sua vida e testemunho que todas as coisas nós podemos por meio Daquele que nos amou! Te amo.

Dedico também ao meu sublime orientador Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira pela oportunidade de tê-lo como amigo, orientador e por ser meu incentivador para realização do doutorado e por todo apoio e dedicação. Obrigado por confiar em mim, louvo a Deus pela sua vida.

RESUMO

Os processos extrativos, como exemplo do fósforo, são responsáveis por significativos impactos ambientais, e isso se deve pela geração de resíduos sólidos, como rejeitos de minério de ferro, rico em fósforo, que representam grande valor econômico e que com a implementação de processos extrativos de melhor eficiência, resulte num melhor aproveitamento de elementos importantes e específicos do montante extrativo. A biossolubilização, surge como uma tecnologia promissora e transformadora no campo do processo extrativo da mineração, fazendo o uso de micro-organismos na solubilização do fósforo ou mesmo na recuperação de solos, o qual é possível afirmar totalmente na aplicabilidade da recuperação por meio da solubilização do elemento fósforo por diferentes espécies de micro-organismos. Este estudo faz uso da biossolubilização do elemento fósforo a partir do rejeito de minério de ferro pelo *Aspergillus terreus*. De princípio foi realizado o isolamento de micro-organismo a partir do rejeito de minério de ferro com característica específica de solubilizar fósforo; em seguida, foi realizada a identificação do micro-organismo isolado, resultando na presença do *Aspergillus terreus*. As etapas de biossolubilização foram conduzidas a partir da verificação de solubilização de fósforo pelo *Aspergillus terreus* em fonte conhecida de fósforo, em meio contendo fosfato de cálcio, $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$, e posteriormente, em meio contendo o rejeito de minério de ferro. Almejando estudos biotecnológicos, foi verificado o perfil de ácidos graxos pelo *Aspergillus terreus* produzido nos meios de cultura NBRIP, de uso geral e 9K-glicose, como uma possível fonte na produção de biodiesel. E por fim, foi realizado o estudo de viabilidade celular da microalga *Acustodesmus obliquus*, visando conhecer a melhor condição de armazenamento, como por simples congelamento, resfriamento ou congelamento com aplicação de substâncias crioprotetoras. Os resultados deste estudo demonstraram serem bastante promissores, apresentando solubilidade de 90,93% de fósforo na amostra de $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$ como fonte de fósforo, e 87,77% de fósforo na amostra de rejeito de minério de ferro, representando também uma solubilidade de 0,19 mg e 0,22 mg de fósforo por grama de massa fúngica, respectivamente. Os resultados apresentados se devem a condições em ambas amostras de acidez no meio reacional, demonstrando uma diminuição no pH e na liberação de fosfatase ácida como função enzimática na solubilidade de fósforo. A velocidade média de solubilidade de fósforo no meio reacional foi de $1,76 \text{ mg.h}^{-1}$ e $1,70 \text{ mg.h}^{-1}$ em ambas as condições de biossolubilização, respectivamente. A biomassa fúngica revelou ótima composição de FAME, como possuir 35,89% a 29 °C e 34,89% a 36 °C de ácidos graxos saturados no meio NBRIP, como melhor meio de crescimento da biomassa. O *Aspergillus terreus* se mostrou ser bastante

qualificado na produção de biodiesel, sendo detectado 1,31% de ácidos graxos tri-insaturados (TUFA) e ausência de poli-insaturados (PUFA), conforme limites máximos estabelecidos pela norma europeia EN 1424, sendo 12% para TUFA e 1% para PUFA. Por último foi verificado que o *Acutodesmos obliquus* pode ser armazenado tanto por meio da refrigeração como pelo congelamento, sendo este por meio do uso de substâncias crioprotetoras, como o dimetilsufóxido (DMSO), o glicerol (Gli) e o polietilenoglicol (Poli). As informações trazidas neste trabalho revelam excelente eficiência na solubilização do componente fósforo presente no rejeito do minério de ferro pelo *Aspergillus terreus*, resultando numa possível aplicação na mineração, como uma alternativa para redução de custos de produção e condições sustentáveis do sistema de mineração, e assim, contribuindo na melhoria da qualidade do minério de ferro em no país, e uma provável finalidade do fósforo solubilizado, como na geração de produtos fosfatados.

Palavras-chave: biossolubilização, fósforo, *Aspergillus terreus*, rejeito do minério de ferro, e *Acutodesmus obliquus*.

ABSTRACT

Extractive processes, as an example of phosphorus, are responsible for significant environmental impacts, and this is due to the generation of solid waste, such as iron ore tailings, rich in phosphorus, which represent great economic value and which with the implementation of extractive processes better efficiency, results in a better use of important and specific elements of the extractive amount. Biosolubilization emerges as a promising and transformative technology in the field of mining extraction, making use of microorganisms in the solubilization of phosphorus or even in soil recovery, which is possible to affirm totally in the applicability of recovery through solubilization. phosphorus element by different species of microorganisms. This study makes use of the phosphorus element biosolubilization from iron ore tailings by *Aspergillus terreus*. In principle, microorganism was isolated from iron ore tailings with a specific characteristic of solubilizing phosphorus; then, the isolated microorganism was identified, resulting in the presence of *Aspergillus terreus*. The biosolubilization steps were carried out from the verification of phosphorus solubilization by *Aspergillus terreus* in a known source of phosphorus, in a medium containing calcium phosphate, $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$, and subsequently, in a medium containing the ore tailings. iron. Aiming at biotechnological studies, it was verified the fatty acid profile by *Aspergillus terreus* produced in NBRIP culture media, of general use and 9K-glucose, as a possible source in the production of biodiesel. Finally, the cell viability study of the microalgae *Acustodesmus obliquus* was carried out, aiming at knowing the best storage condition, such as by simple freezing, cooling or freezing with the application of cryoprotective substances. The results of this study proved to be very promising, with solubility of 90.93% phosphorus in the $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$ sample as a phosphorus source, and 87.77% phosphorus in the iron ore tailings sample, also representing a solubility of 0.19 mg and 0.22 mg of phosphorus per gram of fungal mass, respectively. The results presented are due to conditions in both acid samples in the reaction medium, demonstrating a decrease in pH and in the release of acid phosphatase as an enzymatic function in phosphorus solubility. The average rate of phosphorus solubility in the reaction medium was 1.76 mg.h^{-1} and 1.70 mg.h^{-1} in both biosolubilization conditions, respectively. The fungal biomass showed an excellent composition of FAME, such as having 35.89% at 29 °C and 34.89% at 36 °C of saturated fatty acids in the NBRIP medium, as the best biomass growth medium. *Aspergillus terreus* was shown to be highly qualified in the production of biodiesel, being detected 1.31% of tri-unsaturated fatty acids (TUFA) and absence of polyunsaturated (PUFA), according to maximum limits established by the European standard EN 1424, being 12 % for TUFA and 1%

for PUFA. Finally, it was found that *Acutodesmos obliquus* can be stored both by refrigeration and by freezing, this being through the use of cryoprotective substances, such as dimethylsulfoxide (DMSO), glycerol (Gly) and polyethylene glycol (Poly). The information brought in this work reveals excellent efficiency in the solubilization of the phosphorus component present in the iron ore tailings by *Aspergillus terreus*, resulting in a possible application in mining, as an alternative to reduce production costs and sustainable conditions of the mining system, and so, contributing to the improvement of the quality of iron ore in the country, and a probable purpose of solubilized phosphorus, as in the generation of phosphate products.

Keywords: biosolubilization, phosphorus, *Aspergillus terreus*, iron ore tailings, and *Acutodesmos obliquus*.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

ARTIGO 1: BIOSSOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO POR MICRO-ORGANISMOS

Tabela 1: Apresentação de bactérias, fungos, consórcio entre bactérias e consórcio entre bactérias e fungos na solubilização do elemento fósforo.....	39
---	----

CAPÍTULO 2

ARTIGO 2 – SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO POR FUNGO ISOLADO DE REJEITOS DE MINÉRIO DE FERRO

Tabela 1: Constituição elementar dos meios de enriquecimento e crescimento.....	55
Tabela 2: Evolução do potencial e verificação dos mecanismos de solubilização de fósforo pela estirpe fúngica.....	61

CAPÍTULO 3

ARTIGO 3: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO PELO *Aspergillus terreus*

Tabela 1: Evolução do potencial e verificação dos mecanismos de solubilização de fósforo pela estirpe fúngica.....	74
--	----

CAPÍTULO 4

ARTIGO 4: PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO *Aspergillus terreus*

Tabela 1: Constituição elementar dos meios de enriquecimento e crescimento.....	88
Tabela 2: Conteúdo do perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos nas amostras fúngicas.....	95

APÊNDICE 1

ARTIGO 5: ESTUDO DE VIABILIDADE CELULAR DO *Acutodesmus obliquus*

Tabela 1: Composição do meio BBM.....	107
Tabela 2: Percentual quantitativo de células não-viáveis por período de tempo em dias para cada tipo de armazenamento.....	108
Tabela 3: Verificação da velocidade de inviabilidade celular e das equações de velocidade de inviabilidade celular por tipo de armazenamento.....	111

APÊNDICE 2

ARTICLE 1: Phosphorus Biosolubilization by Micro-Organisms

Table 1: Presentation of bactéria, fungi, intercropping between bactéria and intercropping between bactéria and fungi in the solubilization of Chemical elemento phosphorus.....	118
--	-----

APÊNDICE 3

ARTICLE 2 – Solubilization of Phosphorus by Isolated Fungus of Iron ore Tailings

Table 1: Elementary constitution of means of enrichment and growth.....	127
Table 2: Evolution of the potential and verification of the mechanisms of phosphorus solubilization by the fungus strain.....	128

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

ARTIGO 1 – BIOSSOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO POR MICRO-ORGANISMOS

Figura 1: Representação gráfica de concentração de P_2O_5 em reservas do Brasil a partir das informações geradas do banco de dados do USGS.....35

Figura 2: Representação gráfica da produção de fosfato concentrado em minas do Brasil a partir das informações geradas do banco de dados do USGS.....35

CAPÍTULO 2

ARTIGO 2 – SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO POR FUNGO ISOLADO DE REJEITOS DE MINÉRIO DE FERRO

Figura 1: Evolução da biomassa fúngica em 168 horas nos meios NBRIP (A), uso geral (B), 9K-glicose (C), e 9K (D).....60

Figura 2: Representação gráfica dos ensaios físico-químicos para verificação do potencial de solubilização do fósforo.....63

CAPÍTULO 3

ARTIGO 3: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO PELO *Aspergillus terreus*

Figura 1: Representação gráfica dos ensaios físico-químicos para verificação do potencial de solubilização do fósforo.....75

Figura 2: Imagens das observações morfológicas externas do fungo por MEV, representando a solubilização do fósforo no minério de ferro: A, B e C no tempo zero; D, E e F no tempo de 72 h; e G, H e I no tempo de 168 h. Imagens com resolução do fungo de (A) x500 e 50 μm , (B) x1000 e 10 μm , (D) x3500 e 5 μm , e (D) x500 e 50 μm , (E) x1000 e 10 μm , (F) x2000 e 10 μm , (G) x500 e 50 μm , (H) x1000 e 10 μm , (I) x3500 e 5 μm77

Figura 3: Imagens das observações morfológicas internas do fungo por MET, representando a solubilização do fósforo no minério de ferro: A, B e C no tempo zero; D, E e F no tempo de 72 h; e G, H e I no tempo de 168 h. Imagens com resolução do fungo de (A) x1500 e 5 μm , (B) x1200 e 5 μm , (C) x1500 e 5 μm , e (D) x5000 e 1 μm , (E) x5000 e 1 μm , (F) x5000 e 1 μm , (G) x5000 e 1 μm , (H) x5000 e 1 μm , e (I) x5000 e 1 μm78

CAPÍTULO 4

ARTIGO 4: PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO *Aspergillus terreus*

Figura 1: Captura de imagens pelo MEV visando realizar observações morfológicas externas do fungo, do meio NBRIP do período de 168 horas. Imagens com resolução do fungo de (a) x2000 e 10 µm, (b) x1000 e 10 µm, (c) x500 e 50 µm, e (d) x250 e 100 µm.....	91
Figura 2: Captura de imagens pelo MET visando realizar observações morfológicas internas do fungo, do meio NBRIP do período de 168 horas. Imagens com resolução do fungo de x5000 e 1 µm.....	91
Figura 3: Perfil dos meios de cultivo (NBRIP, uso geral, 9K-glicose e 9K), submetido a três períodos de incubação (zero, 72 e 168 horas), sob temperatura de 29° C.....	93
Figura 4: Perfil dos meios de cultivo (NBRIP, uso geral e 9K-glicose), submetido a três períodos de incubação (zero, 72 e 168 horas), sob temperatura de 36° C.....	93

APÊNDICE 1

ARTIGO 5: ESTUDO DE VIABILIDADE CELULAR DA *Acutodesmus obliquus*

Figura 1: Representação da porcentagem de células viáveis em relação ao tempo.....	110
Figura 2: Representação da velocidade de inviabilidade celular do <i>A. obliquus</i> em relação ao tempo.....	112

APÊNDICE 2

ARTICLE 1 – Phosphorus Biosolubilization by Micro-Organisms

Figure 1: Graphical representation of the concentration of P_2O_5 in reserves in Brazil from the information generated from the USGS database (2020).....	117
Figure 2: Graphical representation of the production of concentrated Phosphorus in mines in Brazil from information generated from the USGS database (2020).....	117

APÊNDICE 3

ARTICLE 2 – Solubilization of Phosphorus by Isolated Fungus of Iron ore Tailings

Figure 1: Evolution of fungal biomass in 168 hours in NBRIP (A), general use (B), 9K-glucose (C), e 9K (D) media.....	126
Figure 2: Graphical representation of physical-chemical tests to verify the phosphorus solubilization potential.....	127

LISTA DE FÓRMULAS

CAPÍTULO 1

ARTIGO 5: ESTUDO DE VIABILIDADE CELULAR DA *Acutodesmus obliquus*

Equação 1: Contagem de células viáveis e não-viáveis.....105

Equação 2: Cálculo da porcentagem de células viáveis.....105

LISTA DE ABREVIATURAS

mg L⁻¹ - miligramas por litro

Ca₃(PO₄)₂ – fosfato de cálcio

µg mL⁻¹ – micrograma por mililitro

% - percentagem

mg P_i L⁻¹ – miligrama de fósforo inicial por litro

P – fósforo

PS – fosforossolubilizante

P₂O₅ – Pentóxido de fósforo

pH – potencial hidrogeniônico

Fe – ferro

Al – alumínio

H⁺ - íon hidrogênio

Ca²⁺ - íon cálcio

mg h⁻¹ – miligramas por hora

kg – quilograma

g 100 mL⁻¹ – grama por 100 mililitro

g – gramas

°C – graus centígrados

rpm – rotações por minuto

Ca₅(OH)(PO₄)₃ – fosfato de cálcio

PO₄³⁻ - fosfato

DP – desvio padrão

U L⁻¹ – unidades por litro

mg – miligramas

R² – coeficiente de correlação

Mg²⁺ - íon magnésio

Fe³⁺ - íon ferro

Al³⁺ - íon alumínio

min – minutos

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

SFA – ácidos graxos saturados

DT – Transesterificação direta

Σ – somatório

Σ SFA – somatório de ácidos graxos saturados

Σ MUFA – somatório de ácidos graxos monoinsaturados

Σ DUFA – somatório de ácidos graxos di-insaturados

Σ TUFA – somatório de ácidos graxos tri-insaturados

Σ UFA – somatório de ácidos graxos insaturados

DMSO – dimetilsulfóxido

Gli – glicerol

Poli - polietilenoglicol

g L^{-1} – gramas por litro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
REFERÊNCIAS.....	26
2. OBJETIVOS.....	30
2.1 OBJETIVO GERAL.....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
3. ESTRUTURA DA TESE.....	31
4. CAPÍTULOS.....	32
4.1 CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO.....	32
ARTIGO 1: BIOSSOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO POR MICRO-ORGANISMOS...32	
1. INTRODUÇÃO.....	34
2. FÓSFORO.....	37
3. BIOSSOLUBILIZAÇÃO.....	42
3.1 Bactérias.....	42
3.2 Fungos.....	43
3.3 Consórcio microbiano.....	43
3.3.1 Consórcio bacteriano.....	44
3.3.2 Consórcio entre bactéria e fungo.....	44
4. BIOSSOLUBILIZAÇÃO DO FÓSFORO.....	45
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
REFERÊNCIAS.....	47
4.2 CAPÍTULO 2.....	52
ARTIGO 2: SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO POR FUNGO ISOLADO DE MINÉRIO DE FERRO.....52	
1. INTRODUÇÃO.....	54
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	55
2.1 Meios de crescimento e enriquecimento.....	55
2.2 Crescimento e enriquecimento microbiano	57
2.3 Isolamento do micro-organismo	57
2.4 Extração de DNA fúngico.....	57
2.5 Amplificação e purificação do DNA	58

2.6 Sequenciamento do DNA.....	58
2.6. Solubilização de fósforo em meio enriquecido.....	58
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4. CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS	64
4.3 CAPÍTULO 3.....	67
ARTIGO 3: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO PELO <i>Aspergillus terreus</i>.....	67
1. INTRODUÇÃO.....	69
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	71
2.1 Material biológico.....	71
2.2 Biossolubilização de fósforo em meio contendo minério de ferro.....	71
2.3 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	72
2.4 Análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	72
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
4. CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS.....	79
4.4 CAPÍTULO 4.....	84
ARTIGO 4: PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO <i>Aspergillus terreus</i>.....	84
1. INTRODUÇÃO.....	86
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	87
2.1 Material biológico.....	87
2.2 Meios de crescimento.....	87
2.3 Produção da biomassa fúngica.....	87
2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	89
2.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	89
2.6 Transesterificação direta (DT).....	89
2.7 Composição de ácidos graxos.....	89
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	90
4. CONCLUSÃO.....	97
REFERÊNCIAS.....	97

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	100
6. APÊNDICES.....	102
6.1 APÊNDICE 1.....	102
ARTIGO 5: ESTUDO DE VIABILIDADE CELULAR DO <i>Acutodesmus obliquus</i>.....	102
1. INTRODUÇÃO.....	104
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	105
2.1 Preparo do meio BBM.....	105
2.2 Estudo da viabilidade celular da <i>Acutodesmus obliquus</i>	105
2.3 Cálculo da porcentagem de células não-viáveis.....	106
2.4 Velocidade da inabilidade celular.....	106
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	107
4. CONCLUSÕES.....	113
REFERÊNCIAS.....	114
6.2 APÊNDICE 2.....	116
ARTICLE 1: Phosphorus Biosolubilization by Micro-Organisms.....	116
Introduction.....	117
Match.....	118
Biosolubilization.....	120
Bacteria.....	120
Fungi.....	120
Microbial consortium.....	121
Bacterial consortium.....	121
Consortium between bactéria and fungus.....	121
Phosphorus biosolubilization.....	121
Final considerations.....	122
References.....	122
6.3 APÊNDICE 3.....	124
ARTICLE 2: Solubilization of Phosphorus by Isolated Fungus of Iron ore Tailings.....	124
Introduction.....	125
Experimental Part.....	126
Means of growth and enrichment.....	126

Microbial growth and enrichment.....	126
Isolation of the microorganism.....	126
Fungal DNA extraction.....	126
DNA amplification and purification.....	126
DNA sequencing.....	126
Phosphorus solubilization in synthetic médium.....	126
Results and Discussion.....	126
Conclusion.....	129
References.....	129

1 INTRODUÇÃO

A demanda na produção de minério de ferro tem sofrido significativa expansão, e isso se deve a enorme procura pelo seu principal produto gerado que é o aço, principalmente pelos países em desenvolvimento (De Moraes, De Lima e Ribeiro, 2018). Quase todo o minério de ferro (98%) é utilizado na fabricação de aço, descrevendo, dessa forma, a importância da composição química básica desse minério, por causa dos possíveis principais contaminantes, como o fósforo, interferindo no processo de beneficiamento do metal ferro (Löff e Ericsson, 2017).

O minério de ferro é designado como sendo de baixa ou alta qualidade, ou seja, de alto ou baixo teor de fósforo em sua composição, consecutivamente. O elemento fósforo é considerado o principal contaminante na indústria siderúrgica na produção do aço, causando de forma prejudicial no aumento da dureza, fragilidade e também na ductilidade do metal, no processo de produção do aço (Su et al., 2018).

A maioria das reservas mundiais de minério de ferro são consideradas de baixa qualidade, apresentando diversos contaminantes, entre eles tendo o fósforo como o principal, que é um elemento bastante nocivo ao aço. De fato, é expressiva a exigência cometida pelos mercados internacionais de comércio de ferro por minérios de baixo teor de fósforo, e isso, é devido aos efeitos prejudiciais ocasionados por este elemento sobre o aço e em outros materiais obtidos a partir do ferro (Tudu et al., 2017).

O minério de ferro, considerado pelos mercados internacionais de alta qualidade é aquele constituído com teor inferior a 0,07% de fósforo em sua composição, representando uma pequena parcela das reservas existentes no planeta. Além disso, o conteúdo de minério de ferro de alta qualidade no mundo, tido comercialmente o mais desejado, tem apresentado níveis altos de exaustão, o que tem despertado o dado momento a elaboração de novas tecnologias no processamento do minério de ferro de baixa qualidade (De Moraes e Ribeiro, 2018).

Diversas são as tecnologias aplicadas hoje no processo de desfosforação do minério de ferro na indústria siderúrgica, sendo elas: separação por magnetização de torrefação (Cao et al., 2018; Zhang et al., 2019), redução direta à base de carvão (Zhao et al., 2018), tratamento térmico (Zhang et al., 2018; Zhao et al., 2018), tratamento por micro-ondas (Cai et al., 2018; Kim et al., 2018), tratamento ultra-sônico (He et al., 2018), lixiviação ácida (Xiang et al., 2018; Cai et al., 2018), lixiviação alcalina (Guo et al., 2015; Zhang et al., 2019), aglomeração seletiva (Yang et al., 2018), e flotação (Tudu et al., 2017; Zhang et al., 2019).

Pensando em tecnologias ambientalmente saudáveis, promissoras e seguramente mais empreendedoras para a indústria de mineração, surgem os processos biológicos por meio da biorremediação. Diversas são as tecnologias de biorremediação com possível aplicação no processo de desfosforação do minério de ferro, almejando o desenvolvimento sustentável da indústria siderúrgica, sendo elas: bioestimulação (Wei et al., 2018; Yuan et al., 2017), bioaumentação (Wei et al., 2019; Tamburini et al., 2017), Landfarming ou Landtreatment (Kumar, Shahi e Singh, 2018; Tak, 2019), biopilhas (Singh et al., 2019; Uddin, Sagar e Jagdeeshwar, 2017), bioventilação (Amadi e Ukpaka, 2016), biorreatores (Xiao et al., 2018; Xiao et al., 2017), aeração in-situ (Yuan et al., 2020; Wang e Jiang, 2016).

A técnica de biolixiviação, ou também conhecida como biossolubilização, é uma técnica representante dentre os diferentes processos de biorremediação, é um processo concedido por tratamento biológico realizado por micro-organismos, o qual é procedida por reações metabólicas na geração de produtos como ácido mineral, ácidos orgânicos, polímeros e enzimas. Os subprodutos concebidos pelas reações metabólicas atacam o rejeito ou o resíduo, promovendo sua remoção, degradação, ou mesmo, sua solubilização (Chime et al., 2011; Jain et al., 2017; Tahir et al., 2018).

Com a evolução e contribuição da Biotecnologia Moderna foi possível conhecer as diversas e diferentes técnicas moleculares aplicadas na seleção e identificação de micro-organismos, principalmente aplicáveis nos processos de biorremediação (Wei et al., 2019). Este estudo tem como objetivo fazer uma breve revisão sobre a aplicabilidade da técnica de biossolubilização, por meio da solubilização do elemento fósforo por diferentes tipos de micro-organismos, como também fazer um estudo experimental quantitativo e qualitativo de um fungo isolado do rejeito de minério de ferro na solubilização de fósforo de uma fonte conhecida contendo fosfato de cálcio e noutra no próprio rejeito de minério de ferro.

REFERÊNCIAS

- Amadi, S.A.; Ukpaka, C.P. Examination of plant growth on improved soil environment polluted with crude oil bioremediation concept. *Applied Science Reports*, v. 16, n. 2, p. 71-81, 2016.
- Cai, X.; Qian, G.; Zhang, B.; Chen, Q.; Hu, C. Selective Liberation of High-Phosphorous Oolitic Hematite Assisted by Microwave Processing and Acid Leaching. *Minerals*, v. 6, n. 8, p. 1-13, 2018.

Cao, Y.; Zhang, Y.; Sun, T. Dephosphorization Behavior of High-Phosphorus Oolitic Hematite-Solid Waste Containing Carbon Briquettes during the Process of Direct Reduction-Magnetic Separation. *Metals*, v. 11, n. 8, p. 1-11, 2018.

Chime, T.O.; Menkiti, M.C.; Onukwuli, O.D. Biodesphosphorization of iron ore using *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *N Y Sci J*, v. 4, p. 1-6, 2011.

De Moraes, S.L.; De Lima, J.R.B.; Ribeiro, T.R. Iron ore pelletizing process: An overview. *Iron ores and iron oxide materials*. IntechOpen, chapter 3, p. 41-59, 2018.

De Moraes, S.L.; Ribeiro, T.R. Brazilian iron ore and production of pellets. *Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review*. p. 1-8, 2018.

Guo, L.; Gao, J.; Zhong, Y.; Gao, H.; Guo, Z. Phosphorus removal of high phosphorous oolitic iron ore with acid-leaching fluidized-reduction and melt-separation process. *ISIJ International*, v. 55, n. 9, p. 1806-1815, 2015.

He, C.C.; Hu, C.Y.; Lo, S.L. Integrating chloride addition and ultrasonic processing with electrocoagulation to remove passivation layers and enhance phosphate removal. *Sep Purif Technol*, v. 201, p. 148-155, 2018.

Jain, R.; Saxena, J.; Sharma, V. The ability of two fungi to dissolve hardly soluble phosphates in solution. *Mycol J*, v. 8, p. 104-110, 2017.

Kim, B.J.; Cho, K.H.; Lee, S.G.; Park, C.Y.; Choi, N.C.; Lee, S. Effective Gold Recovery from Near-Surface Oxide Zone Using Reductive Microwave Roasting and Magnetic Separation. *Metals*, v. 11, n. 8, p. 1-11, 2018.

Kumar, V.; Shahi, S.K.; Singh, S. Bioremediation: An eco-sustainable approach for restoration of contaminated sites. *Microbial Bioprospecting for Sustainable Development*, p. 115-136, 2018.

Löf, A.; Ericsson, M. Iron ore Market report 2017. *Engineering and Mining Journal*, v. 218, ed. 11, p. 32-37, 2017.

Singh, A.K.; Sisodia, A.; Sisodia, V.; Padhi, M. New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering. *Microbial Biotechnology in Agro-Environmental Sustainability*, p. 57-68, 2019.

Su, J.; Xiu, Y.F.; Huang, K.; Yu, J.T.; Alam, S.; Zhu, H.M.; Guo Z.C. Selective recovery of phosphorus from acid leach liquor of iron ore by garlic peel adsorbent. *RSC Advances* v. 8, p. 22276-22285, 2018.

Tahir, M.; Khalid, U.; Ijaz, M.; Shah, G.M.; Naeem, M.A.; Shahid, M.; Mahmood, K.; Ahmad, N.; Kareem, F. Combined application of bio-organic phosphate and phosphorus solubilizing bacteria (*Bacillus* strain MWT 14) improve the performance of bread wheat with low fertilizer input under an arid climate. *Braz J Microbiol*, v. 49S, p. 15-24, 2018.

Tak, I.R. Role of biotools in restoration of freshwater ecosystems. *Fresh Water Pollution Dynamics and Remediation*. P. 123-142, 2019.

Tamburini, E.; Sergi, S.; Serreli, L.; Bacchetta, G.; Milia, S.; Cappai, G; Carucci, A. Bioaugmentation-assisted phytostabilisation of abandoned mine sites in south west Sardinia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 98, p. 310-316, 2017.

Tudu, K.; Kumar, S.; Mandre, N. Enhanced recovery of low-grade iron ore by selective flocculation method. *J Disp Sci Technol* v. 39, p. 1075-1079, 2017.

Uddin, M.J.; Sagar, G.A.; Jagdeeshwar, J. Soil pollution and soil remediation techniques. *International Journal of Advance Research, Ideas and Innovations in Technology*, v. 3, n. 1, p. 582-593, 2017.

Wang, C.; Jiang, H.L. Chemicals used for in situ immobilization to reduce the internal phosphorus loading from lake sediments for eutrophication control. *Critical Reviews in Environmental Science and technology*, v. 46, n. 10, p. 947-997, 2016.

Wei, K.; Yin, H.; Peng, H.; Lu, G.; Dang, Z. Bioremediation of triphenyl phosphate in river water microcosms: Proteome alteration of *Brevibacillus brevis* and cytotoxicity assessments. *Science of The Total Environment*, v. 649, p. 563-570, 2019.

Wei, Y.; Zhao, Y.; Lu, Q.; Cao, Z.; Wei, Z. Organophosphorus-degrading bacterial community during composting from different sources and their roles in phosphorus transformation. *Bioresource Technology*, v. 264, p. 277-284, 2018.

Xiang, X.Y.; Xia, W.T.; Yuan, X.L.; Yin, J.G.; An, J. Removal of Phosphorus from High Phosphorus Iron Ores in Wushan Mountain by Crosscurrent Acid Leaching. *Solid State Phenomena*, v. 279, p. 222-229, 2018.

Xiao, C.; Wang, Q.; Feng, B.; Xu, G.; Chi, R. Biosolubilization of rock phosphates in a bioreactor using a microbial consortium from rhizospheric soils: An analysis of the microbial community and technical feasibility. *Mining, Metallurgy & Exploration*, v. 35, p. 184-191, 2018.

Xiao, C.; Wu, X.; Liu, T.; Xu, G.; Chi, R. Microbial community structure of activated aludge for biosolubilization of two different rock phosphates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 182, p. 742-754, 2017.

Yang, B.; Huang, P.; Shaoxian, S.; Luo, H.; Zhang, Y. Hydrophobic agglomeration of apatite fines induced by sodium oleate in aqueous solutions. *Results in Physics*, v. 9, p. 970-977, 2018.

Yuan, H.; Tai, Z.; Li, Q.; Liu, E. In-situ, high-resolution evidence from water-sediment interface for significant role of iron bound phosphorus in eutrophic lake. *Science of The Total Environment*, v. 706, p. 1-54, 2020.

Yuan, Z.; Yi, H.; Wang, T.; Zhang, Y.; Zhu, X.; Yao, J. Application of phosphate solubilizing bacteria in immobilization of Pb and Cd in soil. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, n. 27, p. 21877-21884, 2017.

Zhang, H.; Zhang, Z.; Luo, L.; Yu, H. Behavior of Fe and P during reduction magnetic roasting-separation of phosphorus-rich oolitic hematite. *Energy Sources, Part A: Recovery, utilization, and Environmental Effects*, v. 41, n. 1, p. 47-64, 2019.

Zhang, L.; Machiela, R.; Das, P.; Zhang, M.; Eisele, T. Dephosphorization of unroasted oolitic ores through alkaline leaching at low temperature. *Hidrometallurgy*, v. 184, p. 95-102, 2019.

Zhang, Y.; Xue, Q.; Wang, G.; Wang, J. The Effect of Temperature and Additive on Transport and Transformation of P of High-Phosphorus Iron Ore During Carbothermic Reduction. In: Hwang JY. et al. (eds) 9th International Symposium on High-Temperature Metallurgical Processing. TMS 2018. The Minerals, Metals & Materials Series, p. 855-868, 2018.

Zhao, Y.; Sun, T.; Zhao, H.; Li, X.; Wang, X. Effects of CaCO₃ as Additive on Coal-based Reduction of High-phosphorus Oolitic Hematite Ore. *ISIJ International*, v. 58, n. 10, p. 1768–1774, 2018.

Zhao, J.; Chen, Z.; Zuo, H.; Wang, J.; Xue, Q. Research on Reaction Mechanism of Vacuum Carbon Thermal Reduction and Dephosphorization in High Phosphate Iron Ore. *Metals*, v. 12, n. 8, p. 1-17, 2018.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Isolar micro-organismos solubilizadores de fosforo presentes em resíduos da mineração de ferro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar micro-organismo com capacidade de solubilizar fósforo;
- Determinar a solubilização de fósforo pelo *Aspergillus terreus*, isolado do rejeito de minério de ferro, em fonte conhecida de fósforo, o fosfato de cálcio, $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$.
- Determinar a solubilização de fósforo pelo *Aspergillus terreus*, em meio contendo o rejeito de minério de ferro;
- Verificação do perfil de crescimento e de ácidos graxos do *Aspergillus terreus* crescido em nos meios de cultura NBRIP, de uso geral e 9K-glicose;
- Realização de estudo de viabilidade celular da microalga *Acutodesmus obliquus*.

3. ESTRUTURA DA TESE

A tese apresenta-se subdividida em quatro capítulos organizados na forma de artigos científicos e está disposta da seguinte forma:

Capítulo 1: Artigo de revisão, referente a apresentação de diferentes estudos aplicáveis a biossolubilização de fósforo a partir de diferentes micro-organismos, como bactérias, fungos e consórcio de bactérias e consórcio de bactérias e fungos. A versão em inglês do artigo foi submetida em dezembro de 2020 na revista *Journal of Earth and Environmental Sciences Research*.

Capítulo 2. Isolamento de fungo do rejeito de minério de ferro, identificação do fungo *Aspergillus terreus* e prospecção na solubilização do fósforo em meio enriquecido e conhecido do componente elementar fósforo, $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$. A amostra de rejeito de minério de ferro foi obtida de uma mineradora da cidade de Catalão, Goiás, Brasil. A versão em inglês do artigo foi submetida em dezembro de 2020 na revista *Journal of Earth and Environmental Sciences Research*.

Capítulo 3. Uso do *Aspergillus terreus* como prospecção na solubilização do fósforo em meio contendo o rejeito de minério de ferro. A amostra de rejeito de minério de ferro foi obtida de uma mineradora da cidade de Catalão, Goiás, Brasil. Este artigo está em avaliação para possível submissão em revista.

Capítulo 4. Utilização da biomassa do *Aspergillus terreus* em análise de perfil de FAME, na verificação de produção de ácidos graxos saturado. Este artigo está em avaliação para possível submissão em revista.

Apêndice 1. Estudo de verificação de vida útil do *Acutodesmus obliquus*, em condições de refrigeração e congelamento, com o uso de agentes crioprotetoras como o dimetilsufóxido (DMSO), glicerol (GLI) e polietilenoglicol (POLI). Este artigo está em avaliação para possível submissão em revista.

4. CAPÍTULOS

4.1 CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO

ARTIGO 1

Título: Biossolubilização de fósforo por micro-organismos

Autores: Glalber Luiz da Rocha Ferreira^{1*}, Nelson Roberto Antoniosi Filho², José Daniel Gonçalves Vieira¹

¹Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Universidade Federal de Goiás. Cep 74605-050, Goiânia, GO, Brasil.

*e-mail: glalberocha@gmail.com

e-mail: jdgvieira62@gmail.com

² Instituto de Química, Laboratório de Métodos de Extração e Separação. Universidade Federal de Goiás – UFG. Goiânia, Goiás/Brasil. Campus Samambaia, CEP 74690-900.

e-mail: nlliantoniosi@gmail.com

Publicado na Revista: Journal of Earth and Environmental Sciences Research

Data de publicação: 28/11/2020

REVISÃO: BIOSSOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO POR MICRO-ORGANISMOS

RESUMO

O fósforo (P) é um dos macronutrientes essenciais para o crescimento e a reprodução das plantas, sendo a sua principal fonte as rochas fosfatadas (PRs). Diante do processo extrativo desse mineral, é caracterizado grandes impactos ambientais, com a geração de resíduos sólidos que representam grande valor econômico quando se utiliza técnicas apropriadas de aproveitamento dos minerais nos resíduos sólidos, representando um processo extrativo de melhor eficiência e aproveitamento do montante extraído. São muitas as técnicas possíveis aplicáveis para um melhor rendimento no processo extrativo, como exemplo, em destaque a biossolubilização, que faz uso de diferentes micro-organismos na solubilização do elemento fósforo. Neste artigo de revisão, será apresentado diferentes micro-organismos na solubilização de fósforo, como também o conhecimento das características químicas e biológicas dos micro-organismos no processo de biossolubilização.

Palavras-chave: biossolubilização, fósforo, micro-organismos, solubilização, rochas fosfatadas.

1 INTRODUÇÃO

Inevitavelmente os desafios da problemática ambiental permeiam todas as atividades relacionadas com os processos industriais. E por isso, é possível afirmar que a mineração, somada com a agricultura, a exploração florestal, a produção de energia, os transportes, a construção civil (urbanização, estradas, etc.) e as indústrias básicas (químicas e metalúrgicas) são consideradas as causadoras de quase todo o impacto ambiental existente na Terra (De Boer et al., 2019).

Em destaque, a atividade mineradora no Brasil, se afirma com grande destaque sócio-econômico para o país, contribuindo de forma decisiva para o bem estar e na melhoria da qualidade de vida das presentes e futuras gerações, o que é fundamental para o desenvolvimento de uma sociedade igualitária, que seja por meio da responsabilidade social, considerando sempre presentes os preceitos do desenvolvimento sustentável. É importante reconhecer e manter sob controle os impactos que esta atividade provoca no meio ambiente, e assim, proporcionando um meio ambiente adequado para as futuras gerações (Pena et al., 2017).

Segundo o Anuário Mineral do Brasil as principais substâncias extraídas no território brasileiro são: ferro; calcário, titânio, fosfato/rocha fosfática, alumínio (bauxita); ouro; estanho; cobre; zircônio; nióbio; caulim; manganês; níquel e zinco (DNPM, 2017). Dentre os minerais citados anteriormente, destaca-se a rocha fosfática, dados apresentados pela United States Geological Survey – USGS indicam que, em 2019, a produção mundial de rocha fosfática foi de 240 milhões de toneladas, sendo a China responsável pela metade da produção de 2019, em todo o mundo (USGC – 2020).

Conforme apresentado a USGS (2020), referente aos anos de 1996 até 2019, correspondendo a dados de 24 anos de processo extrativo da rocha fosfática, foram produzidos nas minas do Brasil 129.950.000 toneladas de fosfato concentrado na forma de pentóxido de fósforo (P_2O_5). Assim como demonstrado pela Figura 1, é possível observar uma progressão no aumento na produção de P_2O_5 em minas no Brasil, e assim, respondendo por um aumento significativo de 47,22% desde 1996 até 2019, o que é sugestivo a uma média de $5.414,6 \cdot 10^3$ toneladas de P_2O_5 produzido no Brasil. Já na Figura 2, é nítida a verificação de uma flutuação nos índices da capacidade de produção de P_2O_5 pelas reservas no Brasil, sendo muito expressiva a queda da capacidade produtiva de P_2O_5 a partir de 2016, alcançando uma queda de 48,48%, sendo este correspondente ao período de 1996 á 2019.

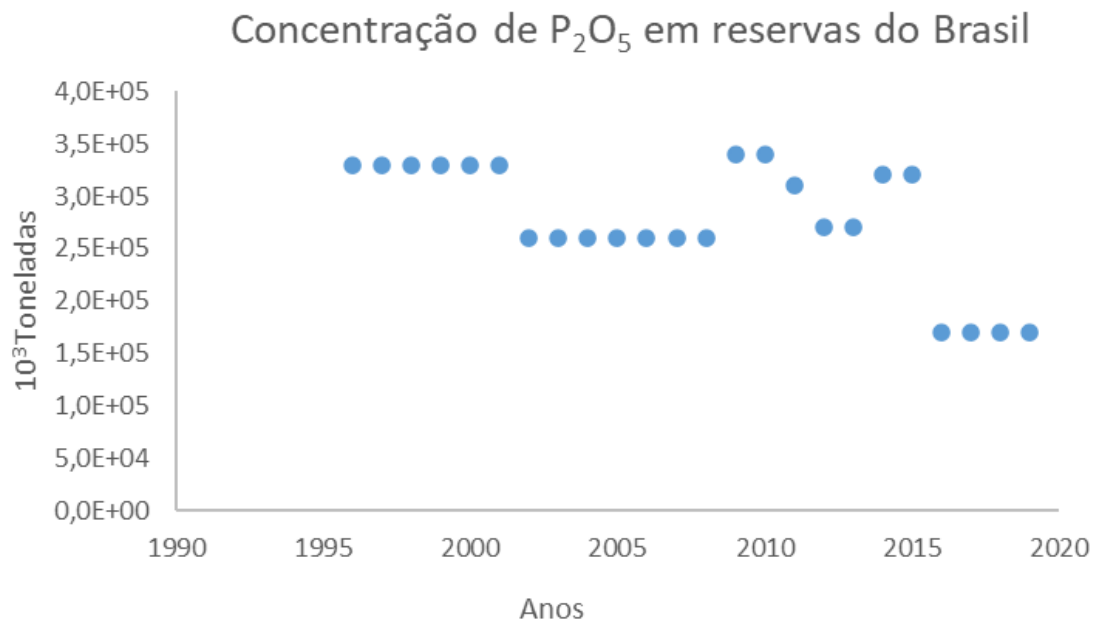


Figura 1: Representação gráfica da concentração de P_2O_5 em reservas do Brasil a partir das informações geradas do banco de dados do USGS (2020).

No Brasil, os maiores depósitos de fósforo (P) estão associados a complexos do tipo alcalino-carbonatíticos, de origem ígnea, e isso se deve a processos de alteração intempérica, como é verificado em Complexos de Salitre, em que apresentam baixo teor de P, quando comparados com depósitos de origem sedimentar, como fosforitos marinhos, e depósitos associados a complexos alcalinos, apresentando uma complexidade mineralógica acentuada (Uliana et al., 2009).

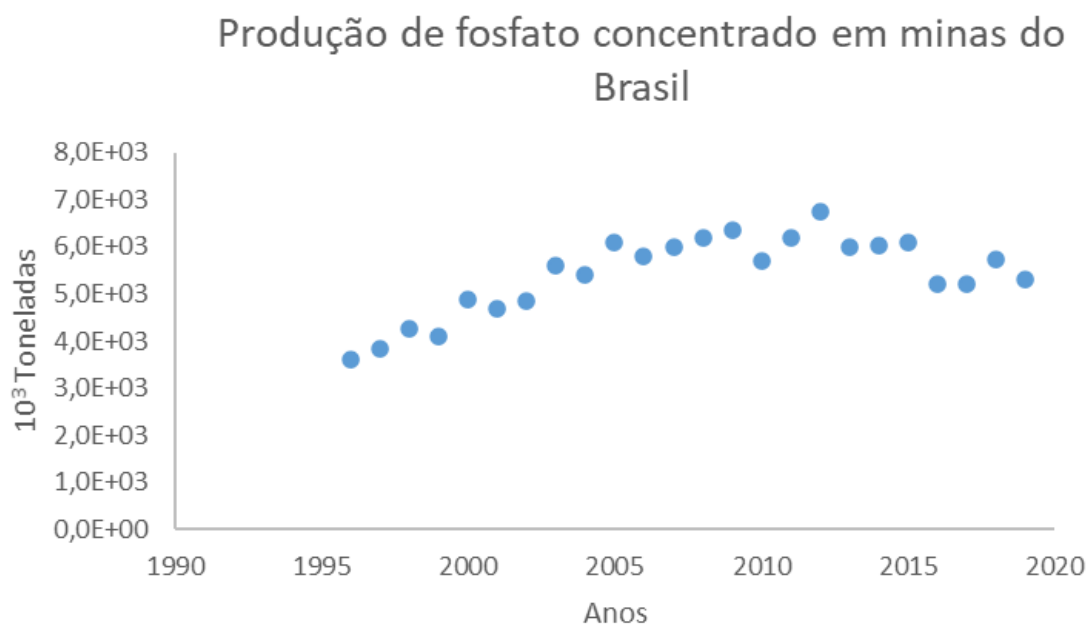


Figura 2: Representação gráfica da produção de fosfato concentrado em minas do Brasil a partir das informações geradas do banco de dados do USGS (2020).

Nas diversas atividades da mineração, grandes volumes e massas de materiais são extraídos e movimentados, causando grandes impactos ambientais, como na geração de resíduos sólidos, conhecidos como estéreis e rejeitos. Os estéreis são resíduos gerados pelas atividades de extração ou lavra, no decapeamento da mina, considerado como material sem valor econômico e ficam dispostos geralmente em pilhas. Já os rejeitos são resíduos resultantes dos processos de tratamento e beneficiamento das substâncias minerais (IBRAM, 2016).

Existe também outro tipo de resíduo, constituído por um conjunto bastante diverso de materiais, tal como a barragem de contenção de resíduos, provenientes da operação das plantas de extração e de beneficiamento das substâncias minerais. A quantidade de resíduos gerada é sempre muito grande e depende dentre outros fatores, do processo utilizado para extração do minério e da localização da jazida em relação à superfície (Mechi e Sanches, 2010). As substâncias minerais contidas nos resíduos sólidos apresentam potencialidade para o uso em outras atividades industriais ou na agricultura (Brigezu e Bleischwitz, 2017).

O P contido no fosfato não é considerado um elemento tóxico à saúde dos seres vivos, sendo, ao contrário, essencial à manutenção da vida. A presença deletéria do P no meio ambiente está relacionada com o aporte excessivo nas águas. Neste caso, o nutriente pode desencadear processos de eutrofização, ou fertilização, ocasionando, por exemplo, proliferação de algas e de outras plantas aquáticas superiores, as macrófitas (Arias et al., 2016). O aumento nos níveis de eutrofização pode acarretar a diminuição da quantidade e da qualidade da água e a perda da capacidade de sustentabilidade do sistema, com consequente aumento do nível de toxicidade e deterioração da saúde humana (Faustino et al., 2016).

Conforme análise das expectativas tecnológicas atuais, o setor de mineração não tem se destacado como um setor com grandes padrões de inovação, mesmo que faça uso de equipamentos de alta tecnologia, e por isso, a indústria da mineração não tem apresentado capacidade em alcançar a sua totalidade de aproveitamento dos elementos da natureza, e isso se deve a métodos falíveis do processo de mineração (Behera et al., 2014). Diante desta situação, faz necessário que as mineradoras façam frente na procura de novos desafios na busca de um comportamento inovador, visto as pressões de mercado, e assim, necessitando de novas tecnologias que sejam mais produtivas, com menores perdas no processo extrativo e produtivo e ao mesmo tempo sejam menos dispendiosas que as tecnologias atuais (Mendes et al., 2013).

À vista disso, diversas técnicas sendo elas físicas, químicas e biológicas, vêm sendo desenvolvidas para a solubilidade de elementos tóxicos e metais minerais. Portanto, a solubilidade do fósforo pode ser alcançada por vários processos físico-químicos, dentre eles, por métodos considerados convencionais, mais que resultam em muitas desvantagens, como

custo elevado, baixa remoção do metal e alta demanda de reagentes, e ainda podem ser ineficazes, especialmente quando se tratam de grandes volumes e baixas concentrações (Dal Magro et al., 2013; Farhan e Khandom, 2015).

Como solução para a própria problemática, é possível citar a técnica por biossolubilização como alternativa promissora, pois se trata de um processo de baixo custo, de elevada eficiência de remoção, passível de regeneração, alta seletividade frente a diferentes espécies metálicas, alta capacidade de recuperação do metal, além de mostrar-se menos agressivo ao meio ambiente (Ye et al., 2017). E como vantagem, a técnica por biossolubilização consiste na destoxificação do local, ou mesmo, na remoção de elementos contaminantes do solo por biomassas através de micro-organismos ativos, que possuam a capacidade de modificar ou decompor tais elementos tóxicos e metais minerais (Dotaniya et al., 2018).

Em destaque, a biossolubilização faz uso de diversos micro-organismos na sua função ativa, como bactérias, fungos, leveduras e cianobactérias, os quais apresentam mecanismos específicos subjacentes necessários à biossolubilização, sendo dependente de diversos fatores como a composição química da parede celular do bioissorvente, das condições físico-químicas do meio externo, e por fim, das propriedades químicas do metal (Ye et al., 2017).

2 FÓSFORO

O fósforo (P) é um elemento essencial a todos os organismos vivos, considerado um macronutriente essencial, estando presente em ácidos nucleicos, fosfolipídeos, lipopolissacarídeos, como também em vários solutos citoplasmáticos, assim como no metabolismo energético dos seres animados, como no ciclo do ATP-ADP, armazenamento, expressão de informação genética (DNA e RNA), e estrutura óssea, além de participar ativamente no processo de crescimento e sustentação corporal dos vegetais e animais. Comparando o fósforo com outros elementos químicos, o mesmo é considerado insubstituível (Shrivastava et al., 2018).

Considerando em termos mundiais, o P é encontrado contido nas rochas de depósitos de origens sedimentares, ígneas e biogénicas. Em termos de desenvolvimento e manutenção do crescimento das plantas, o P é disposto geralmente na forma de P_2O_5 , sendo o grande responsável na geração de energia para a produção vegetal (Roy, 2017). Dentre os minerais existentes, o fósforo é um dos recursos mais escassos do mundo, além de ser um dos principais como fator limitante para várias culturas em diferentes tipos de solos. O mineral fósforo na sua forma solúvel é considerado altamente reativo com os elementos cálcio, ferro, alumínio, e também as argilas, matéria orgânica e carbonatos, e assim, levando à formação de complexos com alta insolubilidade, ou seja, tornam-se indisponíveis para as plantas (Xiao et al., 2017).

A principal fonte de fósforo são as chamadas rochas fosfatadas (PRs), sendo este representando um termo impreciso, devido as rochas fosfatas serem disponibilizadas nas formas não processadas e concentradas, ou seja, na forma beneficiada, o que é considerada a principal fonte economicamente viável de fósforo, sendo expresso em P_2O_5 . No Brasil, sabe-se que 80% dos depósitos de fosfato são de origem ígnea com teor considerável de P_2O_5 , representando um percentual de cerca de 17% em termos mundiais. (Mazzili, 2016; Carmo et al., 2019).

O fósforo elementar não é encontrado disponível na natureza, mais combina-se espontaneamente e facilmente com o elemento químico oxigênio, formando o pentóxido de fósforo (P_2O_5), e que quando combinado com a água é formado o ácido fosfórico. O P_2O_5 , ocupa o décimo primeiro lugar na ordem de abundância de elementos nas rochas ígneas da crosta terrestre (Shrivastava et al., 2018).

No Brasil, a maior parte do solo é classificado como latossolos, que apresenta características de alta profundidade, altamente degradados, muito drenados e fortemente ácidos. Neste tipo de solo ocorre o domínio de óxidos, hidróxidos e oxi-hidróxidos dos elementos ferro (Fe) e alumínio (Al), que facilmente facilitam a adsorção com o fosfato, ocorrendo a formação de fosfatos de ferro e alumínio (Khan et al., 2010).

Micro-organismo	Gênero	Quantidade de P solubilizado	Eficiência (%)	Referência
Bactéria	<i>Pantoea. agglomerans</i> ZB	1247,78 mg L ⁻¹	24,95	Li et al., 2020
	<i>Enterobacter sakazakii</i>	1728,00 mg L ⁻¹	79,00	Mouradi et al., 2017
	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	1432,20 mg L ⁻¹	77,00	
	<i>Pseudomonas cepacia</i>	1272,10 mg L ⁻¹	60,00	
	<i>Bacillus megaterium</i>	2,757 mg L ⁻¹	55,14	Carmo et al., 2019
	<i>Bacillus licheniformis</i>	2,730 mg L ⁻¹	54,60	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1,395 mg L ⁻¹	27,90	
Fungos	<i>Aspergillus niger</i>	75,79 mg L ⁻¹	40,53	Xiao et al., 2011
	<i>Aspergillus japonicus</i>	66,18 mg L ⁻¹	35,39	
	<i>Aspergillus simplicissimum</i>	85,43 mg L ⁻¹	45,68	
	<i>Fusarium moniliforme</i>	11,54 mg L ⁻¹	3,59	Abdel-Ghany et al., 2019
	<i>Aspergillus chevalieri</i>	24,40 mg L ⁻¹	7,60	
	<i>Trichoderma harzianum</i>	28,40 mg L ⁻¹	8,85	
	<i>Trichoderma asperellum</i>	11,92 mg L ⁻¹	95,39	Kribel et al., 2019
Consórcio bacteriano	<i>Serratia liquefaciens</i>	TCP – Ca ₃ (PO ₄) ₂ – 715 µg mL ⁻¹ TRP – fosfato de rocha da Tunísia – 605 µg mL ⁻¹	TCP – 71,60 TRP – 92,42	Zineb et al., 2020
	<i>Pseudomonas spp</i>			
	<i>Pseudomonas koreensis</i>			
	<i>Pseudomonas corrugata</i>			
	<i>Bacillus safensis</i>			

	<i>Burkholderia spp</i>			
	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>			
	<i>Bacillus circulans</i>			
	<i>Bacillus</i>	299,0µg L ⁻¹	29,0	Emami et al., 2020
	<i>Pseudomonas</i>			
	<i>Staphylococcus</i>			
	<i>Paenibacillus</i>			
	<i>Stenotrophomonas</i>			
	<i>Sphingobacterium</i>			
	<i>Lysinibacillus</i>			
	<i>Advenella</i>			
	<i>Enterobacter</i>			
	<i>Variovorax</i>			
	<i>Plantibacter</i>			
Consórcio entre bactéria e fungo	<i>Rhodospirillales</i>	153,00 mg L ⁻¹	86,10	Xiao et al., 2017
	<i>Rizobiales</i>			
	<i>Esfingebacteriana</i>			
	<i>Esfinge</i>			
	<i>Lactobacillales</i>			
	<i>Burkholderiales</i>			

	<i>Rhodocyclales</i>			
	<i>Flavobacterianos</i>			
	<i>Caldilineales</i>			
	<i>Xanthomonadales</i>			
	<i>Bacillales</i>			
	<i>Nitrosomonadales</i>			
	<i>Rodobacterales</i>			
	<i>Planctomycetales</i>			
	<i>Clostridiales</i>			
	<i>Saccharomycetales</i>			
	<i>Hypocreales</i>			
	<i>Ofiostomatales</i>			
	<i>Bacillus sp</i>			
	<i>Aspergillus niger</i>			
		370 $\mu\text{g mL}^{-1}$	18,53	Saxena et al., 2015

Tabela 1: Apresentação de bactérias, fungos, consórcio entre bactérias e consórcio entre bactérias e fungos na solubilização do elemento químico fósforo.

3 BIOSSOLUBILIZAÇÃO

Muitos estudos mostram que os micro-organismos poderiam solubilizar elementos químicos considerados insolúveis, e convertê-los na forma solúvel, e dentre as técnicas citadas pelo processo de biorremediação, surge a técnica de bioassolubilização, podendo ser explorada por meio da biotecnologia ambiental na remoção de contaminantes de solos, sedimentos e resíduos industriais (Carmo et al., 2019).

Na busca por tecnologias ambientalmente saudáveis para a indústria de mineração, os processos biológicos como a bioassolubilização é encarada como sendo uma das soluções mais promissoras e certamente a mais revolucionária para resolução de diferentes tipos de problemas ambientais, principalmente aplicável em indústrias mineradoras (Zineb et al., 2020).

Considerando o processo de bioassolubilização, o mesmo é encarado como um tratamento biológico realizado por micro-organismos, que por meio de suas reações metabólicas, geram produtos químicos como ácido mineral, ácidos orgânicos, polímeros e enzimas. Estes subprodutos químicos atacam o rejeito contido no minério, promovendo a sua dissolução e produzindo sua remoção seletiva (Chime et al., 2013).

Vários são os micro-organismos que têm sido utilizados com considerável eficiência na solubilização de elementos químicos diversos, a título de exemplo as bactérias, os fungos, ou mesmo quando associados, como demonstrado pela Tabela 1, quando são expressados bactérias, fungos, consórcio de bactérias e consórcio de bactérias e fungos na solubilização do fósforo.

3.1 Bactérias

Sob condições de culturas otimizadas Li et al. (2020), realizou estudos de solubilização de fósforo a partir da bactéria *Pantoea. agglomerans* ZB, sendo a mesma obtida do solo rizosférico da Araucária que cresce na praia do rio Qingshan na capital Wuhan, província de Hubei na China, e assim, alcançando uma solubilização máxima de 1247,78 mg L⁻¹ de fósforo, o que corresponde a uma eficiência de 24,45% de bioassolubilização.

Segundo os estudos realizados por Mouradi et al. (2017), as cepas isoladas do depósito de fosfato El Halassa identificadas como *Enterobacter sakazakii*, *Pseudomonas pseudomallei* e *Pseudomonas cepacia*, apresentaram uma capacidade máxima de liberar o fosfato solúvel a partir do Ca₅(PO₄)₃(OH) nas concentrações de 1728 ± 0,5, 1432,2 ± 1

e $1272,1 \pm 0,5 \text{ mg P}_i \text{ L}^{-1}$ respectivamente, correspondendo aos valores de eficiência de 79%, 77% e 60% respectivamente na técnica aplicada de biossolubilização do fósforo.

Carmo et al. (2019), em seus estudos de biossolubilização de fósforo, procedeu seus testes de solubilização em um biorreator air lift a partir de rochas fosfatadas, sendo utilizado três cepas em separado, sendo o *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis* e *Pseudomonas fluorescens*, que responderam com uma biossolubilização de $2,757 \text{ mg L}^{-1}$, $2,730 \text{ mg L}^{-1}$ e $1,395 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente de fósforo, correspondendo a uma eficiência de 55,14%, 54,60% e 27,90% de solubilização de fósforo.

3.2 Fungos

Nos estudos desenvolvidos por Xiao et al. (2011), foram utilizadas três cepas fúngicas, sendo o *Penicillium simplicissimum*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus japonicus* e, que foram isolados do solo rizosférico do trigo, os quais as cepas demonstraram a capacidade de solubilização de fósforo da ordem de $85,43 \text{ mg L}^{-1}$, $75,79 \text{ mg L}^{-1}$ e $66,18 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, no sétimo dia de incubação, e assim, correspondendo a uma eficiência de 45,68%, 40,53% e 35,39% de solubilização do fósforo, respectivamente.

O *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus chevalieri* e *Trichoderma harzianum*, obtido no isolamento a partir do solo rizosférico cultivado com *Sorghum bicolor* L., são fungos que foram utilizados por Abdel-Ghany et al. (2019), visando a solubilização de fósforo inorgânico, obteve uma biossolubilização máxima de P de $11,54 \text{ mg L}^{-1}$, $24,40 \text{ mg L}^{-1}$ e $28,40 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, e significando nesta ordem numa eficiência de 3,59%, 7,60% e 8,85% na solubilização do fósforo.

Kribel et al. (2019), em seus estudos realizou o isolamento do fungo *Trichoderma* do solo com raízes em local adjacente as minas de fosfato de Marrocos, o qual testou qualitativamente in vitro quanto ao seu potencial para solubilizar o fósforo da rocha fosfática, sendo revelado positivo o desenvolvimento em meio Modificado Pikovskaya Agar (MPA), contendo o analito fósforo, sendo observado um bom crescimento radial superior a 79,8 mm no período de 6 dias, mesmo que não tenha apresentado a presença de nenhuma zona clara ao redor da colônia, que caracteriza-se como potencial solubilizador de fósforo. O fungo demonstrou a capacidade de solubilizar uma concentração máxima de $11,92 \text{ mg L}^{-1}$ de fósforo, referindo-se a uma eficiência de 95,39% de biossolubilização de P.

3.3 Consórcio microbiano

São muitos os tipos diferentes de micro-organismos solubilizadores de fósforo, como citado na Tabela 1, assim como as bactérias e os fungos, tornam o fósforo insolúvel

em solúvel, pela função chamada fosforossolubilizante (PS), que pode ser facilmente absorvido pelas plantas (Xiao et al., 2018). São poucos os estudos que relatam o uso do consórcio microbiano em estudos de biossolubilização, por isso, pouco se sabe sobre seus mecanismos de solubilização, ficando difícil realizar relatos comparativos para novos estudos (Prakash et al., 2017).

3.3.1 Consórcio bacteriano

Nos estudos desenvolvidos por Zineb et al. (2020), as bactérias *Serratia liquefaciens*, *Pseudomonas spp*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas corrugata*, *Bacillus safensis*, *Burkholderia spp*, *Pseudomonas frederiksbergensis* e *Bacillus circulans*, foram utilizadas em consórcio no processo de solubilização de fosfato em amostras de fosfato de cálcio (TCP), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, e fosfato de rocha da Tunísia (TRP), contendo 30% de P_2O_5 . Os resultados apresentados por Zineb, demonstram uma solubilização de $715 \mu\text{g mL}^{-1}$ de fósforo na amostra de TCP, e $605 \mu\text{g mL}^{-1}$ de fósforo na amostra de TRP, equivalendo a uma eficiência de 71,60% e 92,42%, respectivamente.

O consórcio bacteriano de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Sphingobacterium*, *Lysinibacillus*, *Advenella*, *Enterobacter*, *Variovorax* e *Plantibacter*, alvo de estudo de Emami et al. (2020), revelou a solubilização de $299 \mu\text{g mL}^{-1}$ de fósforo de amostras de solo de raiz e rizosfera de trigo (*Triticum aestivum* L.), indicando uma eficiência de 29% de solubilização do fósforo.

3.3.2 Consórcio entre bactéria e fungo

Xiao et al. (2017), em seu estudo fez uso de um consórcio microbiano obtido por meio do isolamento e posterior enriquecimento feito a partir do lodo ativado, coletado de uma estação municipal de tratamento de águas residuais em Edmonton, Canadá. Os pesquisadores utilizaram um consórcio microbiano composta por (Bactérias) Rhodospirillales (8,73%), Rizobiales (8,13%), Esfingebacteriana (7,57%), Esfinge (6,70%), Lactobacillales (5,30%), Burkholderiales (5,22%), Rhodocyclales (3,6%) 2%), Flavobacterianos (3,10%), Caldilineales (2,79%), Xanthomonadales (2,71%), Bacillales (1,96%), Nitrosomonadales (1,95%), Rodobacterales (1,95%), Planctomycetales (1,72%) e Clostridiales (1,56%), ao nível da ordem, e (Fungos) Saccharomycetales (39,46%), Hypocreales (0,51%) e Ofiostomatales (0,18%) ao nível da ordem. Os resultados obtidos pelo grupo de Xiao obtiveram uma solubilização de $153,00 \text{ mg L}^{-1}$ de fósforo, revelando uma eficiência da grandeza de 86,10%.

Os cientistas Saxena et al. (2015), trabalharam em seu estudo o consórcio bacteriano e fúngico, relatando o uso do *Bacillus sp* e *Aspergillus niger* na solubilização

do fósforo, em função do crescimento e promoção do grão-de-bico, o qual foi relatado um maior aumento no comprimento da disparada e da raiz de 43,73 e 13,96 cm na planta, respectivamente, sendo também observado uma solubilização máxima de fósforo pelo consórcio da ordem de $370 \mu\text{g mL}^{-1}$, correspondendo a eficiência de 18,53% de solubilização do elemento químico fósforo, após o segundo dia de incubação.

4 BIOSSOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO

A solubilização de compostos de fósforo (P) por micro-organismos, denominados de P-solubilizadores que são naturalmente abundantes nos solos, são eficazes na liberação de P inorgânico através da solubilização por funções orgânicas do micro-organismo, conduzido pela mineralização do fósforo insolúvel presente no solo e disponibilidade para a planta (Li et al., 2020). Sabe-se também que a biomassa microbiana do solo contém uma quantidade significativa de fósforo imobilizado, que se encontra potencialmente disponível para as plantas (Abdel-Ghany et al., 2019).

Entretanto, diversas são as teorias propostas que explicam os mecanismos de solubilização do P pelos micro-organismos, os quais são organizadas em três grupos, sendo o primeiro referente a teoria proposta por Cunningham e Kuyack (1992), baseada na função dos ácidos orgânicos; a segunda contempla a teoria do dissipador, defendida por Halvorson, Keynan e Kornberg (1990); e por fim a terceira contribuição por Illmer e Schinner (1992), que explicita sobre a teoria da acidificação e excreção de H^+ . Destes, a teoria do ácido orgânico é a que melhor explicita o mecanismo de solubilidade do fósforo e é a teoria mais aceita pela maioria da comunidade científica em todo o mundo (Xiao et al., 2011).

Na teoria do ácido orgânico, as fontes insolúveis de P são solubilizadas por bactérias e fungos P-solubilizadores promovendo o baixamento do pH, ou seja, aumentando a acidez do meio reacional. A diminuição do pH no meio reacional sugere a ocorrência da liberação de ácidos orgânicos pelos micro-organismos (Adhikari e Pandey 2019). Tais ácidos orgânicos podem dissolver de forma direta o mineral fósforo, este como resultado da troca aniônica do PO_4^{2-} por ânion ácido, ou mesmo, podendo quelar os íons Fe e Al associado ao P. Nesta síntese, ocorre a descarga de ácido orgânico pelas cepas microbianas se acidificando e ao ambiente circundante, que por fim, conduz na liberação de íons P do mineral P pela substituição do H^+ pelo Ca^{2+} (Behera et al., 2017). Dos diferentes ácidos orgânicos envolvidos na solubilização de P insolúveis, os mais proeminentes são liberados por cepas fúngicas, tais como: succínicos, cítricos, glifônicos, α -acetoglucônicos e ácidos oxálicos (Govarthanan et al., 2018).

Na teoria da dissipação proposta por Halvorson, keynan e Kornberg (1990), os micro-organismos P-solubilizadores assimilam o fósforo do meio líquido, ativando a dissolução indireta de compostos de fosfatos de cálcio por remoção consistente de fósforo do meio de cultura. A teoria da dissipação, geralmente, elucida a solubilização na forma de mineralização de compostos de P orgânicos nos quais o conteúdo de P na biomassa microbiana está consistentemente correlacionado com a decomposição de substratos orgânicos.

A capacidade das enzimas disponibilizadas pelos micro-organismos na realização de uma função desejada na rizosfera é um aspecto crucial para sua eficácia na nutrição vegetal. E tais enzimas tem um papel importante na liberação do fósforo por meio de compostos orgânicos no solo, como: i. as fosfatase inespecíficas de desfosforilação do organofosfato ou de ligações fosfoanidreto da matéria orgânica; ii. As fitases, responsáveis por causar especificamente a liberação de P do ácido fítico, e por fim iii. as fosfonatases e C-P liases, e este último causador da clivagem da ligação C-P dos organofosfonatos (Adhikari e Pandey, 2019).

Segundo Rodriguez et al. (2006), a depleção orgânica de fósforo pelo vegetal na rizosfera tem sido compensada pela absorção de fósforo pelas plantas, por meio da eficiência das fosfatases microbianas, que são liberadas fora da célula e participam da dissolução e mineralização de compostos orgânicos de fósforo. Entre as fosfatases, se destaca a fosfatase ácida, que é comumente encontrada em fungos, sendo detectada em vacúolos, vesículas e em outros órgãos intracelulares e extracelulares de fungos.

Uma outra aplicação também significativa das enzimas dissolvedoras de fósforo é a solubilização do fósforo orgânico presente no solo através da degradação do fitato, que é mediada pela ação da enzima fitase (Govarthanan et al., 2018). De acordo com Richardson et al. (2001), é relatado em seus estudos que a capacidade das plantas em obter fósforo diretamente do fitato é muito limitado, mas que quando o fitato é fornecido a planta é apresentado uma melhora significativa no crescimento e na nutrição das plantas, levando a um aumento na nutrição de fósforo a tal ponto que o crescimento e o teor de fósforo da planta eram equivalentes ao controle de plantas fornecidas com fósforo inorgânico.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo consistiu na apreciação de diferentes micro-organismos como, bactérias, fungos, consórcio de bactérias, e consórcio de bactérias com fungos, aplicáveis para a técnica de solubilização de fósforo, uma vez que o mesmo se encontra insolúvel no solo,

e assim, sendo solubilizado pelo processo de biossolubilização. Como também compreender as funções químicas e biológicas dos micro-organismos no processo de biossolubilização, para melhoramento da técnica, e almejando maiores rendimentos e eficiência no processo de biomineração do fósforo.

REFERÊNCIAS

1. Abdel-Ghany, TYM; Mohamed, ZH; Abboud, MAA; Helmy, EA; Al-Rajhi, AMH; Shater, ARM (2019) Solubilization of inorganic phosphate by rhizospheric fungi isolated from soil cultivated with *sorghum bicolor* L. Biorecursos, v. 14, n. 3, p. 5521-5532. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0312-8>
2. Adhikari, P; Pandey, A (2019) Phosphate solubilization potencial of endophytic fungi isolated from *Taxus wallichiana* Zucc. roots. Rhizosphere, v. 9, p. 2-9. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.11.002>
3. Arias, TL; Peralta, VF; Diana, DMF; Delgado, EG; Márquez, FSA; Martínez, MDB; Vera, MEL; Ayla, HI; Giménez, NB; Resquín, LMB; Bareiro, CGM (2016) Índices de calidad ambiental de aguas del Arroyo Caañabe mediante tests microbiológicos y ecotoxicológico. Revista Ambiente & Água, v. 11, n. 3, p. 548-565. <http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.1703>
4. Behera, BC; Singdevsachan, SK; Mishra, RR; Dutta, SK; Thatoi, HN (2014) Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—a review. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 3, p. 97–110. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.008>
5. Behera, BC; Yadav, H; Singh, SK; Mishra, RR; Sethi, BK; Dutta, SK; Thatoi, HN (2017) Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia sp.* isolated from mangrove soil Mahanadi river delta, Odisha, India. J. Genet. Eng. Biotechnol., v. 15, p. 169-178. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.01.003>
6. Bringezu, S; Bleischwitz, R (2017) Environment and Sustainability. In: Sustainable Resource Management. 1 st Edition. London: Routledge, 344p.
7. Carmo, TS; Moreira, FS; Cabral, BV; Dantas, RCC; Resende, MM; Cardoso, VL; Ribeiro, EJ (2019) Phosphorus recovery from phosphate rocks using phosphate-solubilizing bacteria. Geomicrobiology Journal, v. 36, p. 195-203. <https://doi.org/10.1080/01490451.2018.1534901>
8. Chime, TO (2013) Optimization of Process Variables for the Biodephosphorization of Iron ore using *Leptospirillum ferrooxidans*. International Journal of Multidisciplinary Sciences and Engineering, Nigeria, v. 4, n. 2, p. 57-64.

9. Cunningham, JE; Kuiack, C (1992) Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaji*. Appl Environ Microbiol. v.58, n. 5, p. 1451–1458.
10. Dal Magro, C; Deon, MC; Thomé, A; Piccin, JS; Colla, LM (2013) Biossorção passiva de cromo (VI) através da microalga *Spirulina platensis*. Química Nova, v. 36, n. 8, p. 1139-1145. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422013000800011>
11. De Boer, MA; Wolzk, L; Slootweg, JC (2018) Phosphorus: Reserves, Production, and Applications. In: Ohtake H., Tsuneda S. (eds) Recuperação e Reciclagem de Fósforo. Springer, Cingapura, cap. 5, p. 75-100. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8031-9_5
12. DNPM - Departamento Nacional de Produção Mineral. Anuário Mineral Brasileiro: Principais substâncias Metálicas. Ano base 2016, 43 p. 2017. http://www.anm.gov.br/dnpm/publicacoes/serie-estatisticas-e-economia-mineral/anuario-mineral/anuario-mineral-brasileiro/amb_metalicos2017
13. Dotaniya, ML; Panwar, NR; Meena, VD; Dotaniya, CK; Regar, KL; Manju Lata; Saha, JK (2018) Bioremediation of metal contaminated soil for sustainable crop production. In: Role of metal contaminated soil for sustainable crop production. Springer Nature Singapore Pte Ltda. cap. 6, p. 143-173. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8402-7_6
14. Emani, S; Aalikhani, HA; Pourbabae, AA; Etesami, H; Motasharezadeh, FS (2020) Consortium of endophyte and rhizosphere phosphate solubilizing bacteria improves phosphorous use efficiency in wheat cultivars in phosphorus deficient soils. Rhizosphere. v. 14, p. 1-31. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100196>
15. Farhan, SN; Khadom, AA (2015) Biosorption of heavy metals from aqueous solutions by *Saccharomyces Cerevisiae*. International Journal of Industrial Chemistry, v. 6, n. 2, p. 119-130. <https://doi.org/10.1007/s40090-015-0038-8>
16. Faustino, SB; Fontana, L; Bartozek, ECR; Bicudo, CEM; Bicudo, DC (2016) Composição e distribuição das diatomáceas de perfil sedimentar e sedimentos superficiais em reservatório de abastecimento no Sudeste do Brasil. Biota Neotropica, Campinas, v. 16, n. 2, p. 1-14. <https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2015-0129>
17. Govarthanan M, Mythili R, Selvankumar T, Kamala-Kannan S, Kim H (2018) Myco-phytoremediation of arsenic- and lead-contaminated soils by *Helianthus annuus* and wood rot fungi, *Trichoderma sp.* isolated from decayed wood. Ecotox Environ Safe, v. 151, p. 279-284. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.01.020>

18. Halvorson, HO; Keynan, A; Kornberg, HL (1990) Utilization of calcium phosphates for microbial growth at alkaline pH. *Soil Biol Biochem.* v. 22, n. 7, p. 887–890. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(90\)90125-J](https://doi.org/10.1016/0038-0717(90)90125-J)
19. IBRAM - Instituto Brasileiro de Mineração. Gestão e manejo de rejeitos da mineração. Brasília, 128 p. 2016. <http://www.ibram.org.br>
20. Illmer, PA; Schinner, F (1992) Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biol Biochem.* v. 24, n. 4, p. 389–395. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(92\)90199-8](https://doi.org/10.1016/0038-0717(92)90199-8)
21. Khan, MS; Zaidi, A; Ahemad, M; Oves, M; Wani, PA (2010) Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, v. 56, n. 1, p. 73-98. <https://doi.org/10.1080/03650340902806469>
22. Kribel, S; Qostal, S; Touhami, O; Selmaoui, K; Mouria, A; Benkirane, R; Achbani, EH; Douira, A (2019) Quantitative and qualitative estimation of moroccan *Trichoderma* isolates capacity to solubilize rock phosphate. *Acta Phytopathologia et Entomologica Hungarica*, v. 54, n. 2, p. 157-172. <https://doi.org/10.1556/038.54.2019.016>
23. Li, L; Chen, R; Zuo, Z; Lv, Z; Yang, Z; Mao, W; Liu, Y; Zhou, Y; Huang, J; Zibing (2020) Evaluation and improvement of phosphate solubilization by na isolated bacterium *Pantoea agglomerans* ZB. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 36, n. 27, p. 1-14. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2744-4>
24. Mazzilli, BP. IPEN. Mineração de fosfato e produção de ácido fosfórico. In: REIS, ROCIO G dos (Ed.). NORM: guia prático. Rio de Janeiro, RJ: Edição do Autor, 2016. cap. 5A-4, p. 89-98.
25. Mechi, A; Sanches, DL (2010) Impactos ambientais da mineração no Estado de São Paulo. *Estudos Avançados, São Paulo*, v. 24, n. 68, p. 209-220. <https://doi.org/10.1590/S0103-40142010000100016>
26. Mendes, GO; Dias, CS; Silva, IR; Junior, JIR; Pereira, OL; Costa, MD (2013) Fungal rock phosphate solubilization using sugarcane bagasse. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 29, p. 43–50. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1156-5>
27. Mouradi, M; Kadmiri, IM; Amehdar, L; Latrach, L; Hilali, A (2017) Assessing hydroxyapatite biosolubilization by bacterial strains isolated from EL Halassa Khouribga P deposit. *Moroccan Journal of Chemistry*, v. 5, n. 4, p. 697-707. <https://doi.org/10.48317/IMIST.PRSM/morjchem-v5i4.8572>

28. Nandimath, AP; Karad, DD; Gupta, SG; Kharat, AS (2017) Consortium inoculum of five thermo-tolerant phosphate solubilizing Actinomycetes for multipurpose biofertilizer preparation. *Iranian Journal of Microbiology*, v. 9, n. 5, p. 295-304.
29. Pena, JCC; Goulart, F; Fernandes, GW; Hoffmann, D; Leite, FSF.; Santos, NB; Soares-Filho, B; Sobral-Souza, T; Vancine, MH; Rodrigues, M (2017) Impacts of mining activities on the potential geographic distribution of eastern Brazil mountaintop endemic species. *Perspectives in Ecology and Conservation*, v. 15, p. 172-178. <https://doi.org/10.1016/j.pecon.2017.07.005>
30. Prakash, VJ; Kumar, JD; Saurabh, S; Ashok, K; Satya, P; Alfredo, CJ (2017) Consequence of phosphate solubilizing microbes in sustainable agriculture as efficient microbial consortium: A review. *Climate Change and Environmental Sustainability*, v. 5, n.1, p. 1-19.
31. Richardson, AE; Hadobas, PA; Hayes, JE; O'hara, CP; Simpson, RJ (2001) Utilization of phosphorus and pasture plants supplied with myo-inositol hexaphosphate is enhanced by the presence of soil microorganisms. *Plant and Soil*, v. 229, p. 47-56. <https://doi.org/10.1023/A:1004871704173>
32. Rodriguez, H; Fraga, R; Gonzalez, T; Bashan, Y (2006) Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil*. v. 287, p. 15–21. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9056-9>
33. Roy, ED (2017) Phosphorus recovery and recycling with ecological engineering: A review. *Ecological Engineering*, v. 98, p. 213-227. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.10.076>
34. Saxena, J; Saini, A; Ravi, I; Chandra, S; Garg, V (2015) Consortium of phosphate-solubilizing bacteria and fungi for promotion of growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum*). *Journal of CropImprovement*, v. 29, n. 3, p. 353-369. <https://doi.org/10.1080/15427528.2015.1027979>
35. Shrivastava, M; Srivastava, PC; D'souza, SF (2018) Phosphate-solubilizing microbes: diversity and phosphates solubilization mechanism. *Role of Rhizospheric Microbes in Soil*, chapter 5, p. 137-165. <https://doi.org/10.1080/15427528.2015.1027979>
36. Uliana, D; Kahn, H; Braz, AB (2009) Technological characterization of phosphate ore types from the Salitre Alkaline Complex, MG – Fosfertil Area. *Revista Escola de Minas*, n. 4, v. 62, p 511-516.
37. USGS - United States Geological Survey. National Minerals Information Center – Phosphate Rock Statistics Information. Annual Publications: Phosphate rock. Referente

from 1996 to 2019. <https://www.usgs.gov/centers/nmic/phosphate-rock-statistics-and-information>

38. Xiao, C; Chi, R; Li, X; Xia, M; Xia, Z (2011) Biosolubilization of rock phosphate by three stress-tolerant fungal strains. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 165, p. 719-727. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9290-3>

39. Xiao, C; Wang, Q; Feng, B; Xu, G; Chi, R (2018) Biosolubilization of rock phosphates in a bioreactor using a microbial consortium from rhizospheric soils: An analysis of the microbial community and technical feasibility. *Mining, Metallurgy & Exploration*, v. 35, p. 184-191. <https://doi.org/10.19150/mmp.8595>

40. Xiao, C; Wu, X; Liu, T; Xu, G; Chi, R (2017) Optimizations of particle size and pulp density for solubilization of rock phosphate by a microbial consortium from activated sludge. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, v. 47, n. 6, p. 562-569. <https://doi.org/10.1080/10826068.2016.1275008>

41. Ye, S; Zeng, G; Wu, H; Zhang, C; Dai, J; Ling, J; Yu, J; Ren, X; Yi, H; Cheng, M; Zhang, C (2017) Biological technologies for the remediation of co-contaminated soil. *Critical Reviews in Biotechnology*, n° 8, v. 37, p.1062-1076. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1304357>

42. Zineb, AB; Trabelsi, D; Ayachi, I; Barhoumi, F; Aroca, R; Mhamdi, R (2020) Inoculation with elite strains of phosphate-solubilizing bacteria enhances the effectiveness of fertilization with rock phosphates. *Geomicrobiology Journal*, v. 37, n. 1, p. 22-30. <https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1658826>

4.2 CAPÍTULO 2

ARTIGO 2

Título: Solubilização de fósforo por fungo isolado de rejeitos de minério de ferro.

Autores: Glalber Luiz da Rocha Ferreira^{1*}, Lilian Carla Carneiro¹, Geraldo Sadoyama², José Daniel Gonçalves Vieira¹

¹Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Universidade Federal de Goiás. Cep 74605-050, Goiânia, GO, Brasil.

*e-mail: glalberocha@gmail.com

e-mail: jdgvieira62@gmail.com

e-mail: carlacarneirililian@gmail.com

² Departamento de Ciências Biológicas CAC - UFG. Universidade Federal de Goiás. Cep 75704-020, Catalão, GO, Brasil.

e-mail: sadoyama@ufg.br

Publicado na Revista: Journal of Earth and Environmental Sciences Research

Data de publicação: 03/12/2020

SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO POR FUNGO ISOLADO DE REJEITOS DE MINÉRIO DE FERRO

RESUMO

Diante das grandes expectativas tecnológicas no setor de mineração na atualidade, é averiguada uma incapacidade das mineradoras de se alcançar a sua totalidade no aproveitamento de minerais presentes na natureza, e isso é ocasionado primordialmente pela utilização de métodos considerados falíveis no processo de mineração. Frente a tal condição se faz necessário o desenvolvimento de novas tecnologias com comportamento inovador, buscando formas mais produtivas. Dentre as tecnologias já existentes, é proposto um estudo com visão tecnológica e promissora, que trata do processo de biossolubilização de fósforo de uma fonte conhecida de fósforo tida como insolúvel por um fungo isolado do rejeito de minério de ferro. Os ensaios genéticos revelaram que o micro-organismo pertence ao gênero *Aspergillus*, ou seja, da espécie *Aspergillus terreus*. Os ensaios analíticos propostos neste estudo apontaram para uma solubilização de 90,93 % do fósforo pela biomassa fúngica, que corresponde a 296,56 mg L⁻¹ de fósforo solúvel, ocorrendo num período de 168 horas de processo, respondendo por uma solubilização média de 1,76 mg h⁻¹. O processo de biossolubilização demonstrou ser uma ótima alternativa tecnológica na redução de custos de produção e no estabelecimento da sustentabilidade do sistema de extração mineral, sendo uma alternativa viável na purificação e na agregação de valor ao minério de ferro, e também na obtenção de outro composto constituído de fósforo, gerando uma nova fonte econômica, como exemplo na produção de fertilizantes.

Palavras-chave: biossolubilização, solubilização, fungo, fósforo, *Aspergillus terreus*.

1 INTRODUÇÃO

O minério de ferro é considerado a principal matéria-prima na indústria siderúrgica, atuando diretamente na fabricação e transformação do ferro gusa e aço (Yamamoto e Nakamoto, 2018; Nakajima et al., 2019). O Brasil, como também a Austrália Ocidental, a África do Sul e o centro-sul da China, são destacados por possuírem uma enorme quantidade de recursos de ferro, mais com alto teor de fósforo, em muitas áreas de produção de minério de ferro (Su et al., 2018). O minério de ferro é designado geralmente como tendo alto ou baixo grau com base no seu teor de ferro, sendo que os minérios de alta qualidade, os quais são encontrados com teor de fósforo inferior a 0,07% de fósforo, são considerados comercialmente os mais desejados, e por isso estão se esgotando muito rapidamente, restando no futuro a exploração e beneficiamento de minérios de ferro de baixo teor (Tudu et al., 2017; Ofoegbu, 2019).

Como não se sabe exatamente como o fósforo é encontrado no minério de ferro, é deduzido que o fósforo esteja presente no minério na forma de fosfato, adsorvido na superfície da partícula ou ocluído nos microporos. Uma outra possibilidade também sugerida é que o fósforo esteja dentro da estrutura dos oxihidróxidos ou como um mineral fosfato. No Brasil, wavellite, $\text{Al}_3(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_3 \cdot 5(\text{H}_2\text{O})$; a senegalite, $\text{Al}_3(\text{PO}_4)(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})$; a turquesa, $\text{CuAl}_6(\text{PO}_4)_4(\text{OH})_8 \cdot 0,5(\text{H}_2\text{O})$, são os principais fosfatos encontrados no minério de ferro (Pereira e Papini, 2015).

No processo siderúrgico do minério de ferro, o fósforo é destacado como sendo um elemento prejudicial no processo de produção do aço, e assim, danificando de forma significativa a qualidade dos produtos siderúrgicos, como no aumento da dureza, da fragilidade e consecutivamente da ductilidade (Su et al., 2018). Em outros segmentos industriais, o fósforo é visto como um elemento essencial, como na produção de fertilizantes, automóveis, eletrônicos, medicamentos, células de combustível e alimentos processados (Yamamoto e Nakamoto, 2018).

Para que tenhamos a contínua disponibilidade do minério de ferro é essencial o desenvolvimento de novos sistemas e métodos, para a exploração do minério de ferro de baixa qualidade, que se encontram inutilizáveis e inexplorados, e assim, contribuindo no futuro com a suplementação das reservas que se encontram cada dia menores em minério de ferro de alto teor (Taylor et al., 1988).

A desfosforação do minério de ferro é um importante desafio para o desenvolvimento sustentável da indústria siderúrgica, e por isso, esforços têm sido intensificados na busca de novas tecnologias de remoção de fósforo do minério de ferro

a níveis aceitáveis (Tudu et al., 2018). Diversos são os processos empregados na remoção de fósforo de minérios de ferro, incluindo a separação por magnetização de torrefação (Cao et al., 2018; Zhang et al., 2019), redução direta à base de carvão (Zhao et al., 2018), tratamento térmico (Zhang et al., 2018; Zhao et al., 2018), tratamento por micro-ondas (Cai et al., 2018; Kim et al., 2018), tratamento ultra-sônico (He et al., 2018), lixiviação ácida (Xiang et al., 2018; Cai et al., 2018), lixiviação alcalina (Guo et al., 2015; Zhang et al., 2019), aglomeração seletiva (Yang et al., 2018), e flotação (Tudu et al., 2018; Zhang et al., 2019).

Considerando o processo de biossolubilização, o mesmo é encarado como um tratamento biológico realizado por micro-organismos, que por meio de suas reações metabólicas, geram produtos químicos como ácido mineral, ácidos orgânicos, polímeros e enzimas. Estes subprodutos químicos atacam o rejeito contido no minério, promovendo a sua dissolução e produzindo sua remoção seletiva (Chime et al., 2011). Vários são os micro-organismos que têm sido utilizados com considerável eficiência na solubilização de fosfato, a título de exemplo as bactérias (Tahir et al., 2018; Paul e Sinha, 2016; Liu et al., 2015; Solanki et al., 2018; Ghosh et al., 2016; Wei et al., 2018) e os fungos (Mendes et al., 2014; Xiao et al., 2015; Li et al., 2015; Li et al., 2016; Jain et al., 2017).

Como regra geral, os micro-organismos edáficos que se encontram agregados ao minério, reagem com melhor eficiência, e isso se deve a uma melhor adaptação e menores distorções ecológicas do meio. Por esse motivo, este estudo fará uso de um fungo filamentoso, extraído do minério de ferro bruto, almejando desfosforar o minério de ferro e biossolubilizar o fósforo em meio líquido, e assim, contribuindo na viabilização de novos estudos biotecnológicos.

2 PARTE EXPERIMENTAL

A amostra de rejeito de minério de ferro obtida foi proveniente de uma mineradora, localizada na cidade de Catalão, Goiás. Sendo separada aproximadamente uma porção de 10 kg do resíduo gerado sob o solo da mineradora para posterior isolamento de material biológico e realização de estudos de solubilização de fósforo.

2.1 Meios de crescimento e enriquecimento

O micro-organismo foi obtido a partir da inoculação da amostra de rejeito de minério de ferro em quatro diferentes meios de enriquecimento, no qual são os seguintes meios: NBRIP, 9K – Glicose, 9K e de uso geral, conforme representado na Tabela 1. Todos os meios foram dissolvidos em água destilada, e esterilizados a 121 °C por 20 minutos.

Tabela 1: Constituição elementar dos meios de enriquecimento e crescimento.

Meios de Crescimento	Concentração em g 100 mL ⁻¹									pH	Referência
	Glicose	MgCl ₂ .6H ₂ O	MgSO ₄ .7H ₂ O	(NH ₄) ₂ SO ₄	Ca(NO ₃) ₂	FeSO ₄ .7H ₂ O	KCl	NaCl	NH ₄ Cl		
NBRIP	1,0	0,5	0,025	0,01	-	-	0,02	-	-	7,0 ± 0,2	Nautiyal, 1999.
9K – Glicose	1,0	-	0,05	0,3	0,0013	0,001	0,01	-	-	4,5 ± 0,2	Silverman e Lundgren, 1959.
9K	-	-	0,05	0,3	0,0013	0,001	0,01	-	-	4,5 ± 0,2	Silverman e Lundgren, 1959.
Uso Geral	1,0	-	0,1	-	-	-	-	0,1	0,5	7,2 ± 0,2	Verma et al., 2001.

2.2 Crescimento e enriquecimento microbiano

Para a obtenção do micro-organismo a partir da amostra de minério de ferro, procedeu-se pela inoculação de 5 g da amostra de rejeito de minério de ferro nos quatro meios de cultivo, conforme apresentado na Tabela 1, em frascos de Erlenmeyers contendo 50 mL do meio. A incubação ocorreu por um período de sete dias em incubadora nas condições de 30 ± 2 °C e 130 rpm. Após a incubação, repetiu-se a inoculação removendo uma alíquota de 1 mL de cada meio para os mesmos quatro novos meios em Erlenmeyers apresentados na Tabela 1, contendo 5 g de amostra de minério de ferro e esterilizados a 121 °C por 20 minutos. Conduziu-os novamente para a incubadora sob as mesmas condições descritas acima. Repetiu-se por mais duas vezes o mesmo procedimento, completando três etapas de enriquecimento.

2.3 Isolamento do micro-organismo

Os micro-organismos pertencentes a terceira etapa de enriquecimento foram transferidos por meio da inoculação de 100 µL do meio de enriquecimento em placas de Petri contendo os quatro meios de cultivo representados na Tabela 1, acrescidos de 1,7 % de ágar-ágar e 0,5 % de fosfato de cálcio, $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$, como fonte de fósforo, esterilizado a 120 °C por 20 minutos, e incubados a 30 ± 2 °C, por 10 dias. O micro-organismo considerado predominante, morfológicamente distinto e solubilizador de fósforo, demonstrando neste último a formação de halo claro nas bordas, foi selecionado e purificado em placas de Petri com meio contendo 1,7 % de ágar-ágar e 0,5 % de fosfato de cálcio, $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$, e incubado a 30 ± 2 °C, por 7 dias. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes, completando-se três etapas de isolamento do micro-organismo. Após a incubação, o isolado foi preservado através do cultivo em placas de Petri com meio PDA, sendo incubado a 30 ± 2 °C, por 7 dias, e mantido refrigerado a 4 °C até sua próxima utilização.

2.4 Extração de DNA fúngico

A extração de DNA foi testada utilizando o micélio como material biológico. Foi inoculado um pequeno fragmento do micélio fúngico, cultivado em meio PDA, em tubo de ensaio contendo 10 mL de Caldo Extrato de Malte (MEB), que é constituído de: 2% de extrato de malte, 2% de glicose e 1% de peptona. O MEB inoculado foi incubado durante 72 horas a 30°C, no escuro e agitação de 130 rpm. O micélio foi recolhido por filtração a vácuo em filtro de celulose estéril e em seguida lavado duas vezes com 10 mL de NaCl 0,85%. O micélio foi coletado e utilizado para extração de DNA.

A extração de DNA foi procedida com a utilização da solução Tampão de Lise SDS, conforme descrito em Rodrigues et al. (2017). O extrato de DNA foi ressuspensionado em 100 µL de água ultra pura e armazenado a -20°C.

2.5 Amplificação e purificação do DNA

O DNA extraído foi usado para amplificação por PCR na região ITS1-18S-ITS2, a partir da utilização dos primers ITS1 (5'-GAACCGGCGGARGGATCA-3') e ITS2 (3'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-5') (Schmidt et al., 2013; White et al., 1990). As amplificações foram realizadas em um volume total de 20 µL contendo 50 ng de DNA extraído, 4 µL de HOT MOLPol Blend Master Mix (Molegene, Germany), e 0,5 µM de cada um dos primers (F) forward e (R) reverse. A amplificação foi conduzida em termociclador programado para uma desnaturação inicial de 15 min a 95 °C, seguidos por 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 55°C e 30 s a 72 °C. O anelamento foi realizado com temperatura de 52 °C por 30 s em triplicata. O alongamento final foi feito a 72 °C por 5 min. A purificação foi feita por meio da utilização de esferas magnéticas Agencourt AMPure XP SPRI. Os produtos da PCR foram normalizados após quantificá-los com um fluorômetro Qubit 2.0 (Invitrogen), com o kit de ensaio Qubit dsDNA HS (Invitrogen).

2.6 Sequenciamento do DNA

Os fragmentos de DNA amplificados foram sequenciados utilizando o equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA), utilizando juntamente o Kit V2, com 300 ciclos e sequenciamento *single-end*. As sequências foram analisadas por meio do *pipeline* Sentinel. No *pipeline* Sentinel os arquivos fastq foram avaliados quanto a qualidade Phred (QP) usando o programa FastQC v.0.11.8 (ANDREWS, 2010). A seguir, os arquivos fastq foram submetidos à trimagem de primers e sequências com baixa qualidade (QP<20). O software proprietário utilizado para tal finalidade foi construído em Python v.3.6, sendo este inspirado nas funcionalidades do projeto BioPython (COCK et al. 2009). Foi utilizado a ferramenta software BLAST, disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, para comparação das semelhanças da sequência de ácidos nucleotídicos com as sequências da região ITS1-18S-ITS2 de espécies fúngicas depositadas no GenBank.

2.7 Solubilização de fósforo em meio sintético

Para o processo de biossolubilização foi utilizado o fosfato de cálcio, $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$, como fonte conhecida de fósforo. À vista disso, foram preparados vinte e dois frascos de Erlenmeyers contendo 1,7631 g de $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$, em 100 mL de solução no meio NBRIP, correspondendo a 1000 mg L⁻¹ de fosfato ou 326,3 mg L⁻¹ de

fósforo, com pH $7,0 \pm 0,2$ esterilizados a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos. Em seguida foram inoculados em cada frasco de Erlenmeyer 3 fragmentos de 4 mm do inóculo cultivado em placas de Petri, e incubados a $30 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 130 rpm por 7 dias. Foi retirado um frasco de Erlenmeyer no dia, correspondendo ao tempo zero, e três frascos de Erlenmeyers em períodos de 24 horas. Após o período de incubação, foram coletadas amostras de cada frasco de Erlenmeyer, avaliando quanto ao conteúdo de fósforo solúvel, com a utilização do Spectro kit (Alfakit); a atividade de fosfatase ácida, a partir da utilização do kit comercial (Labtest[®]); a produção de biomassa pela medição de conteúdo de massa seca (IAL, 2008); e ao potencial hidrogeniônico (IAL, 2008).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O micro-organismo isolado da amostra de rejeito de minério de ferro, e crescido em meio enriquecido com fonte conhecida de fósforo, $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$, considerado predominante em meio sólido, morfologicamente distinto e solubilizador de fósforo, sendo neste último formador de halo claro nas bordas da colônia, demonstrou ser quanto a análise genética um fungo.

Por meio do sequenciamento genético foi obtida uma sequência nucleotídica (TTACCGAGTGCGGGTCTTTATGGCCCAACCTCCCACCCGTGACTATTGTACC TTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCAGCGTTGCTGGCCGCCGGGGGGCGACTCG CCCCCGGGCCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAACATGAACCCTGTTATGAAAG CTTGCAGTCTGAGTGTGATTCTTTGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGA TCTCTTGGTTCCG) das regiões de interesse (ITS) IT região ITS1-18S-ITS2, sendo toda a sequência submetida a identificação a nível de espécie por meio de comparação com sequências depositadas no banco de dados Genbank, o que possibilitou identificar a espécie fúngica como sendo o *Aspergillus terreus*.

Em ensaio prévio, o *Aspergillus terreus* foi submetido a enriquecimento e crescimento nos meios NBRIP, uso geral, 9K-glicose e 9K, conforme demonstrado pela Figura 1. O *A. terreus* isolado da amostra de minério de ferro apresentou grande potencial de crescimento em ensaio prévio no meio NBRIP, e assim, sendo definido como principal meio de crescimento e desenvolvimento do processo de biossolubilização de fósforo neste estudo, assim, representado na Figura 1A. A capacidade de solubilizar o fósforo pela estirpe fúngica no meio NBRIP se manteve em nível elevado ao longo de 7 dias, favorecendo o uso do meio NBRIP no processo de forma eficiente na solubilização do fósforo.

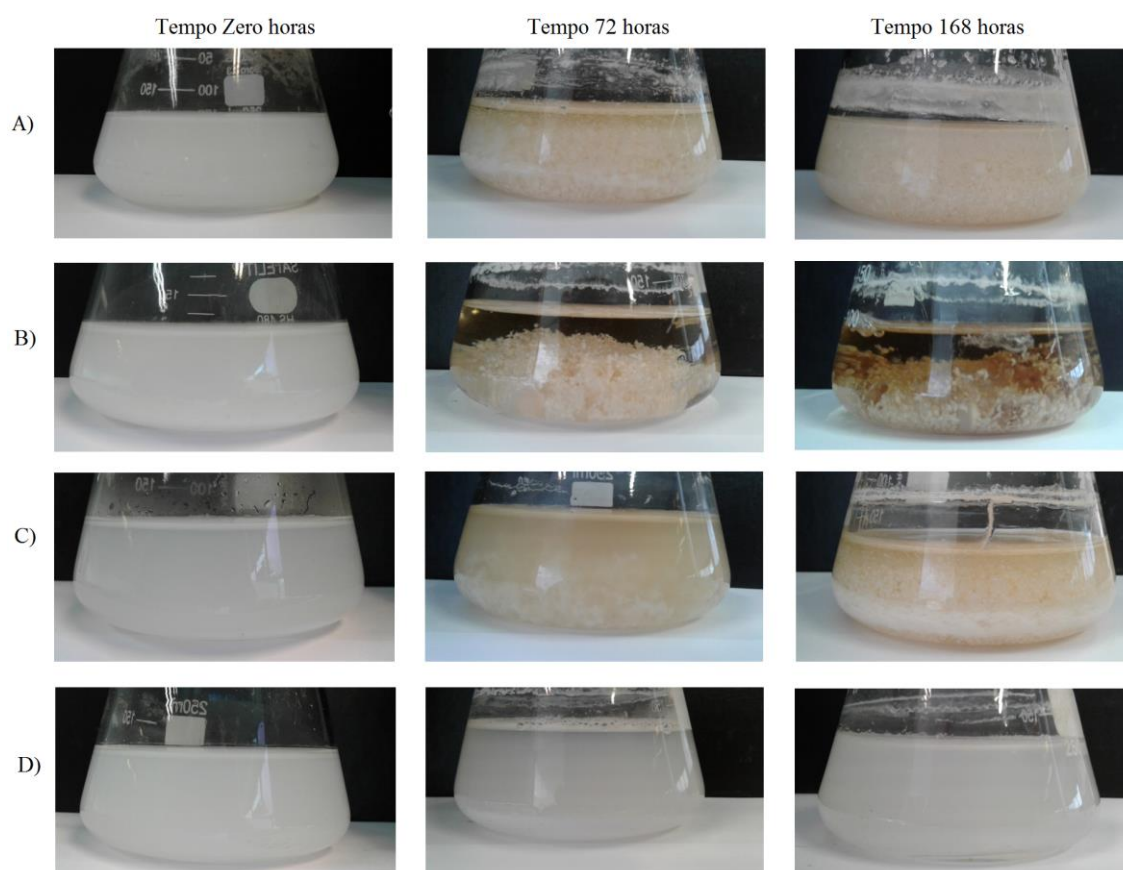


Figura 1: Evolução da biomassa fúngica em 168 horas nos meios NBRIP (A), uso geral (B), 9K-glicose (C), e 9K (D).

O *Aspergillus terreus* isolado da amostra de minério de ferro demonstrou potencial na capacidade de solubilização do fósforo em meio enriquecido com fosfato de cálcio, $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$, como demonstrado na Tabela 2. Foi observado uma biossolubilização máxima de $908,85 \text{ mg L}^{-1}$ de fosfato ou $296,56 \text{ mg L}^{-1}$ de fósforo pelo fungo, contribuindo com a solubilização total de $90,93 \%$ do fósforo presente no meio enriquecido com o fosfato de cálcio. Considerando a quantidade máxima de fósforo solubilizado pela biomassa fúngica e o tempo máximo de processo, foi observado uma solubilização média de $1,76 \text{ mg h}^{-1}$ de fósforo pelo processo de biossolubilização. Isso nos permite concluir que foram solubilizados aproximadamente $182,13 \text{ mg}$ de fósforo por grama de amostra de fosfato de cálcio.

A partir da Figura 2A, é observada uma interação importante do *Aspergillus terreus* no processo de conversão do fósforo insolúvel na sua forma solúvel, sendo verificada uma acentuada solubilização do elemento mineral fósforo presente na amostra de minério de ferro, e assim, sendo percebida a estabilização do processo entre os períodos de 144 e 168 horas de solubilização do fósforo.

Tabela 2: Evolução do potencial e verificação dos mecanismos de solubilização de fósforo pela estirpe fúngica.

Tempo (hrs)	[PO ₄ ³⁻] solúvel (mg L ⁻¹) ± DP	[P] solúvel (mg L ⁻¹) ± DP	Redução de P no minério de ferro %	Produção de biomassa (mg) ± DP	Velocidade de crescimento (mg h ⁻¹)	pH ± DP	Fosfatase ácida (U L ⁻¹) ± DP
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,0	0,0	6,08 ± 0,000	0,000 ± 0,000
24	255,16 ± 6,10	83,26 ± 1,99	25,53	354,7 ± 0,2	14,8	5,65 ± 0,035	0,086 ± 0,041
48	456,42 ± 4,72	148,93 ± 1,54	45,67	1491,6 ± 0,6	31,1	5,43 ± 0,025	0,395 ± 0,082
72	590,15 ± 3,50	192,57 ± 1,14	59,05	1511,8 ± 1,4	21,0	5,29 ± 0,025	0,719 ± 0,098
96	717,56 ± 3,99	234,14 ± 1,30	71,80	1538,7 ± 1,3	16,0	5,14 ± 0,020	0,751 ± 0,092
120	839,32 ± 8,98	273,87 ± 2,93	83,98	1542,1 ± 1,0	12,9	5,13 ± 0,015	0,811 ± 0,049
144	889,88 ± 3,05	290,37 ± 0,99	89,04	1544,0 ± 0,8	10,7	5,13 ± 0,021	0,822 ± 0,050
168	908,85 ± 6,02	296,56 ± 1,96	90,93	1544,4 ± 1,1	9,2	5,13 ± 0,006	0,832 ± 0,025

DP – desvio-padrão.

Conforme representado na Tabela 2, o *Aspergillus terreus* resultou numa produção de massa micelial final de 1544,4 mg de biomassa, sendo representado significativamente por um aumento progressivo na massa do micélio fúngico. A Figura 2B, corrobora com a confirmação da eficiente capacidade na produção da biomassa tangencialmente a solubilização do fósforo, sendo observado um salto importante nas primeiras 48 horas no conteúdo da biomassa. A velocidade de desenvolvimento da biomassa fúngica ocorreu semelhantemente a produção de biomassa nas primeiras 48 horas, demonstrando um aumento da velocidade de até 31,1 mg h⁻¹, sendo que em seguida ocorreu uma redução dessa velocidade, o que é averiguado pela redução da capacidade de assimilação da fonte de fósforo insolúvel presente no meio. Fazendo um paralelo pela quantidade de fósforo solubilizado e a produção quantitativa de biomassa fúngica, foi verificado uma solubilização de aproximadamente 0,19 mg de fósforo por grama de biomassa produzida.

Tanto o pH como a fosfatase ácida contribuíram para o processo de solubilização do fósforo pelo *Aspergillus terreus*, representando um ótimo marcador de qualidade do processo de biossolubilização. Behera et al. (2017), relatam que os mecanismos primários na solubilização de fósforo realizada tanto pelas plantas como pelos micro-organismos são exercidos por meio da excreção de H⁺, da produção de ácidos orgânicos, e biossíntese de fosfatase ácida. Os resultados apresentados na Tabela 2, como também exibidas pelas Figura 2C e 2D, demonstram exatamente esta correlação dos mecanismos primários de solubilização do fósforo, através da diminuição do potencial hidrogeniônico (pH) e do aumento da atividade enzimática de fosfatase ácida, contribuindo na dissolução eficiente do fósforo insolúvel presente no meio enriquecido de fosfato de cálcio. O aumento da atividade enzimática de fosfatase ácida apresentada pela Tabela 2, é discutido por Mónica et al. (2017), como sendo o principal mecanismo de mineralização do fósforo no solo, o que também de sua atividade ótima de pH. Outros trabalhos como Govarthan et al. (2018) e Adhikari e Pandey (2019), defendem que a liberação de fosfatase ácida está diretamente relacionada na produção de ácidos orgânicos, e consecutivamente pela redução do pH, por meio da liberação de prótons, e assim, sendo considerado o principal mecanismo empregado na solubilização do fósforo no solo.

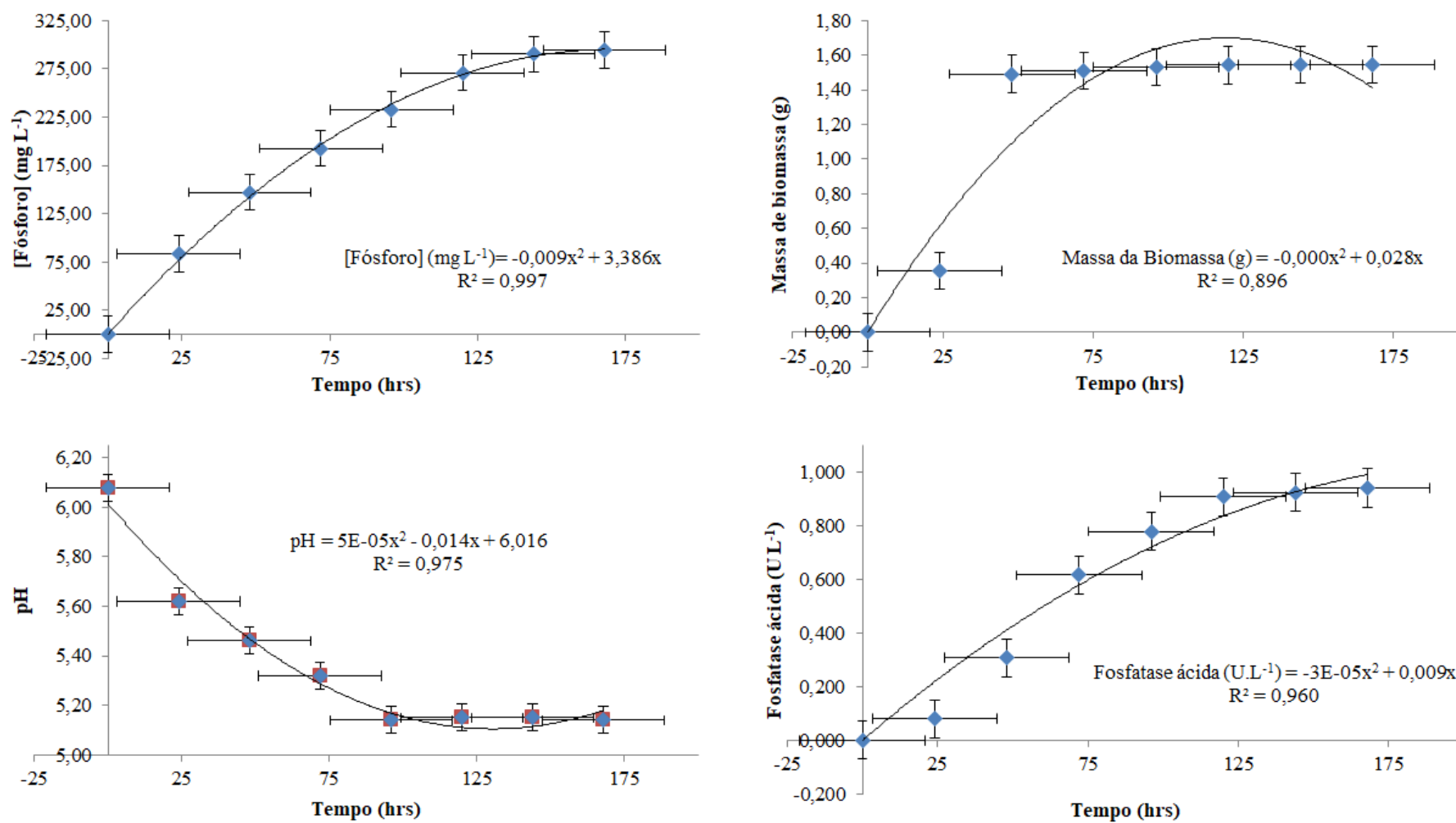


Figura 2: Representação gráfica dos ensaios físico-químicos para verificação do potencial de solubilização do fósforo.

Segundo Behera et al. (2017), os ácidos orgânicos podem formar complexos com cátions (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+}), contribuindo na liberação do fósforo, seja por reação de quelação ou simples troca. É evidente que o aumento da acidez contribui para a acessibilidade do fósforo no meio líquido, tornando o fósforo que antes se encontrava numa situação insolúvel na sua forma solúvel, o que também pela identidade do fungo isolado do rejeito de minério de ferro mostrou-se grande capacidade de desenvolvimento em condição inóspita de acidez, mais que contribui numa eficiente mobilização e solubilização de compostos insolúveis de fósforo.

4 CONCLUSÃO

O referido estudo conferiu que o *Aspergillus terreus* isolado do rejeito de minério de ferro apresentou grande potencial na solubilização do fósforo insolúvel, e assim, sendo comprovado por meio das resultantes dos atributos físico-químicos, como o pH e a fosfatase ácida, como os principais mecanismos de mineralização do fósforo no rejeito. Esses atributos demonstraram uma importante ferramenta de correlação tanto no desenvolvimento da biomassa do *Aspergillus terreus* como na eficiência da solubilização do fósforo no meio reacional. É sugestivo que outros trabalhos venham a ser realizados visando a remoção e ou utilização do fósforo contido no meio reacional, na aplicação de diferentes biotecnologias, como exemplo, na biofertilização.

REFERÊNCIAS

- Adhikari, P.; Pandey, A. Phosphate solubilization potencial of endophytic fungi isolated from *Taxus wallichiana* Zucc. roots. *Rhizosphere*, 2019, 9, 2-9.
- Andrews, s. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Behera, B. C.; Yadav, H.; Singh, S. K.; Mishra, R. R.; Sethi, B. K.; Dutta, S. K.; Thatoi, H. N. Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia sp.* isolated from mangrove soil Mahanadi river delta, Odisha, India. *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, 2017, 15, 169-178.
- Chime, T. O.; Menkiti, M. C.; Onukwuli, O. D. Biodesphosphorization of iron ore using *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *N Y Sci J*, 2011, 4, 1-6.
- Cock, P. J. A.; Antao, T.; Chang, J. T.; Chapman, B. A.; Cox, C. j.; Dalke, A.; Friedberg, I.; Hamelryck, T.; Kauff, F.; Wilczynski, Hoon, M. J. L. Biopython: freely available Python tools for computacional molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics*, 2009, 25, 1422-1423.

- Govarthanan, M.; Mythili, R.; Selvankumar, T.; Kamala-Kannan, S.; Kim, H. Myco-phytoremediation of arsenic- and lead-contaminated soils by *Helianthus annuus* and wood rot fungi, *Trichoderma* sp. isolated from decayed wood. *Ecotox Environ Safe*, 2018, 151, 279-284.
- Jain, R.; Saxena, J.; Sharma, V. The ability of two fungi to dissolve hardly soluble phosphates in solution. *Mycol J*, 2017, 8, 104-110.
- Li, X.; Luo, L.; Yang, J.; Li, B. Mechanisms for solubilization of various insoluble phosphates and activation of immobilized phosphates in different soils by an efficient and salinity-tolerant *Aspergillus niger* strain An2. *Appl Biochem Biotechnol*, 2015, 175, 2755-2768.
- Li, Z.; Bai, T.; Dai, L.; Wang, F.; Tao, J.; Meng, S.; Hu, Y.; Wang, S.; Hu, S. A study of organic acid production in contrasts between two phosphate solubilizing fungi: *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger*. *Sci Rep*, 2016, 6, 1-8.
- Liu, Z.; Li, Y. C.; Zhang, S.; Fu, Y.; Fan, X. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. *Appl Soil Ecol*, 2015, 96, 217-224.
- Ghosh, R.; Barman, S.; Mukherjee, R.; Mandal, N. C. 2016. Role of phosphate solubilizing *Burkholderia spp.* for successful colonization and growth promotion of *Lycopodium cernuum* L. (*Lycopodiaceae*) in lateritic belt of Birbhum district of West Bengal, India. *Microbiol Res*, 2016, 183, 80-91.
- Mendes, G. O.; Zafra, D. L.; Vassilev, N. B.; Silva, I. R.; Jr Ribeiro, J. I.; Costa, M.D. Biochar enhances *Aspergillus Níger* rock phosphate solubilization by increasing organic acid production and alleviating fluorid toxicity. *Appl Environ Microbol*, 2014, 80, 3081-3085.
- Mónica, I. F. D.; Godoy, M.S.; Godeas, A. M.; Scervino, J. M. Fungal extracellular phosphatases: their role in P cycling under different pH and P sources availability. *J Appl Microbiol*, 2017, 124, 155-165.
- Nakajima, K.; Noda, S.; Nansai, K.; Matsubae, K.; Takayanagi, W.; Tomita, M. Global distribution of used and unused extracted materials induced by consumption of iron, copper, and nickel. *Environ Sci Technol*, 2019, 53, 1555-1563.
- Ofoegbu, S. U. Characterization studies on Agbaja iron ore: a high-phosphorus content ore. *SN Appl Sci*, 2019, 204, 1-11.
- Paul, D.; Sinha, S. N. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential river Ganga, India. *Annals Agra Sci*, 2016, 15, 130-136.

- Pereira, A. C.; Papini, R. M. 2015. Processes for phosphorus removal from iron ore – a review. *Rev Esc Minas*, 2015, 68, 331-335.
- Rodrigues, P.; Venâncio, A.; Lima, N. Toxic reagents and expensive equipment: are they really necessary for the extraction of good quality fungal DNA? *Letters in Appl Microbiol*, 2017, 66, 32-37.
- Schmidt, P. A.; Bálint, M.; Greshake, B.; Bandow, C.; Römbke, J.; Schmitt, I. Illumina metabarcoding of a soil fungal community. *Soil Biology & Biochemistry*. 2013, xxx, 1-5.
- Solanki, M.; Kundu, B. S.; Nehra, K. 2018. Molecular diversity of phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere of chickpea, mustard and wheat. *Annals Agr Sci*, 2018, 16, 458-563.
- Su, J.; Xiu, Y. F.; Huang, K.; Yu, J. T.; Alam, S.; Zhu, H. M.; Guo, Z. C. Selective recovery of phosphorus from acid leach liquor of iron ore by garlic peel adsorbent. *RSC Advances*, 2018, 8, 22276-22285.
- Tahir, M.; Khalid, U.; Ijaz, M.; Shah, G. M.; Naeem, M. A.; Shahid, M.; Mahmood, K.; Ahmad, N.; Kareem, F. Combined application of bio-organic phosphate and phosphorus solubilizing bacteria (*Bacillus* strain MWT 14) improve the performance of bread wheat with low fertilizer input under an arid climate. *Braz J Microbiol*, 2018, 49S, 15-24.
- Taylor, D. J. C.; Page, D. C.; Geldenhuys, P. Iron and steel in South Africa. *J S Afr Inst Min Metall*, 1988, 88, 73-95.
- Tudu, K.; Kumar, S.; Mandre, N. Enhanced recovery of low-grade iron ore by selective flocculation method. *J Disp Sci Technol*, 2017, 39, 1075-1079.
- Wei, Y.; Zhao, Y.; Shi, M.; Cao, Z.; Lu, Q.; Yang, T.; Fan, Y.; Wei, Z. Effect of organic acids production and bacterial community on the possible mechanism of phosphorus solubilization during composting with enriched phosphate-solubilizing bacteria inoculation. *Bior Technol*, 2018, 247, 190-199.
- White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Chapter 38, p. 315-322.
- Xiao, C.; Wu, X.; Chi, R. Dephosphorization of high-phosphorus iron ore using different sources of *Aspergillus niger* strains. *Appl Biochem Biotechnol*, 2015, 176, 518-528.
- Yamamoto, T.; Nakamoto, M. 2018. Extraction of phosphorus from dephosphorization slag. In: OHhtake, O.; Tsuneda, S., eds.; *Phosphorus Recovery and Recycling*, Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd., Kyoto, Japan, 2018, p. 339-347, cap 23.

4.3 CAPÍTULO 3

ARTIGO 3

Título: Avaliação do potencial de solubilização de fósforo pelo *Aspergillus terreus*

Autores: Glalber Luiz da R. Ferreira^{1*}, José Daniel Gonçalves Vieira¹

¹Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Universidade Federal de Goiás. Cep 74605-050, Goiânia, GO, Brasil.

*e-mail: glalberocha@gmail.com

e-mail: jdgvieira62@gmail.com

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO PELO *Aspergillus terreus*

RESUMO

A biossolubilização é uma das tecnologias mais inovadora e promissora utilizada na recuperação de solos, é totalmente aplicável aos rejeitos de mineração, já que as mineradoras demonstram uma imensa incapacidade de alcançar a totalidade no aproveitamento de seus minerais, e isso se deve a métodos considerados falíveis no processo de mineração. Diante a tal problemática, este estudo vislumbrou a possibilidade da aplicação da solubilização do fósforo presente no rejeito do minério de ferro pelo *Aspergillus terreus*. Os ensaios analíticos propostos no estudo indicaram uma solubilização máxima de 87.77% do fósforo pelo *A. terreus* a partir do rejeito do minério de ferro, correspondendo a uma concentração de 286.38 mg L⁻¹ de fósforo solúvel, ocorrido a um período de 168 horas de processo de biossolubilização, e assim, contribuindo a uma solubilização média de 1,70 mg h⁻¹ de fósforo pela biomassa fúngica. Complementando, as imagens microfotográficas obtidas pela MEV e MET revelaram por meio de análise os aspectos morfológicos e estruturais do micélio e da composição celular do fungo, demonstrando a eficiente solubilização do fósforo pelo *A. terreus*. As informações reveladas por este estudo demonstram a eficiente solubilização do componente fósforo presente no rejeito do minério de ferro pelo fungo, resultando como uma excelente tecnologia, sendo sugestiva sua aplicação na mineração, como uma alternativa para redução de custos de produção submissão de uma condição de sustentabilidade do sistema de mineração, e assim, contribuindo numa melhor qualidade do minério de ferro e numa provável finalidade do fósforo solúvel, como exemplo, na produção de fertilizantes fosfatados.

Palavras-chave: fósforo, biossolubilização, solubilização, *Aspergillus terreus*, rejeito de minério de ferro.

1 INTRODUÇÃO

O esgotamento do minério de ferro em todo o mundo tem trazido grandes preocupações, já que é a matéria-prima mais importante para a indústria siderúrgica, e principal recurso para atendimento de diversas demandas de bens e materiais da população e do desenvolvimento industrial. O minério de ferro é designado geralmente como alto ou baixo grau com base no seu teor de ferro, sendo que os minérios de alta qualidade, os quais são encontrados com teor de fósforo (P) inferior a 0,07% P, são considerados comercialmente os mais desejados, e estão se esgotando muito rapidamente, tornando-se essencial como único recurso a exploração e beneficiamento de minérios de baixo teor (Tudu et al., 2018; Ofoegbu, 2019).

O minério de ferro de baixo teor existe em grande abundância no mundo todo, mais a sua baixa qualidade se deve a alta concentração de P incorporado ao minério de ferro, tendo esse elemento um efeito deletério sob a formação do aço, não satisfazendo aos requisitos necessários para produção de ferro (Zhang et al., 2018). O fósforo está presente em quase toda a cadeia produtiva do ferro e do aço, o mesmo tende a concentrar-se no ferro durante o processo extrativo, uma vez que é capaz de passar de sua forma oxidada para sua forma elementar, estando no ferro metálico após a redução mineral. Devido aos processos atuais de produção de ferro, como exemplo por via operação de alto-forno, a alta temperatura favorece que o fósforo seja totalmente absorvido pelo ferro fundido (Rath et al., 2018).

Com a exaustão gradual do minério de ferro de alta qualidade, o que significa numa das principais preocupações da indústria siderúrgica, o setor de mineração deverá se adequar a uma mineração seletiva sob o aspecto de realizar o beneficiamento do minério de ferro de baixa qualidade, o que é inevitável, sendo a remoção do fósforo do minério de ferro a principal base do uso do minério com alto teor de fósforo para o processo de fabricação de ferro (Zhao et al., 2018). Pereira e Papini (2015), em seus estudos não conseguem estabelecer com precisão como o fósforo é encontrado no minério de ferro, sendo sugerido pelos autores que fósforo ocorre, provavelmente, no minério de ferro na forma de fosfato, se encontrando adsorvido na superfície da partícula ou ocluído nos microporos, é sugerido também que o fósforo esteja localizado dentro da estrutura dos oxihidróxidos ou como um mineral fosfato (Rachappa et al., 2015).

O principal e mais frequente da classe dos fosfatos é a apatita, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)(\text{F}, \text{Cl}, \text{OH})$, mais outros fosfatos podem ser encontrados em depósitos de minério de ferro,

como: a wavellite, $\text{Al}_3(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_3 \cdot 5(\text{H}_2\text{O})$; a senegalite, $\text{Al}_3(\text{PO}_4)(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})$; a turquesa, $\text{CuAl}_6(\text{PO}_4)_4(\text{OH})_{8,0,5}(\text{H}_2\text{O})$; a strengite, $\text{Fe}^{3+}(\text{PO}_4) \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$; o Rockbridgeite, $\text{Fe}^{2+}0,75\text{Mn}^{2+}0,25\text{Fe}^{3+}4(\text{PO}_4)_3(\text{OH})_5$; a frondelita, $\text{Mn}^{2+}\text{Fe}^{3+}4(\text{PO}_4)_3(\text{OH})_5$; o gorceixite, $\text{BaAl}_3(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_5 \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$; o barrandite, $(\text{Al}, \text{Fe})\text{PO}_4 \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$; o variscite, $\text{Al}(\text{PO}_4) \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$. No Brasil, os fosfatos wavellite, senegalita e turquesa são principalmente encontrados nos minérios de ferro (Pereira e Papini, 2015).

Segundo Taylor et al. (1988), a exploração de depósitos de minério de ferro de baixo teor provavelmente suplementaria as reservas cada vez menores de minérios de ferro de alto teor no futuro, e por isso, para que tenhamos a disponibilidade contínua deste recurso mineral se faz necessário o desenvolvimento de novos métodos e sistemas, almejando refazer e usar os minérios de ferro de baixa qualidade até então inutilizáveis e, portanto, inexplorados, e também oferecer uma possível oportunidade de aproveitamento econômico para o elemento fósforo removido do minério de ferro.

Em função disso, diversos esforços de pesquisa têm sido focados almejando a remoção de fósforo do minério de ferro com alto teor de fósforo, e assim, numa tentativa de reduzir o teor de fósforo a níveis aceitáveis (Pereira e Papini, 2015). Diversos são os processos empregados na remoção de fósforo de minérios de ferro, incluindo a separação por magnetização de torrefação (Cao et al., 2018; Zhang et al., 2019), redução direta à base de carvão (Zhao et al., 2018), tratamento térmico (Zhang et al., 2018; Zhao et al., 2018), tratamento por micro-ondas (Cai et al., 2018; Kim et al., 2018), tratamento ultrassônico (He et al., 2018), lixiviação ácida (Xiang et al., 2018; Cai et al., 2018), lixiviação alcalina (Guo et al., 2015; Zhang et al., 2019), aglomeração seletiva (Yang et al., 2018), e flotação (Tudu et al., 2018; Zhang et al., 2019).

Na busca por tecnologias ambientalmente saudáveis para a indústria de mineração, os processos biológicos como a biolixiviação é encarada como sendo uma das soluções mais promissoras e certamente a mais revolucionária para resolução desses tipos de problema. A biolixiviação ou biossolubilização é considerada um tratamento biológico realizado por micro-organismos, que tem como resultante de seu metabolismo, a geração de produtos químicos como ácido mineral, ácidos orgânicos, polímeros e enzimas. Estes subprodutos químicos atacam o rejeito contido no minério, promovendo a sua dissolução e produzindo sua remoção seletiva (Chime et al., 2011).

Considerando o processo de biossolubilização, temos que uma parcela importante de micro-organismos considerados edáficos possuem a habilidade de mineralizar fosfatos orgânicos e de solubilizar fosfatos inorgânicos presentes no solo, e

assim permitindo a liberação de fósforo assimilável pelas plantas (Godin, 2013). Vários são os micro-organismos que têm sido utilizados com considerável eficiência na solubilização de fosfato, a título de exemplo as bactérias (Tahir et al, 2018; Paul e Sinha, 2016; Liu et al., 2015; Solanki et al., 2018; Ghosh et al., 2016; Wei et al., 2018) e os fungos (Mendes et al., 2014; Xiao et al, 2015; Li et al., 2015; Li et al., 2016; Jain et al., 2017). Por esse motivo, este estudo fará uso do *Aspergillus terreus*, isolado do rejeito de minério de ferro, almejando desfosforar o rejeito de minério de ferro e biossolubilizar o fósforo em meio líquido, e assim, contribuindo na viabilização de novos estudos biotecnológicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A amostra de minério de ferro obtida foi proveniente de uma mineradora, localizada na cidade de Catalão, Goiás (18° 16' 43'' de latitude Sul e 47° 88' 22'' de longitude Oeste). Sendo separada aproximadamente uma porção de 10 kg do resíduo gerado sob o solo da mineradora para posterior realização dos estudos de solubilização do fósforo pelo *Aspergillus terreus*.

2.1 Material biológico

O material biológico utilizado neste artigo foi o *Aspergillus terreus*, resultado do isolamento da amostra de rejeito de minério de ferro, conforme descrito no artigo experimental “Solubilization of Phosphorus by Isolated Fungus of Iron ore Tailings”, no Journal of Earth and Environmental Sciences Research, identificado com o DOI: [https://doi.org/10.47363/JEESR/2020\(2\)134](https://doi.org/10.47363/JEESR/2020(2)134).

2.2 Biossolubilização de fósforo em meio contendo minério de ferro

A amostra de rejeito de minério de ferro foi submetida a digestão ácida, com a dissolução de 1 g de amostra para 10 mL de ácido sulfúrico concentrado em cadinho de porcelana em chapa aquecedora, até evaporação incompleta do ácido, em seguida foi filtrada para balão volumétrico de 100 mL e avolumado com água destilada. A concentração de fósforo solúvel no meio foi medida utilizando o equipamento Spectro kit (Alfakit), visando conhecer o conteúdo de fosfato e fósforo na amostra, e em seguida definição da concentração de fósforo para o estudo de solubilização de fósforo pelo *Aspergillus terreus*.

Foi verificado na amostra de minério de ferro uma concentração de 279.44 mg L⁻¹ de fosfato ou 91.18 mg L⁻¹ de fósforo em 1g de minério de ferro. Por isso, foram preparados vinte e dois frascos de Erlenmeyers contendo 357.9 mg de minério de ferro em 100 mL de solução, correspondendo a 1000 mg L⁻¹ de fosfato ou 326.3 mg L⁻¹ de

fósforo, com pH em 7.0 ± 0.2 esterilizados a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min. Em cada frasco de Erlenmeyer foi adicionado 3 fragmentos de 4 mm do inóculo fúngico cultivado em placas de Petri, e incubados a $30 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 130 rpm por 7 dias. Foi retirado um frasco de Erlenmeyer no dia, correspondendo ao tempo zero, e três frascos de Erlenmeyers em períodos de 24 horas.

Foram coletadas amostras de cada frasco de Erlenmeyer após o período de 7 dias de incubação e avaliado quanto a concentração de fósforo solúvel, com a utilização do Spectro kit (Alfakit); a atividade de fosfatase ácida, a partir da utilização do kit comercial (Labtest[®]); a produção de biomassa pela medição de conteúdo de massa seca (IAL, 2008); e ao potencial hidrogeniônico (IAL, 2008).

2.3 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os pellets do micro-organismo obtidos no estudo da biossolubilização de fósforo, foram analisados via MEV em microscópio JEOL (JSM 6610), equipado com EDS Thermo scientific NSS special imaging. As amostras foram submetidas a técnicas especiais de preparação, como fixação em glutaraldeído, desidratação em concentrações ascendentes de acetona, secagem pelo ponto crítico de CO_2 Autosamdri[®], montagem da amostra em “Stub”, e recobrimento de filmes de ouro na amostra pelo sistema de evaporação conhecido como “sputtering” (Denton Vacuum, Desk V), para posterior condução no MEV, visando a realização de observações morfológicas externas do micro-organismo e captura de imagens.

2.4 Análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Consecutivamente ao estudo de biossolubilização de fósforo, foram coletados fragmentos do micro-organismo em formato de pellets, foram analisados via MET em microscópio JEOL (JEM 2100) operado com 100 KeV, equipado com EDS Thermo Scientific. Para as análises via MET, as amostras foram submetidas a técnicas especiais de preparação, como fixação do material em glutaraldeído, pós-fixação em tetróxido de ósmio, desidratação em concentrações ascendente de acetona, infiltração em resina, e por fim a polimerização, para posterior condução no MET, visando a realização de observações morfológicas internas ao micro-organismo e captura de imagens.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostra de rejeito de minério de ferro revelou possuir uma concentração de 91.18 mg L^{-1} de fósforo em 1 g de rejeito de minério de ferro, equivalendo a um teor de 9.12% de fósforo, sendo considerado então um minério de baixa qualidade, devido possuir uma concentração superior a 0.07% de fósforo na composição do minério de ferro,

conforme descrito por Ofoegbu (2019), e assim, sendo considerado impróprio para fabricação de aço.

O *Aspergillus terreus* demonstrou ter grande potencial na solubilização de fósforo que se encontrava incorporada ao minério de ferro, conforme apresentado na Tabela 1, revelando uma biossolubilização máxima de 877.67 mg L⁻¹ de fosfato e 286.38 mg L⁻¹ de fósforo, o que corresponde a uma solubilização total de 87.77% do fósforo presente no minério de ferro, e restando ainda na amostra de minério de ferro 12.23% de fósforo que não foi solubilizado, o que é condizente a um percentual de 1.12% de fósforo que ainda permanece aderida ao minério de ferro. Na Figura 1A, é possível observar uma crescente solubilização do fósforo a partir da amostra de minério de ferro, o que representa uma significativa interação do micro-organismo no processo de transformação do fósforo insolúvel na sua forma solúvel, e assim, ocorrendo a estabilização da solubilização do fósforo a partir de 168 h de processo. Foi detectado uma solubilização média de 1,70 mg h⁻¹ de fósforo pelo processo de biossolubilização.

Tabela 1: Evolução do potencial e verificação dos mecanismos de solubilização de fósforo pela estirpe fúngica.

Tempo (hrs)	[PO ₄ ³⁻] solúvel (mg L ⁻¹) ± dp	[P] solúvel (mg L ⁻¹) ± dp	Redução de P no minério de ferro %	Produção de biomassa (mg) ± dp	Velocidade de crescimento (mg h ⁻¹)	pH ± dp	Fosfatase ácida (U L ⁻¹) ± dp
0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00	0.0 ± 0.0	0.0	5.53 ± 0.00	0.000 ± 0.000
24	170.33 ± 5.03	55.58 ± 1.64	17.03	354.7 ± 0.2	14.8	3.15 ± 0.02	0.198 ± 0.028
48	353.33 ± 7.77	115.29 ± 2.53	35.33	1201.6 ± 0.6	25.0	2.90 ± 0.02	0.377 ± 0.047
72	516.33 ± 7.02	168.48 ± 2.29	51.63	1261.8 ± 1.4	17.5	2.81 ± 0.04	0.543 ± 0.039
96	710.67 ± 8.50	231.89 ± 2.78	71.07	1278.7 ± 1.3	13.3	2.78 ± 0.01	0.685 ± 0.037
120	803.00 ± 7.21	262.02 ± 2.35	80.30	1282.1 ± 1.0	10.7	2.75 ± 0.04	0.833 ± 0.037
144	864.67 ± 7.51	282.14 ± 2.45	86.47	1284.0 ± 0.8	8.9	2.73 ± 0.04	0.840 ± 0.011
168	877.67 ± 4.93	286.38 ± 1.61	87.77	1284.4 ± 1.1	7.6	2.71 ± 0.03	0.852 ± 0.019

dp: desvio-padrão

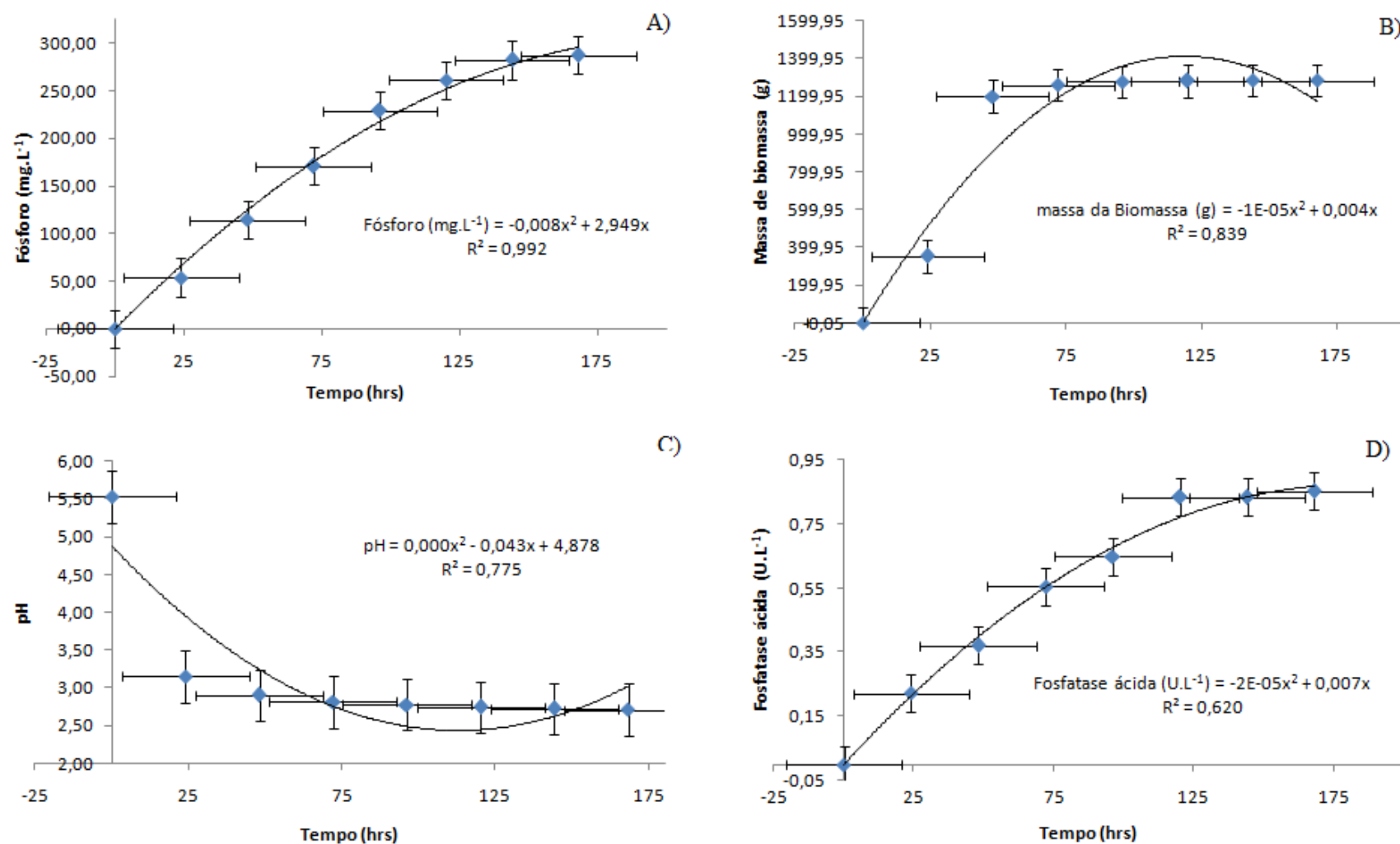


Fig. 1: Representação gráfica dos ensaios físico-químicos para verificação do potencial de solubilização de fósforo.

Segundo os resultados apresentados pela Tabela 1, o *Aspergillus terreus* apresentou um ótimo desempenho na produção de biomassa, sendo observado aumento progressivo na massa do fungo, resultando numa massa final de 1284.4 mg de biomassa. Quanto a velocidade de desenvolvimento da massa micelial fúngica, foi evidenciado uma ordem inversa, ou seja, um crescimento nas primeiras 48 h, e ocorrendo posteriormente uma diminuição progressiva na produção de biomassa, apresentando redução da capacidade de assimilação da fonte de fósforo na forma inorgânica e insolúvel. A Figura 1B confirma a eficiente capacidade de produção de biomassa frente a solubilização de fósforo, sendo verificado o início da estabilização de produção de biomassa a partir de 120 h do processo de biossolubilização.

A solubilização do fósforo se deu através de estratégias bioquímicas exercida pelo *A. terreus*, como na produção de ácidos orgânicos, corroborando diretamente na dissolução do fósforo insolúvel presente no minério de ferro. Tanto o pH como a fosfatase ácida contribuem como ótimos marcadores de eficácia na biossolubilização, uma vez que demonstram uma boa correlação. Devido a isso a solubilização de fósforo pelo fungo demonstrou ótima correlação quanto a diminuição do potencial hidrogeniônico como no aumento da atividade enzimática de fosfatase ácida, conforme é averiguado na Tabela 1. Segundo Godin (2013); Mendes et al., (2014); Li et al., (2016); Wei et al. (2018); Xiang et al., (2018), a liberação de fosfatase ácida está diretamente envolvida na produção de ácidos orgânicos, condição esta responsável pela redução do pH, e assim, este tipo de correlação demonstrada pela Figura 1C e 1D evidenciam exatamente o comportamento de redução do pH e de liberação de fosfatase ácida no meio, que seja pela liberação de prótons ou pela produção de ácidos orgânicos, é considerado com sendo o principal mecanismo empregado na solubilização do fósforo a partir do minério de ferro.

As imagens geradas pelo MEV, demonstradas na Figura 2, exibem as microfotografias da estrutura externa do *Aspergillus terreus*, contribuindo com as observações dos aspectos morfológicos e estruturais do micélio fúngico após o contato com o minério de ferro. As imagens referem-se aos períodos de tempo zero, 72 e 168 h do processo de solubilização do fósforo. As imagens obtidas exibem uma grande quantidade de estruturas filamentosas de tamanho variável, que se concentram juntas ao minério de ferro (Figuras 2A, 2D e 2G). Essas estruturas demonstraram grande interação com o minério de ferro, que em conjunto com a atividade enzimática, na forma de fosfatase ácida, se confirmou ótima capacidade de solubilizar o fósforo na forma inorgânica e insolúvel (Figuras 2B, 2E e 2H). As Figuras 2C, 2F e 2I, na etapa final da

solubilização do fósforo, revelaram a presença de esporângios em desenvolvimento em meio aos filamentos, e assim, promovendo a fixação e perpetuação da espécie fúngica no meio, através da reprodução.

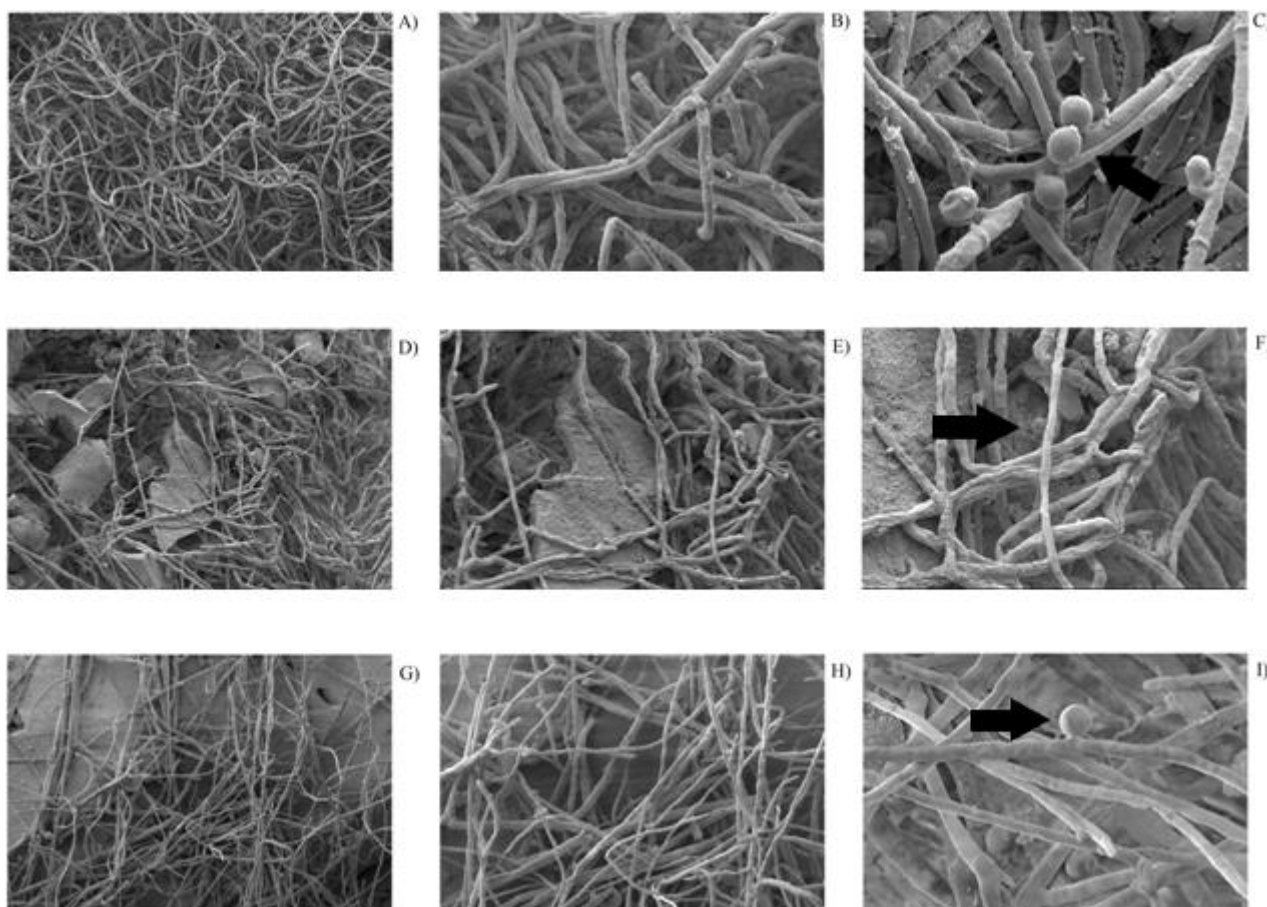


Fig. 2: Imagens das observações morfológicas externas do fungo por MEV, representando a solubilização do fósforo no minério de ferro: A, B e C no tempo zero; D, E e F no tempo de 72 h; e G, H e I no tempo de 168 h. Imagens com resolução do fungo de (A) x500 e 50 μm , (B) x1000 e 10 μm , (D) x3500 e 5 μm , e (D) x500 e 50 μm , (E) x1000 e 10 μm , (F) x2000 e 10 μm , (G) x500 e 50 μm , (H) x1000 e 10 μm , (I) x3500 e 5 μm .

Com a finalidade de observar a morfologia e a dispersão das amostras fúngicas, e consequente averiguação da solubilidade e liberação de íons fósforo para a solução, foram obtidas as microfotografias da estrutura interna das células do *Aspergillus terreus*, através da microscopia eletrônica de transmissão (MET). As imagens obtidas pela MET, demonstradas na Figura 3A, B e C, indicam a presença de estruturas aparentemente “vazias”, globulares ou ovais, não apresentando estrutura interna aparente, que seja compatível com a presença de um sistema vacuolar bastante desenvolvido. A ausência dessas organelas contribui para a não realização da atividade de osmoregulação, do

controle da composição citoplasmática e armazenamento intracelular de materiais pela biomassa fúngica, o que permite que o fósforo seja solubilizado no meio líquido em que se encontra.

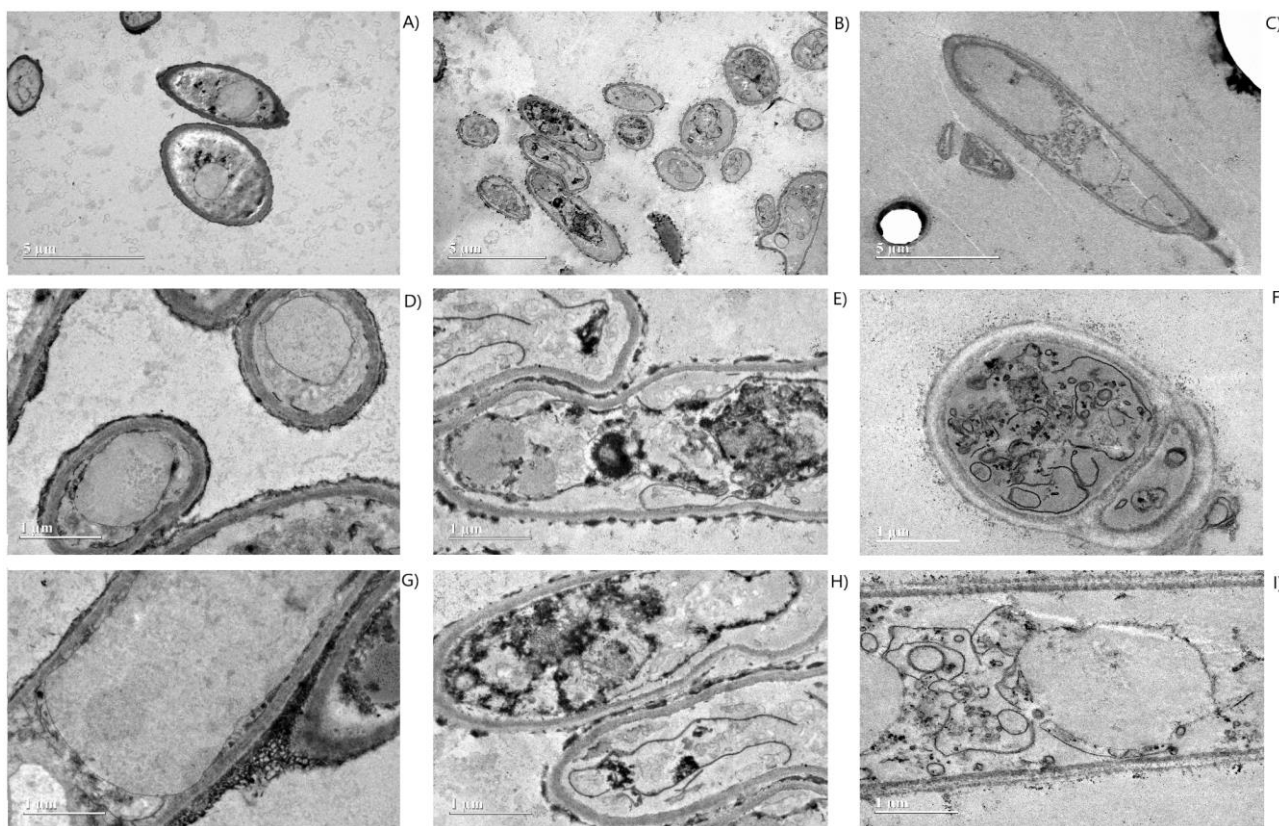


Fig. 3: Imagens das observações morfológicas internas do fungo por MET, representando a solubilização do fósforo no minério de ferro: A, B e C no tempo zero; D, E e F no tempo de 72 h; e G, H e I no tempo de 168 h. Imagens com resolução do fungo de (A) x1500 e 5 µm, (B) x1200 e 5 µm, (C) x1500 e 5 µm, e (D) x5000 e 1 µm, (E) x5000 e 1 µm, (F) x5000 e 1 µm, (G) x5000 e 1 µm, (H) x5000 e 1 µm, e (I) x5000 e 1 µm.

Na Figura 3D e G, demonstram a parede celular do fungo que é formada por diversas camadas, apresentando uma camada interna translúcida e uma camada externa densa, e isso se deve principalmente a constituição desta parede celular, que segundo a Bertolazzi et al. (2018), esta estrutura é geralmente formada por açúcares, proteínas, quitina e cinzas, com destaque para o β -1,3 glucanos que se encontram em grande quantidade nas extremidades das hifas. As imagens das Figuras 3E e H evidenciam um grande número de grânulos de polifosfatos, apresentados encapsulados em vesículas eletro densas, servindo como reservatório de fósforo, que segundo Kornberg et al. (1999), atua como uma fonte alternativa de ligações de alta energia e também como um tampão contra condições alcalinas e contra metais. Já as imagens 3F e I é perceptível o rompimento dos vacúolos

e desorganização dos conteúdos celulares, além de também na fragmentação da parede celular, como na diminuição de sua espessura e organização, o que pode ser considerado um indicativo de degeneração celular. É sugestiva a interpretação que durante o processo de solubilização de fósforo ocorre uma intensa síntese que é promovida pela membrana plasmática, ou seja, um aumento progressivo da síntese e volume citoplasmático, e uma hipertrofia e movimento dos vacúolos, com uma intensa ativação geral de metabolismo, como exemplo, exercida pela atividade enzimática de fosfatase ácida.

4 CONCLUSÃO

Em conformidade com as informações deste estudo, a solubilização do fósforo pelo *Aspergillus terreus*, ou seja, proveniente do minério de ferro, obtido na mineradora de Catalão, resultou numa eficiente solubilização do fósforo inorgânico e insolúvel, demonstrando ser uma tecnologia promissora e sugestiva em sua aplicação, constituindo como alternativa para reduzir custos de produção e estabelecer uma condição de sustentabilidade do sistema de mineração, contribuindo numa melhor qualidade do minério de ferro e numa provável utilização do fósforo solúvel, como por exemplo, na produção de fertilizantes fosfatados.

REFERÊNCIA

- Bertolazi AA, da Silva Folli-Pereira M, Caione G, Passamani LZ, Colodete CM, de Souza SB, Ramos AC, Rasool N, Júnior GFS, Schoningher EL. 2018. Linking Plant Nutritional Status to Plant-AMF Interactions. *Microorganisms for Sustainability*, Chapter 16, 351-384.
- Cai X, Qian G, Zhang B, Chen Q, Hu C. 2018. Selective Liberation of High-Phosphorous Oolitic Hematite Assisted by Microwave Processing and Acid Leaching. *Minerals* 6(8): 1-13. doi:10.3390/min8060245
- Cao Y, Zhang Y, Sun T. 2018. Dephosphorization Behavior of High-Phosphorus Oolitic Hematite-Solid Waste Containing Carbon Briquettes during the Process of Direct Reduction-Magnetic Separation. *Metals* 11(8): 1-11. doi:10.3390/met8110897
- Chime TO, Menkiti MC, Onukwuli OD. 2011. Biodephosphorization of iron ore using *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *NY Sci J* 4(1): 1-6. doi:10.7537/3979ny0401
- Delvasto P, Valverde A, Ballester A, Munoz JA, González F, Blazquez ML, Igual JM, García-Balboa C. 2008. Diversity and activity of phosphate bioleaching bacteria from a high-phosphorus iron ore. *Hydrometallurgy* 92(3): 124-129. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2008.02.007>

- Ghosh R, Barman S, Mukherjee R, Mandal NC. 2016. Role of phosphate solubilizing *Burkholderia spp.* for successful colonization and growth promotion of *Lycopodium cernuum L.* (*Lycopodiaceae*) in lateritic belt of Birbhum district of West Bengal, India. *Microbiol Res* 183: 80-91. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.011>
- Godin AM. (2013). Soil nutrient status and fungal community structure of high and low phosphatase microsites in a mixed Douglas-fir paper birch stand (T). University of British Columbia. Retrieved from <https://open.library.ubc.ca/collections/ubctheses/24/items/1.0165655>
- Guo L, Gao J, Zhong Y, Gao H, Guo Z. 2015. Phosphorus removal of high phosphorous oolitic iron ore with acid-leaching fluidized-reduction and melt-separation process. *ISIJ International* 55(9): 1806-1815. <https://doi.org/10.2355/isijinternational.ISIJINT-2015-135>
- He CC, Hu CY, Lo SL. 2018. Integrating chloride addition and ultrasonic processing with electrocoagulation to remove passivation layers and enhance phosphate removal. *Sep Purif Technol* 201: 148-155. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.03.011>
- IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2008). Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 4ª edição, 1ª edição digital, São Paulo: IMESP, p. 1020.
- Jain R, Saxena J, Sharma V. 2017. The ability of two fungi to dissolve hardly soluble phosphates in solution. *Mycology*, 8(2): 104-110. <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1314389>
- Kim BJ, Cho KH, Lee SG, Park CY, Choi NC, Lee S. 2018. Effective Gold Recovery from Near-Surface Oxide Zone Using Reductive Microwave Roasting and Magnetic Separation. *Metals* 11(8): 1-11. <https://doi.org/10.3390/met8110957>
- Kornberg A, Rao NN, Ault-Riché D. 1999. Inorganic Polyphosphate: A Molecule of Many Functions. *Annual Review of Biochemistry*, 23: 1-18. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.89>
- Li X, Luo L, Yang J, Li B. 2015. Mechanisms for solubilization of various insoluble phosphates and activation of immobilized phosphates in different soils by an efficient and salinity-tolerant *Aspergillus niger* strain An2. *Appl Biochem Biotechnol* 175(5): 2755-2768. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1465-2>
- Li Z, Bai T, Dai L, Wang F, Tao J, Meng S, Hu Y, Wang S, Hu S. 2016. A study of organic acid production in contrasts between two phosphate solubilizing fungi:

- Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger*. Sci Rep 6(1): 1-8. <https://doi.org/10.1038/srep25313>
- Liu Z, Li YC, Zhang S, Fu Y, Fan X. 2015. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. Appl Soil Ecol 96: 217-224. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.08.003>
- Mendes GO, Zafra DL, Vassilev NB, Silva IR, Jr Ribeiro JI, Costa MD. 2014. Biochar enhances *Aspergillus Níger* rock phosphate solubilization by increasing organic acid production and alleviating fluorid toxicity. Microb Biotechnol 80(10): 3081-3085. doi:10.1128/AEM.00241-14
- Nautyal CS. 1999. An efficient microbiological growth médium for screening phosphate solubilizing micro-organisms. FEMS Microbiol Lett 170(1): 265-270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
- Ofoegbu SU. 2019. Characterization studies on Agbaja iron ore: a high-phosphorus content ore. SN Appl Sci 204(1): 1-11. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-0218-9>
- Paul D, Sinha SN. 2016. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential river Ganga, India. Ann of Agrar Sci 15(1): 130-136. <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2016.10.001>
- Pereira AC, Papini RM. 2015. Processes for phosphorus removal from iron ore – a review. REM: Rev Esc Minas 68(3): 331-335. <http://dx.doi.org/10.1590/0370-44672014680202>
- Rachappa S, Prakash Y, Amit. 2015. Iron ore recovery from low grade by using advance methods. Proc Earth Planet Sci 11: 195-197. <https://doi.org/10.1016/j.proeps.2015.06.024>
- Rath SS, Rao DS, Tripathy A, Biswal SK. 2018. Biomass briquette as an alternative reductant for low grade iron ore resources. Biomass and Bioenergy 108: 447-454. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.10.045>
- Solanki M, Kumbu BS, Nehra K. 2018. Molecular diversity of phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere of chickpea, mustard and wheat. Ann Agrar Sci 16(4): 458-563. <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2018.05.007>
- Tahir M, Khalid U, Ijaz M, Shah GM, Naeem MA, Shahid M, Mahmood K, Ahmad N, Kareem F. 2018. Combined application of bio-organic phosphate and phosphorus solubilizing bacteria (*Bacillus* strain MWT 14) improve the performance of bread wheat with low fertilizer input under an arid climate. Braz J Microbiol 49(1): 15-24. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.11.005>

- Taylor DJC, Page DC, Geldenhuys P. 1988. Iron and steel in South Africa. J. S. Afr. Inst. Min. Metall. 88(3): 73-95.
- Tudu K, Kumar S, Mandre N. 2018. Enhanced recovery of low-grade iron ore by selective flocculation method. J Disper Sci Technol 39(8): 1075-1079. <https://doi.org/10.1080/01932691.2017.1382371>
- Verma SC, Ladha JK, Tripathi AK. 2001. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water Rice. J Biotechnol 91(2-3): 127-141. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00333-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00333-9)
- Wei Y, Zhao Y, Shi M, Cao Z, Lu Q, Yang T, Fan Y, Wei Z. 2018. Effect of organic acids production and bacterial community on the possible mechanism of phosphorus solubilization during composting with enriched phosphate-solubilizing bacteria inoculation. Bioresour Technol 247: 190-199. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.092>
- Xiang XY, Xia WT, Yuan XL, Yin JG, An J. 2018. Removal of Phosphorus from High Phosphorus Iron Ores in Wushan Mountain by Crosscurrent Acid Leaching. Solid State Phenomena 279: 222-229. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/SSP.279.222>
- Xiao C, Wu X, Chi R. 2015. Dephosphorization of high-phosphorus iron ore using different sources of *Aspergillus niger* strains. Appl Biochem Biotechnol 176(2): 518-528. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1592-4>
- Yang B, Huang P, Shaoxian S, Luo H, Zhang Y. 2018. Hydrophobic agglomeration of apatite fines induced by sodium oleate in aqueous solutions. Results in Physics 9: 970-977. <https://doi.org/10.1016/j.rinp.2018.03.049>
- Zhang H, Zhang Z, Luo L, Yu H. 2019. Behavior of Fe and P during reduction magnetic roasting-separation of phosphorus-rich oolitic hematite. Energy Sources, Part A: Recovery, utilization, and Environmental Effects 41(1): 47-64. <https://doi.org/10.1080/15567036.2018.1496195>
- Zhang L, Machiela R, Das P, Zhang M, Eisele T. 2019. Dephosphorization of unroasted oolitic ores through alkaline leaching at low temperature. Hydrometallurgy 184: 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2018.12.023>
- Zhang Y, Xue Q, Wang G, Wang J. (2018) The Effect of Temperature and Additive on Transport and Transformation of P of High-Phosphorus Iron Ore During Carbothermic Reduction. In: Hwang JY. et al. (eds) 9th International Symposium on High-Temperature Metallurgical Processing. TMS 2018. The Minerals, Metals & Materials Series, p. 855-868. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72138-5_82

- Zhao Y, Sun T, Zhao H, Li X, Wang X. 2018. Effects of CaCO_3 as Additive on Coal-based Reduction of High-phosphorus Oolitic Hematite Ore. *ISIJ International* 58(10): 1768–1774. <https://doi.org/10.2355/isijinternational.ISIJINT-2018-186>
- Zhao J, Chen Z, Zuo H, Wang J, Xue Q. 2018. Research on Reaction Mechanism of Vacuum Carbon Thermal Reduction and Dephosphorization in High Phosphate Iron Ore. *Metals* 12(8): 1-17. <https://doi.org/10.3390/met8121003>

4.4 CAPÍTULO 4

ARTIGO 4

Título: Perfil de ácidos graxos do *Aspergillus terreus*

Autores: Glalber Luiz da Rocha Ferreira^{1*}, Emmanuel Bezerra D'Alessandro², Nelson Roberto Antoniosi², José Daniel Gonçalves Vieira¹

¹Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Universidade Federal de Goiás. Cep 74605-050, Goiânia, GO, Brasil.

*e-mail: glalberocha@gmail.com

e-mail: jdgvieira62@gmail.com

²Instituto de Química, Laboratório de Métodos de Extração e Separação. Universidade Federal de Goiás – UFG. Goiânia, Goiás/Brasil. Campus Samambaia, CEP 74690-900.

e-mail: emmanuel_DAlessandro@hotmail.com

e-mail: nlliantoniosi@gmail.com

PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO *Aspergillus terreus*.

RESUMO

Os fungos são uma promissora fonte alternativa de petróleo para a produção de biodiesel ainda muito pouco conhecida. A identificação de uma espécie com características desejáveis é um componente fundamental para alcançar a viabilidade econômica do processo. O estudo almejou realizar a avaliação do *Aspergillus terreus* em diferentes meios de cultivo e diferentes temperaturas, a produção de biomassa fúngica e em consonância obter o perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos. A biomassa fúngica revelou que no meio NBRIP tanto na temperatura de 29 °C como a 36 °C, real potencial e promissor na produção de biodiesel, devido apresentar valores quantitativos na produção de ácidos graxos saturados (SFA), ao qual apresentam ótimas propriedades de combustão, alcançando valores de 35,89 e 34,89 %, para as temperaturas de 29 °C e 36 °C, respectivamente. Outra condição também considera importante se diz respeito aos teores de TUFA com 1,31% e pela ausência de PUFA, que são valores inferiores conforme descrito na norma europeia EN 14214, responsável por qualificar o teor de FAME para produção de biodiesel, definindo valores máximos de 12% de TUFA e 1% para PUFA, já que os mesmos proporcionam baixa estabilidade oxidativa ao biocombustível. Conforme observado quanto ao perfil de FAME da biomassa de *Aspergillus terreus*, a mesma demonstrou-se ser uma promissora fonte energética na produção de biodiesel.

Palavras-chave: *Aspergillus terreus*, biodiesel, temperatura, ácidos graxos saturados, NBRIP.

1 INTRODUÇÃO

As medidas métricas de diversidade microbiana colocam as comunidades de fungos nativos como as mais ricas espécies, sendo encontrados 4.763 fungos quando submetidos aos filtros de bioinformática (Maron et al., 2018). Os fungos possuem necessidades nutricionais consideradas relativamente simples, e por isso a maioria das espécies seriam capazes de sobreviver perfeitamente em condições aeróbias, quando fornecido nutrientes como a glicose, sais de amônio, íons inorgânicos e também alguns fatores de crescimento (Martín et al., 2019). Os fungos micorrízicos arbusculares vesiculares, considerados simbioses, são uma exceção ao descrito anteriormente, devido requererem um parceiro para o crescimento, como as plantas para o seu cultivo (Bholay, Barbosa e Jadhav, 2018).

Os requisitos elementares para sobrevivência dos fungos são classificados em macronutrientes, que são fornecidos em concentrações milimolares, e micronutrientes, que são disponibilizados em concentrações micromolares (Maron et al., 2018). Os macronutrientes compreendem fontes essenciais de carbono, nitrogênio, oxigênio, enxofre, fósforo, potássio e magnésio. Já os micronutrientes correspondem aos elementos denominados oligoelementos ou elementos traços, como o cálcio, cobre, ferro, manganês e zinco (Martín et al., 2019).

Alguns fungos são considerados oligotróficos, ou seja, apresentam a capacidade de sobreviver em ambientes com uma oferta muito limitada de nutrientes, crescendo em ambientes inóspitos, de elevada acidez e em temperaturas acima de 37° C, atuando na captação de pequenas quantidades de compostos orgânicos voláteis da atmosfera (Velez et al., 2018). Os quimiotróficos são fungos que precisam de formas fixas de compostos orgânicos, que variam desde simples hexoses como glicose a alguns tipos de polissacarídeos como amido e celulose, como forma de suprimento de carbono e energia (Meena e Siddhardha, 2019).

A exploração sustentável dessa biodiversidade tem contribuído na descoberta de fungos visando sua utilização como fonte de produtos comercialmente exploráveis, e dentre os produtos que podem ser obtidos dessa enorme biodiversidade são os ácidos graxos, que são importantes para a saúde humana, demonstrando potencialidades na produção de aditivos alimentares ou farmacêuticos, e isso se deve as suas atividades biológicas (Maron et al., 2018; Tonato et al., 2018). Outra aplicabilidade dos ácidos graxos desenvolvidos pelos fungos seria sua incorporação em ração animal e outra também na produção de biodiesel, a partir da conversão de triacilglicerídeos em metil

ésteres de ácidos graxos, realizado pelo sistema enzimático, as lipases, denominado FAME, (Sitepu et al., 2019).

Nosso estudo teve como objetivo verificar duas questões importantes no cultivo de fungos. Em primeiro lugar, a influência da composição nutricional e da temperatura no desenvolvimento fúngico em diferentes meios de cultivo. Em segundo lugar, a composição do perfil de ácidos graxos na biomassa do *Aspergillus terreus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material biológico

O material biológico utilizado neste artigo foi o *Aspergillus terreus*, resultado do isolamento da amostra de rejeito de minério de ferro, conforme descrito no artigo experimental “Solubilização de fósforo por fungo isolado de rejeito de minério de ferro”.

2.2 Meios de crescimento

O *Aspergillus terreus* foi posto primordialmente em três diferentes meios de crescimento, conforme apresentado na Tabela 1. Todos os meios foram dissolvidos em água destilada, e esterilizados a 121 °C por 20 minutos.

2.3 Produção da biomassa fúngica

Para a produção da biomassa fúngica, foram adicionados três fragmentos de 4 mm do micélio microbiano, cultivado em placas de Petri contendo PDA a 30 ± 2 °C por 7 dias, para Erlenmeyers contendo os três meios de cultivo, apresentados pela Tabela 1, em triplicata, submetidas separadamente nas temperaturas de 29 °C e posteriormente a 36 °C. Para avaliação visual, os meios foram incubados e retirados nos tempos zero, 72 horas e 168 horas, submetidos a 130 rpm na incubadora. Após cada período, foi feita uma avaliação visual dos meios e retirada uma fotografia. Em seguida, os meios do período de 168 horas foram filtrados a vácuo, separando a biomassa do meio líquido. As biomassas dos meios foram secas em dessecador, e colocada em eppendorf®, para realização de ensaio analítico de composição de ácidos graxos. Para realização da composição de ácidos graxos na biomassa fúngica, as amostras foram identificadas como A1, A2 e A3, equivalendo ao crescimento nos meios NBRIP, uso geral e 9K-glicose, respectivamente, na temperatura de 29 °C, e sendo feito da mesma maneira para as amostras B1, B2 e B3, mas na temperatura de 36 °C.

Tabela 1: Constituição elementar dos meios de enriquecimento e crescimento.

Reagentes	Fórmula	Meios de Crescimento %		
		NBRIP	Uso geral	9K-glicose
Glicose	$C_6H_{12}O_6$	1,0	1,0	1,0
Cloreto de magnésio hexahidratado	$MgCl_2.6H_2O$	0,5	-	-
Sulfato de magnésio heptahidratado	$MgSO_4.7H_2O$	0,025	0,1	0,05
Sulfato de amônio	$(NH_4)_2SO_4$	0,01	-	0,3
Nitrato de cálcio	$Ca(NO_3)_2$	-	-	0,0013
Sulfato de ferro heptahidratado	$FeSO_4.7H_2O$	-	-	0,001
Cloreto de potássio	KCl	0,02	-	0,01
Cloreto de sódio	NaCl	-	0,1	-
Cloreto de amônio	NH_4Cl	-	0,5	-
Fosfato de cálcio	$Ca_5(OH)(PO_4)_3$	0,5	0,5	0,5
Ph		$7.0 \pm 0,2$	$7,2 \pm 0,2$	$4,5 \pm 0,2$
Referência		Nautiyal, 1999, modificado.	Verma et al., 2001, modificado.	Silverman e Lundgren, 1959, modificado.

2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os pellets fúngicos do período de 168 horas obtidos do meio NBRIP, foram analisados via MEV em microscópio JEOL (JSM 6610), equipado com EDS Thermo scientific NSS special imaging. As amostras foram submetidas a técnicas especiais de preparação, como fixação em glutaraldeído, desidratação em concentrações ascendentes de acetona, secagem pelo ponto crítico de CO₂ Autosamdri®, montagem da amostra em “Stub”, e recobrimento de filmes de ouro na amostra pelo sistema de evaporação conhecido como “sputtering” (Denton Vacuum, Desk V), para posterior condução no MEV, visando a realização de observações morfológicas externas do *Aspergillus terreus* e captura de imagens.

2.5 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Consecutivamente, foram coletados fragmentos fúngicos em formato de pellets, referente ao período de 168 horas do meio NBRIP, para análise via MET em microscópio JEOL (JEM 2100) operado com 100 KeV, equipado com EDS Thermo Scientific. Para as análises via MET, as amostras foram submetidas a técnicas especiais de preparação, como fixação do material em glutaraldeído, pós-fixação em tetróxido de ósmio, desidratação em concentrações ascendente de acetona, infiltração em resina, e por fim a polimerização, para posterior condução no MET, visando a realização de observações morfológicas internas do *Aspergillus terreus* e captura de imagens.

2.6 Transesterificação direta (DT)

O procedimento de transesterificação direta da biomassa fúngica foi realizado utilizando o método de Hartman & Lago adaptado à microescala, conforme descrito por Soares et al. (2014). O conteúdo superior, contendo o FAME, foi coletado e analisado por cromatografia gasosa. Para calcular o teor de ésteres na biomassa, 1,0 mL foi removido da fase heptânica, obtido via DT, e transferido para um frasco Eppendorf®, previamente tarado. As amostras foram deixadas em dessecador para a evaporação do solvente até a massa do FAME atingir o peso constante. O teor de ésteres foi obtido pela relação entre a massa de FAME e a massa de biomassa inicial utilizada no procedimento de DT.

2.7 Composição de ácidos graxos

A composição dos ácidos graxos na forma de ésteres metílicos foi feita por cromatografia gasosa (HRGC-FID) utilizando o Agilent 7890 equipado com detector de ionização por chama (FID), e um injetor split/splitless para analisar a composição do FAME. A coluna capilar foi a DB-WAX (30m x 0,25mm x 0,25 µm). A temperatura inicial do forno era de 70 °C, sendo aquecida a uma taxa de 10 °C min⁻¹ até 240 °C, e

mantida a essa temperatura por 13 minutos. Aqueceu-se novamente a uma taxa de 5 °C min⁻¹ até 250 °C. A temperatura do injetor foi mantida a 310 °C no modo dividido com uma razão de 10:1, e um volume de injeção de 2 µL. O detector foi mantido em 310° C. Foi utilizado o hidrogênio 5,0 como gás carreador a uma velocidade linear de 42 cm s⁻¹, e também o nitrogênio 5,0 como gás auxiliar a uma taxa de 20 mL min⁻¹.

Os FAMES foram identificados por comparação com os tempos de retenção das amostras de composição conhecida como o óleo de soja, amendoim e crambe (*Crambe abyssinica*) através da análise dos padrões de referência FAME (Nu-Check-Prep®) por cromatógrafo gasoso (HRGC-MS) Shimadzu 17A acoplado a um espectrômetro de massa Shimadzu QP 5050, com interface a 280 °C. O Hélio foi utilizado como gás de arraste a 38 cm s⁻¹. As condições operacionais para forno, injetor e coluna foram às mesmas utilizadas para HRGC-FID. Cada amostra foi injetada três vezes por HRGC-FID e HRGC-MS.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As imagens obtidas pelo MEV, exibem as imagens microfotográficas da estrutura externa do *Aspergillus terreus*, atribuindo as observações dos aspectos morfológicos e estruturais do micélio fúngico, conforme apresentado na Figura 1, revelaram a exibição de uma grande quantidade de estruturas filamentosas de tamanho variável. É possível também observar a presença de esporângios em desenvolvimento em meio aos filamentos, responsáveis por promover a fixação e perpetuação da espécie fúngica.

Já nas imagens produzidas pelo MET, trazem as observações microfotográficas da estrutura interna do *Aspergillus terreus*, exibindo observações morfológicas e de dispersão das amostras fúngicas, conforme demonstrado pela Figura 2. As imagens apresentam a presença de estruturas aparentemente “vazias”, com estruturas globulares ou ovais, sem a percepção de presença de estruturas internas aparente, que se destacam com a presença de um sistema vacuolar bastante desenvolvido.

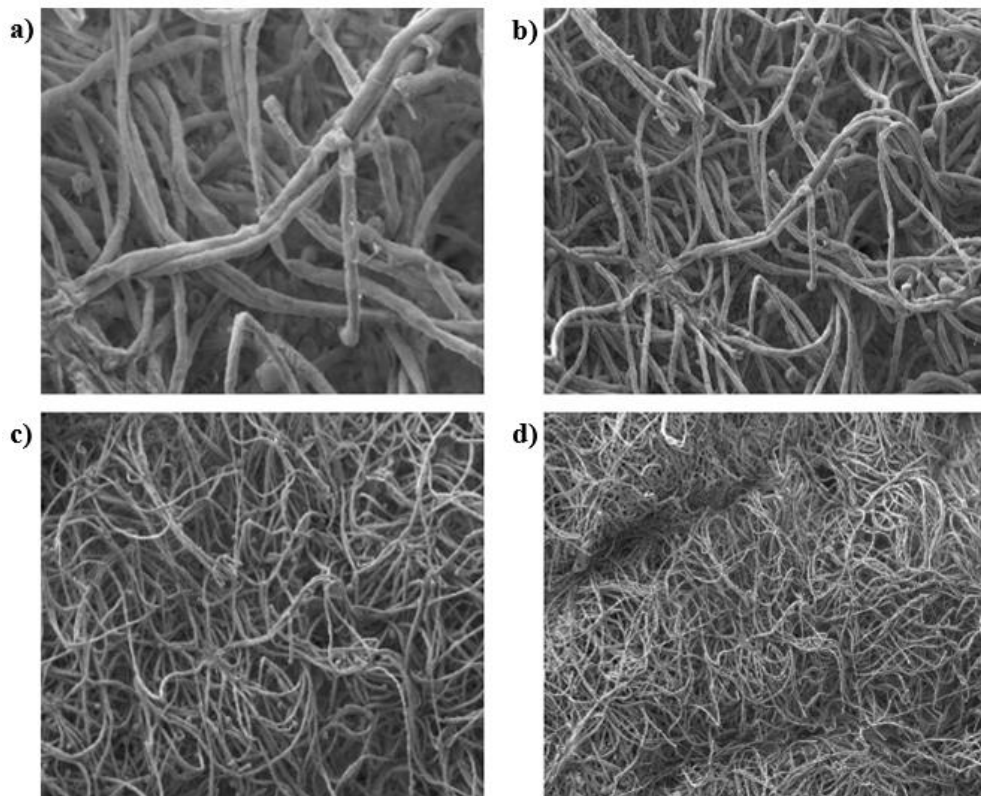


Figura 1: Captura de imagens pelo MEV visando realizar observações morfológicas externas do fungo, do meio NBRIP do período de 168 horas. Imagens com resolução do fungo de (a) x2000 e 10 μm , (b) x1000 e 10 μm , (c) x500 e 50 μm , e (d) x250 e 100 μm .

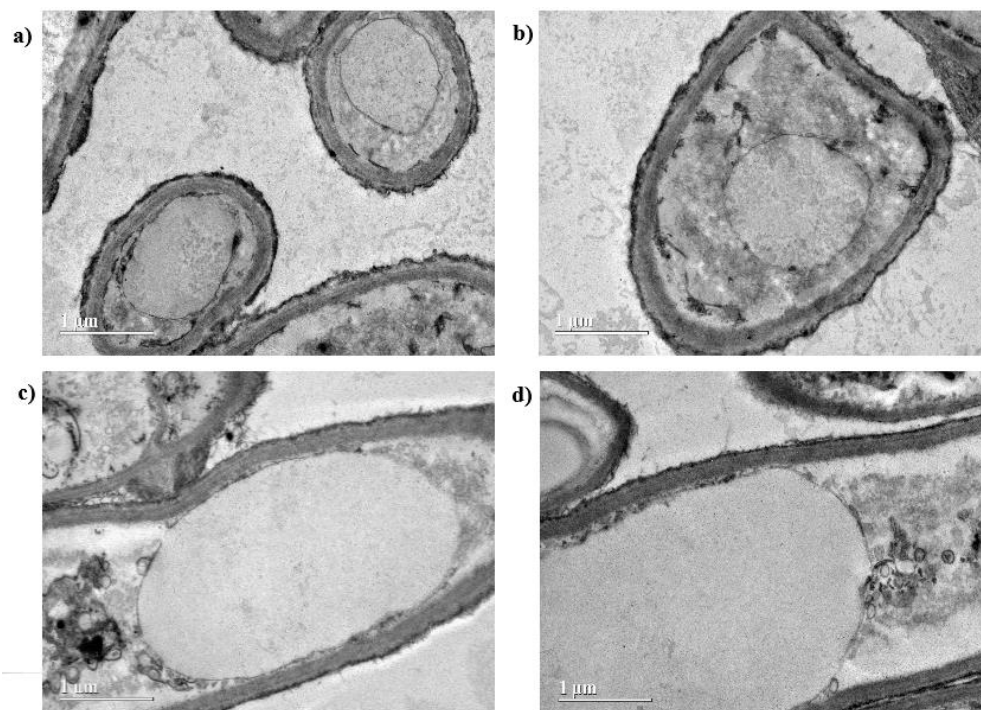


Figura 2: Captura de imagens pelo MET visando realizar observações morfológicas internas do fungo, do meio NBRIP do período de 168 horas. Imagens com resolução do fungo de x5000 e 1 μm .

Os meios de cultivo NBRIP e 9K-glicose são os de maior composição nutricional, conforme apontado pela Tab. 1, sendo cada nutriente responsável pela funcionalidade vital da célula fúngica. Segundo Walker e White (2018), os macronutrientes carbono (C), nitrogênio (N), oxigênio (O), enxofre (S), fósforo (P), potássio (K), magnésio (Mg), e os micronutrientes cálcio (Ca), ferro (Fe), que compõe os meios de cultivo representados na Tabela 1, são necessário para o crescimento celular do fungo. O carbono (presente na glicose), têm a função estrutural da célula fúngica quando em combinação com hidrogênio, oxigênio e nitrogênio, atuam como fonte de energia; o nitrogênio (presente em sais de NH_4^+ , uréia, e aminoácidos), atua estruturalmente e funcionalmente em proteínas e enzimas; o oxigênio (presente no ar, O_2), funciona como substrato para enzimas oxidativas respiratórias e outras funções mistas, sendo essencial para o ergosterol e a síntese de ácidos graxos insaturados; o enxofre (presente em sulfatos e metioninas), é disponibilizado para composição de aminoácidos sulfurados e vitaminas; o fósforo (presente em fosfatos), atua na transdução energética, compondo o ácido nucleico e a estrutura da membrana; o potássio (presente em sais de K^+), é responsável pelo equilíbrio iônico da célula, atuando na atividade enzimática; o magnésio (presente em sais de Mg^{2+}), atua na atividade enzimática, constituindo a estrutura celular e as organelas; o cálcio (presente em sais de Ca^{2+}), sendo responsável como segundo mensageiro na transdução de sinal; e o ferro (presente de sais férricos, quelação do Fe^{3+} por sideróforos e liberação de Fe^{2+} dentro da célula), está contido numa pequena hemoproteína, denominada de citocromo, que é responsável por efetuar o transporte de elétrons.

Os meios de cultivo NBRIP e uso geral demonstraram grande potencial no desenvolvimento da biomassa fúngica, respectivamente nesta ordem, na temperatura de 29°C em relação aos outros meios de cultivo, conforme demonstrado pela Figura 3. Esta condição foi favorável devido á constituição nutricional elementar dos dois meios de cultivo, que têm em comum componentes em quantidades superiores aos outros meios como Mg^{2+} e sais de NH_4^+ que atuam exclusivamente na estrutura e funcionalmente na célula fúngica, além da presença de um açúcar (glicose) tendo o carbono como elemento essencial para fornecimento de energia. O pH em torno de 7 também contribuiu de forma eficiente na produção da biomassa fúngica tão somente para os meios de cultivo NBRIP e uso geral, apesar de maior parte dos fungos terem seu crescimento ótimo em pH ácido.

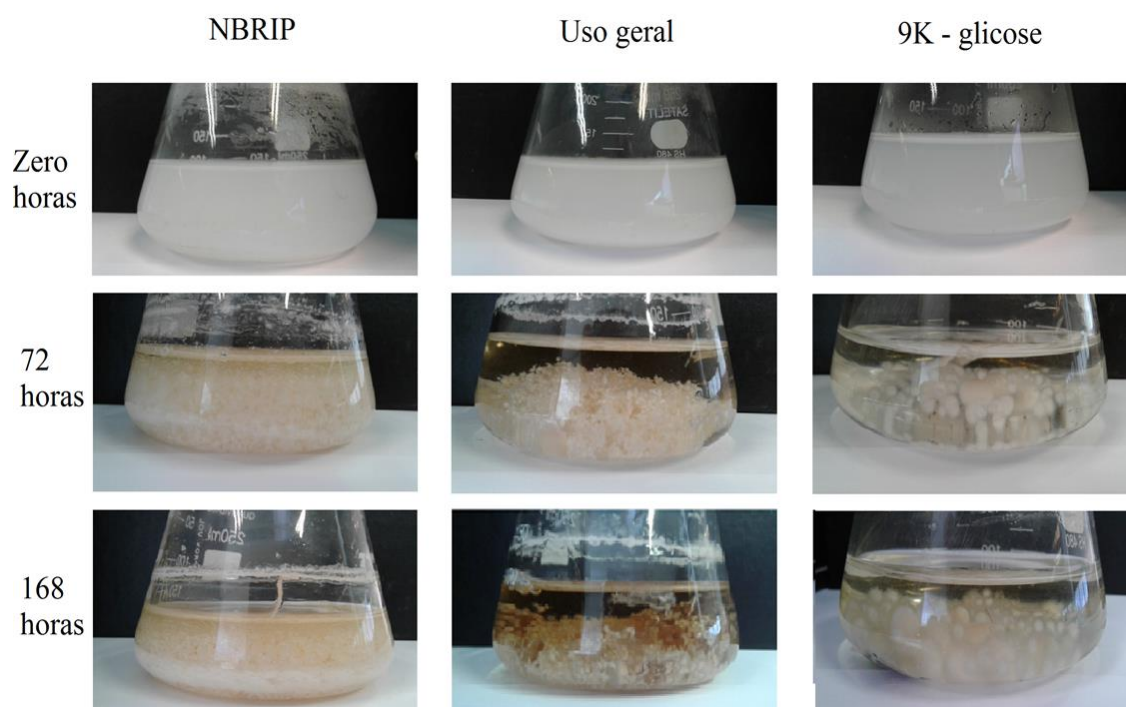


Figura 3: Perfil dos meios de cultivo (NBRIP, uso geral, 9K-glicose e 9K), submetido a três períodos de incubação (zero, 72 e 168 horas), sob temperatura de 29 ° C.

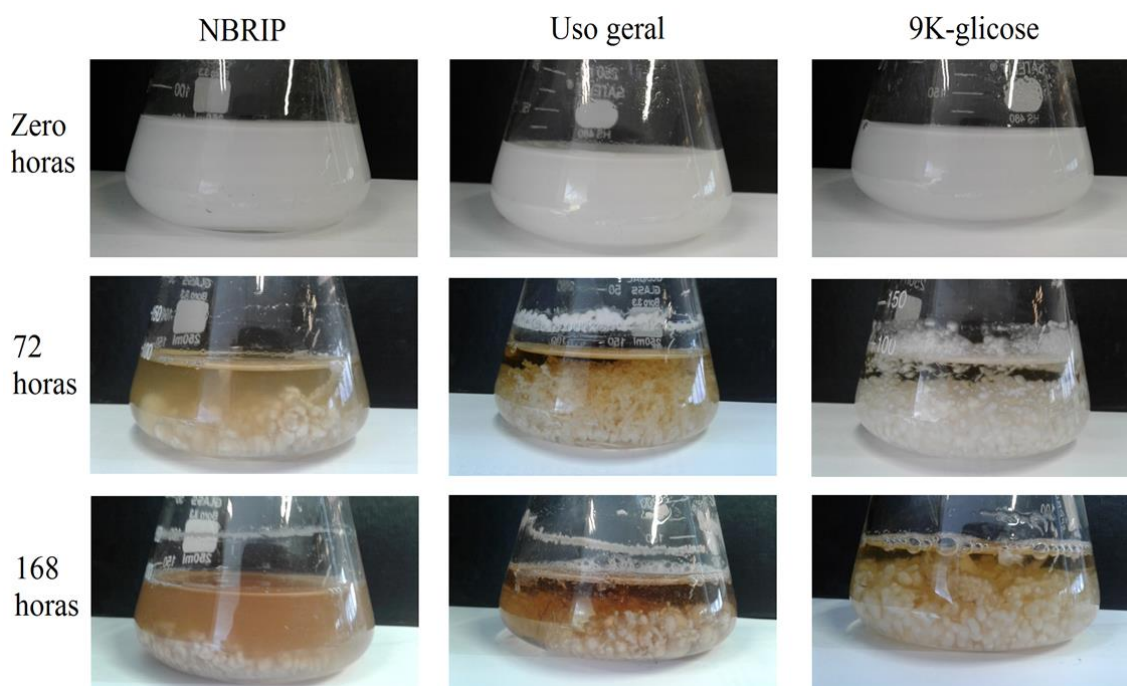


Figura 4: Perfil dos meios de cultivo (NBRIP, uso geral e 9K-glicose), submetido a três períodos de incubação (zero, 72 e 168 horas), sob temperatura de 36 ° C.

Entretanto, o meio 9K-glicose demonstrou grande afinidade de crescimento e produção de biomassa na temperatura de 36 °C, quando comparado aos outros meios de cultivo, conforme demonstrado na Figura 4. Pelo fato do meio 9K-glicose apresentar uma

condição considerável inóspita para desenvolvimento microbiano, devido se encontrar com temperatura alta e pH ácido, ficou evidente que o fungo demonstrou potencialidade satisfatória no desenvolvimento de biomassa, quando comparado aos meios NBRIP e uso geral.

Quando comparado quanto ao conteúdo da biomassa fúngica produzida entre os meios NBRIP á 29 °C e 9K-glicose á 36 °C, os mesmos meios demonstram bastante semelhantes na produção de biomassa, com maior destaque para o meio NBRIP, devido apresentar maior volume em conteúdo de biomassa fúngica, com pellets esféricos menores e mais dispersos no meio reacional, por comparação no meio 9K-glicose os pellets apresentam formato esférico de maior tamanho dispersos no meio reacional.

Foram identificados 16 ésteres metílicos de ácidos graxos nas amostras fúngicas do *Aspergillus terreus*, conforme demonstrado na Tabela 2, variando de C14:0 á C24:0, e segundo a Figura 3 o C16:0, C18:0, C18:1 cis9 e C18:2 cis9, 12, ou seja, os ácidos graxos hexadecanoico (palmítico), octadecenoico (esteárico), cis-9-octadecenoico (oleico) e cis-9,12-octadecadienoico (linoleico), respectivamente, são considerados os ésteres metílicos majoritários. Esses ésteres metílicos, no meio NBRIP á 29 °C e a 36 °C, representam 93,27% e 96,63%, respectivamente, a constituição total de ácidos graxos no fungo, agora, no meio de uso geral á 29 °C e a 36 °C, é de 96,05% e 94,49%, na devida ordem, representa o conteúdo total de ácidos graxos no fungo, já no meio 9K-glicose á 29 °C e a 36 °C, é representado por 95,97% e 95,20%, nesta ordem, a constituição total de ácidos graxos na biomassa fúngica.

O C16:0, demonstrou maior teor de ácidos graxos no meio de cultivo 9K-glicose, com valor de 18,06% de éster metílico, na temperatura de 36 °C, e o C18:0, revelou maior desempenho produtivo da ordem de 15,72% no meio NBRIP na mesma temperatura, ou seja, a 36 °C, já o C18:1 cis9 alcançou uma produtividade de 47,06% no meio 9K-glicose, na temperatura de 29 °C, enquanto que o éster metílico C18:2 cis9, 12, com valor de 33,08% no meio uso geral, na temperatura de 36 °C.

Considerando os meios de cultivos na temperatura de 29 °C, tanto o meio NBRIP, com os ésteres metílicos C18:0 e C18:2 cis9, 12, como o meio 9K-glicose com os ésteres metílicos C16:0 e C18:1 cis9 demonstraram maiores rendimentos na produção de ácidos graxos. Agora, observando os meios de cultivos na temperatura de 36 °C, o meio de uso geral obteve maior rendimento na produção de ésteres metílicos para o C16:0 e C18:2 cis9, 12, entretanto os ácidos graxos C18:0 e C18:1 cis9 revelaram maior rendimento nos meios de cultivo NBRIP e 9K-glicose, respectivamente.

Tabela 2: Conteúdo do perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos nas amostras fúngicas.

Ésteres metílicos de ácidos graxos		Conteúdo (%) $\pm$ dp					
		A1	A2	A3	B1	B2	B3
C14:0	Tetradecanoico	0,25 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,00	0,51 $\pm$ 0,09	0,25 $\pm$ 0,00
C15:0	Pentadecanoico	0,18 $\pm$ 0,00	0,25 $\pm$ 0,00	0,21 $\pm$ 0,00	0,18 $\pm$ 0,00	0,35 $\pm$ 0,06	0,26 $\pm$ 0,00
C16:0	Hexadecanoico	15,36 $\pm$ 0,18	14,04 $\pm$ 0,12	17,79 $\pm$ 0,16	16,36 $\pm$ 0,50	18,06 $\pm$ 0,85	17,76 $\pm$ 0,01
C16:1 cis7	cis-7-Hexadecenoico	0,21 $\pm$ 0,02	0,52 $\pm$ 0,01	0,82 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,00	0,95 $\pm$ 0,01	0,52 $\pm$ 0,00
C17:0	Heptadecanoico	0,51 $\pm$ 0,01	0,49 $\pm$ 0,00	0,22 $\pm$ 0,00	0,53 $\pm$ 0,00	0,33 $\pm$ 0,02	0,51 $\pm$ 0,00
C17:1 cis7	cis-7-Heptadecanoico	0,11 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,00	0,15 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,02	0,25 $\pm$ 0,01
C18:0	Octadecenoico	15,01 $\pm$ 0,33	6,92 $\pm$ 0,01	6,10 $\pm$ 0,02	15,72 $\pm$ 0,01	4,73 $\pm$ 0,24	7,12 $\pm$ 0,00
C18:1 cis9	cis-9-Octadecenoico	34,27 $\pm$ 0,58	46,85 $\pm$ 0,10	47,06 $\pm$ 0,10	35,26 $\pm$ 0,21	38,62 $\pm$ 0,29	42,74 $\pm$ 0,10
C18:2 cis9,12	cis-9,12-Octadecadienoico	28,63 $\pm$ 0,21	28,24 $\pm$ 0,01	25,02 $\pm$ 0,09	29,19 $\pm$ 0,19	33,08 $\pm$ 0,04	27,58 $\pm$ 0,03
C18:3 cis9,12,15	cis-9,12,15-Octadecatrienoico	0,18 $\pm$ 0,00	0,28 $\pm$ 0,00	0,32 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,00	1,31 $\pm$ 1,11	0,07 $\pm$ 0,00
C19:0	Nonadecanoico	2,87 $\pm$ 0,45	0,07 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,21	0,11 $\pm$ 0,04	0,06 $\pm$ 0,02	0,57 $\pm$ 0,12
C20:0	Eicosanoico	0,75 $\pm$ 0,02	0,48 $\pm$ 0,00	0,34 $\pm$ 0,00	0,77 $\pm$ 0,00	0,32 $\pm$ 0,02	0,59 $\pm$ 0,00
C20:1 cis11	cis-11-Eicosanoico	0,10 $\pm$ 0,02	0,29 $\pm$ 0,01	0,30 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,03	0,21 $\pm$ 0,00
C20:2 cis11,14	cis-11,14-Eicosanoico	0,10 $\pm$ 0,03	0,17 $\pm$ 0,00	0,21 $\pm$ 0,00	0,21 $\pm$ 0,12	0,22 $\pm$ 0,05	0,16 $\pm$ 0,00
C22:0	Docosanoico	0,40 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,06	0,42 $\pm$ 0,01
C24:0	Tetracosanoico	0,45 $\pm$ 0,01	0,65 $\pm$ 0,01	0,62 $\pm$ 0,01	0,52 $\pm$ 0,02	0,71 $\pm$ 0,18	0,98 $\pm$ 0,01
Σ SFA		35,89 $\pm$ 0,12	23,65 $\pm$ 0,02	26,27 $\pm$ 0,04	34,89 $\pm$ 0,06	25,60 $\pm$ 0,17	28,71 $\pm$ 0,01
Σ MUFA		34,58 $\pm$ 0,16	47,66 $\pm$ 0,03	48,18 $\pm$ 0,03	35,54 $\pm$ 0,06	39,80 $\pm$ 0,09	42,70 $\pm$ 0,03
Σ DUFA		28,73 $\pm$ 0,12	28,41 $\pm$ 0,01	25,23 $\pm$ 0,05	29,40 $\pm$ 0,16	33,30 $\pm$ 0,05	27,74 $\pm$ 0,02
Σ TUFA		0,18 $\pm$ 0,00	0,28 $\pm$ 0,00	0,32 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,00	1,31 $\pm$ 1,11	0,07 $\pm$ 0,00
Σ UFA		64,11 $\pm$ 0,12	76,35 $\pm$ 0,02	73,73 $\pm$ 0,03	65,11 $\pm$ 0,08	74,40 $\pm$ 0,22	71,29 $\pm$ 0,02

dp - desvio padrão; Σ – somatório; SFA – ácidos graxos saturados; MUFA – ácidos graxos monoinsaturados; DUFA – ácidos graxos di-insaturados; TUFA – ácidos graxos tri-insaturados; UFA – ácidos graxos insaturados. A1 e B1 – meio NBRIP; A2 e B2 – meio de uso geral; e A3 e B3 – meio 9K-glicose.

Ao observar a temperatura, os ésteres metílicos C16:0, C18:0 e C18:2 cis9, 12, na temperatura de 36 °C, correspondentes aos meios de uso geral, NBRIP e 9K-glicose, respectivamente, confirmam os maiores rendimentos na produção de ácidos graxos, enquanto que na temperatura de 29 °C, o C18:1 cis9 no meio 9K-glicose, foi o único que exibiu maior eficiência na produção de ácido graxo.

Fazendo uma correlação entre os meios de cultivos e as temperaturas de cultivo do fungo filamentoso, os meios NBRIP e o 9K-glicose e a temperatura de 36 °C foram as condições ideais de maior rendimento na produção de ésteres metílicos de ácidos graxos. Dentre os dois meios de cultivos, o meio 9K-glicose foi aquele que melhor desempenhou com maior eficiência na produção de ácidos graxos, revelando que na condição ácida de $4,5 \pm 0,2$, o fungo filamentoso desempenha maior efetividade produtiva de ácidos graxos.

As amostras fúngicas apresentaram até 1,31% de ácidos graxos tri-insaturados (TUFA) e ausência de poli-insaturados (PUFA), o que são valores inferiores ao descrito na norma europeia EN 14214, que qualifica o teor de FAME para o biodiesel, o qual defini o limite máximo de 12% para TUFA e 1% para PUFA (EUROPEAN UNION, 2010). Tal determinação é justificada pelo fato dos tais ácidos graxos insaturados classificados como TUFA e PUFA proporcionarem baixa estabilidade oxidativa ao biocombustível, apesar de melhorarem as propriedades de escoamento (Knothe, 2005). Enquanto que os SFA apresentam ótimas propriedades de combustão, mas podem causar problemas de escoamento a frio (Jeong et al., 2008). Diante disso, é perceptível que as amostras fúngicas estudadas aparentam ter grande potencial como biomassa para serem usadas como matéria-prima para produção de biodiesel.

A avaliação de FAME revelou que as amostras do *Aspergillus terreus* apresentaram maiores teores de ácidos graxos insaturados (64,11 a 76,35%) a 29 °C e (65,11 a 74,40%) a 36 °C do que saturados (23,65 a 35,89%) a 29 °C e (25,60 a 34,89%) a 36 °C. Dentre os meios de cultivo empregados no estudo, o meio NBRIP revelou tanto na temperatura de 29 °C como a 36 °C, grande potencial na produção de ácidos graxos saturados, alcançando valores de 35,89 e 34,89%, respectivamente. Os ácidos graxos palmítico (C16:0) e esteárico (18:0) surgiram como os principais ácidos graxos saturados na biomassa fúngica no meio NBRIP na temperatura de 29 °C, compondo valores de 15,36 e 15,01%, respectivamente cada, revelando como possível biomassa e condições físicas e químicas com capacidade na produção de biodiesel.

4 CONCLUSÕES

A biomassa de *Aspergillus terreus* demonstrou ser uma fonte promissora na produção de ácidos graxos saturados em meio NBRIP, quando observado o perfil de FAME tanto na temperatura de 29 °C como na de 36 °C, sendo neste último observado um pequeno percentual a mais de SFA. O pH baixo, ou seja, o meio ácido demonstrou ser um fator preponderante de eficácia na produção de compostos ácidos, como os ácidos graxos, produto da conversão do triacilglicerideo em metil ésteres de ácidos graxos, por meio do sistema enzimático de lipases para produção de biodiesel, condição que também revelou ser de extrema importância para o desenvolvimento e perpetuação da espécie fúngica, mesmo que sendo em ambiente adverso. Assim, mesmo que não tenhamos atualmente qualquer processo industrial de otimização e produção de biomassa fúngica capaz de produzir biodiesel de seu conteúdo de FAME, ainda é possível produzir tal biocombustível de interesse e talvez em quantidades semelhantes ou mesmo maiores que as fontes convencionais. Isso nos traz a luz do conhecimento na realização de estudos almejando a produção de ácidos graxos saturados na produção de biodiesel.

REFERÊNCIAS

- Aguilera, A.; González-Toril, E. Eukaryotic life in extreme environments: Acidophilic fungi. *Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance*, 2019, *chapter 2*, 21-38.
- Bholay A.D., Barbosa S., Jadhav K. In vitro cultivation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and its biological efficacy. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2018, 7, 931-941.
- D'alessandro, E. B.; Soares, A. T.; Pereira, J.; Antoniosi Filho, N. R. Viability of biodiesel production from a thermophilic microalga in conventional and alternative culture media. *Brazilian Journal of Botany*, 2018, 41, 319–327.
- EUROPEAN UNION. EN 14214 (2010) Automotive fuels - Fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines - Requirements and test methods. In: European Committee For Standardization.
- Hartman, L.; Lago, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab Pract*, 1973, 22, 475–476.
- Hassan, N.; Rafiq, M.; Rehman, M.; Sajjad, W.; Hasan, F.; Abdullah, S. Fungi in acidic fire: A potential source of industrially important enzymes. *Fungal Biology Reviews*, 2019, 33, 58-71.

- Jeong, G.-T.; Jae-Hee, P.; Seok-Hwan, P.; Don-Hee, P. Estimating and improving cold filter plugging points by blending biodiesels with different fatty acid contents. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2008, 13, 505–510.
- Knothe, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Processing Technology*, 2005, 86, 1059–1070.
- Maron, P. A.; Sarr, A.; Kaisermann, A.; Lévêque, J.; Mathieu, O.; Guigue, J.; Karimi, B.; Bernard, L.; Dequiedt, S.; Terrat, S.; Chabbi, A.; Ranjard, L. High microbial diversity promotes soil ecosystem functioning. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84, 1-12.
- Martín, J. F.; Van den Berg, M. A.; Ver Loren van Themaat, E.; Liras, P. Sensing and transduction of nutritional and chemical signals in filamentous fungi: Impact on cell development and secondary metabolites biosynthesis. *Biotechnology Advances*, 2019, 37, 1-15, 2019.
- Meena, H.; Siddhardha, B. Global scenario of fungal white biotechnology: past, present, and future. Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi, 2019, *chapter 17*, 537-559.
- Menezes, R. S.; Leles, M. I. G.; Soares, A. T.; Brandão e Melo Franco, P. I.; Antoniosi Filho, N. R.; Sant'Anna, C. L.; Vieira, A. A. H. Evaluation of the potentiality of freshwater microalgae as a source of raw material for biodiesel production. *Química Nova*, 2013, 36, 10–15.
- Sitepu, E. K.; Jones, D. B.; Zhang, Z.; Tang, Y.; Leterme, S. C.; Heimann, K.; Raston, C. L.; Zhang, W. Turbo thin film continuous flow production of biodiesel from fungal biomass. *Bioresource Technology*, 2019, 273, 431-438.
- Soares, A. T.; da Costa, D. C.; Silva, B. F.; Lopez, R. G.; Derner, R. B.; Antoniosi Filho, N. R. Comparative analysis of the fatty acid composition of microalgae obtained by different oil extraction methods and direct biomass transesterification. *BioEnergy Research*, 2014, 7, 1035-1044.
- Tonato, D.; Marcuz, C.; Vendruscolo, R.G.; Bevilacqua, C.; Jacques, R.J.S.; Wagner, R.; Kuhn, R.C.; Mazutti, M.A. Production of polyunsaturated fatty acids by microorganisms isolated in the brazilian pampa biome. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2018, 35, 835-846.
- Velez, P.; Ojeda, M.; Espinosa-Asuar, L.; Pérez, T. M. Experimental and molecular approximation to microbial niche: trophic interactions between oribatid mites and microfungi in an oligotrophic freshwater system. *PeerJ*, 2018, 6, e5200.

Walker, G. M.; White, N. A. Introduction to fungal physiology. In: *Fungi: Biology and Applications* (Kevin Kavanagh, Ed., 3^a edition), p. 1-15, *John Wiley & Sons Publishers* (2018), doi: 10.1002/9781119374312

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A tecnologia de biossolubilização, já conhecida no ramo da ciência, demonstrou neste estudo ser uma tecnologia bastante eficaz em seus efeitos na solubilização do fósforo inorgânico e insolúvel. O referido trabalho traz a luz do conhecimento que o *Aspergillus terreus*, isolado a partir do rejeito de minério de ferro, apresentou por meio dos atributos físicos e químicos apresentados neste estudo reais possibilidades de aplicabilidade da solubilidade do componente elementar fósforo tanto em meio conhecido de fósforo, como fosfato de cálcio, $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$, como em meio contendo o próprio rejeito de minério de ferro. Não foram encontrados estudos na literatura que demonstram o *A. terreus* como biomassa capaz de solubilizar fósforo, e por isso, sendo este o primeiro trabalho original relatado com atividade inovadora de biossolubilização de fósforo em rejeito de minério. A biossolubilização, revelou ser uma importante ferramenta em nossas mãos, uma excelente tecnologia e sugestiva em sua aplicação, constituindo numa alternativa para redução de custos de produção e estabelecimento de uma condição de sustentabilidade do sistema de mineração, contribuindo numa melhor qualidade do minério de ferro e numa provável utilização do fósforo solúvel, como por exemplo, na produção de fertilizantes fosfatados. É sugestivo que outros trabalhos venham a ser realizados visando a remoção e ou utilização do fósforo contido no meio reacional, na aplicação de diferentes biotecnologias, como exemplo, na biofertilização.

O *A. terreus* demonstrou ser uma ótima biomassa na obtenção de ácidos graxos saturados, SFA, já que apresentam ótimas propriedades de combustão, sendo uma importante biomassa promissora na produção biodiesel, uma vez que o mesmo apresentou baixo teor de TUFA, 1,31%, e ausência de PUFA, quando comparado com a norma europeia EN 14214, que define como limite máximo de TUFA em 12% e PUFA em 1%, já que os mesmos proporcionam baixa estabilidade oxidativa ao biocombustível.

Foi realizado um estudo de viabilidade celular do *Acutodesmus obliquus*, visando conhecer a maior condição de conservação da microalga, seja ela por refrigeração, congelamento ou congelamento com uso de substâncias crioprotetoras, como o DMSO, Gli e Poli. A conservação por resfriamento e congelamento com substâncias crioprotetoras do *A. obliquus* demonstraram satisfatoriamente eficiente, sendo evidente a possibilidade a conservação por esses métodos por tempo prolongado. Este estudo seria uma continuação do trabalho de solubilização de fósforo do rejeito de minério de ferro pelo *A. terreus*, com o comprometimento do tempo das atividades

laboratoriais no ano de 2020, não foi possível dar sequência na remoção do fósforo solubilizado pelo *A. obliquus*, como possível utilização como biofertilizante.

6 APÊNDICE

APÊNDICE 1

ARTIGO 5

Título: Estudo de viabilidade celular do *Acutodesmus obliquus*

Autores: Glalber Luiz da Rocha Ferreira^{1*}, José Daniel Gonçalves Vieira¹

¹Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Universidade Federal de Goiás. Cep 74605-050, Goiânia, GO, Brasil.

*e-mail: glalberocha@gmail.com

e-mail: jdgvieira62@gmail.com

ESTUDO DE VIABILIDADE CELULAR DO *Acutodesmus obliquus***RESUMO**

O desenvolvimento e validação de métodos eficientes de conservação de microalgas é essencial para o estabelecimento e constituição de coleções de culturas de longo prazo, assim como também na programação para melhoramento e possível modificação genética de algas. Entretanto, cada espécie de microalga demonstra repostas consideradas imprevisíveis, e assim, dificultando a padronização de métodos universais até o momento. Os resultados apresentados neste estudo indicam o tempo como fator limitante para conservação do *A. obliquus*, nos métodos de conservação por refrigeração, congelamento e congelamento com uso de crioprotetores, como DMSO, Gli e Poli. O congelamento com uso de substâncias crioprotetoras demonstraram satisfatória eficiência na conservação da microalga, e assim, como também de forma surpreendente na conservação por refrigeração. Como já sabido, a conservação por somente congelamento demonstrou baixa eficiência, uma vez que é causada a ruptura das células pela formação de cristais de gelo em seu interior, e assim, inviabilizando a conservação da microalga de forma mais prolongada. O estudo evidenciou com eficácia a conservação do *A. obliquus* por refrigeração e por congelamento com o uso de substâncias crioprotetoras citadas neste trabalho.

Palavras-chaves: *Acutodesmus obliquus*, Viabilidade celular, Congelamento, Resfriamento, Substâncias crioprotetoras.

1 INTRODUÇÃO

As microalgas são seres muito diversos presentes em sistemas aquáticos, são considerados seres fotoautotróficos, ou seja, possuem a capacidade de sintetizar seus próprios nutrientes com alta eficiência fotossintética, os quais são constituídos por importantes fontes de lipídios, hidrocarbonetos e outros óleos, destinados à produção de biocombustíveis (Choi et al., 2019; Preisig e Andersen, 2005). Além disso, as microalgas fazem uso de nutrientes, dióxido de carbono e de agentes fotossintéticos para crescerem e se multiplicarem (Selvan et al., 2019; West, 2005). À vista disso, as microalgas são classificadas em grandes grupos e diversidade de características estruturais, podendo se reproduzir e sobreviver em condições adversas (Branco et al., 2019).

Dentre as microalgas existentes se destaca a *Acutodesmus obliquus* (*A. obliquus*), também conhecida como *Tetradismus obliquus*, conforme classificado no Algaebase e definido por Hegewald e Hanagata (2000). A parede celular do *A. obliquus* é constituída por duas camadas principais, sendo a camada interna composta principalmente de polissacarídeos como a celulose, e a camada externa representada por uma estrutura trilaminar composta de algaenan, um biopolímero altamente resistente que atua como uma barreira para a recuperação de componentes intracelulares (Choi et al., 2019; Wynne e Hallan, 2015).

A constituição celular da *A. obliquus* segundo D'Alessandro (2018), a microalga é capaz de produzir ácidos graxos que variam de C14:0 a C22:0, sendo C16:0 e C18:1 os majoritários, tal como também observado em outros trabalhos como Aslani et al. (2018) e Soares et al. (2014), sendo o mesmo considerado uma biomassa com grande potencial na produção de biocombustíveis, como é verificado nos estudos de Selvan et al. (2019), com a produção de 98,74% de biodiesel e 96,83% de bioetanol. Além da produção de biocombustíveis com a utilização de diferentes biomassas de microalgas, são diversos os estudos também aplicados as microalgas na produção de pigmentos, como a luteína, astaxantina, ficobilinas, clorofilas e carotenoides, com alto valor comercial e potencial apoio econômico na produção de biodiesel (D'Alessandro et al., 2019; D'Alessandro e Antoniosi Filho, 2016).

A biomassa de microalgas pode ser efetivamente preservada através do armazenamento, entretanto, são poucos os estudos que apresentam técnicas de viabilidade celular quando a biomassa é refrigerada, ou mesmo, congelada a longos períodos de tempo. O método de congelamento se torna inviável principalmente devido à formação

de cristais de gelo, sendo responsáveis pela expansão celular, causando o rompimento da parede celular (Hanashiro et al., 2019; Umamaheswari e Shanthakumar 2016).

Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar a viabilidade celular do *A. obliquus* em diferentes condições de armazenamento, como resfriamento, congelamento e congelamento acrescido com diferentes agentes crioprotetores, e assim, conhecendo o tempo limite de armazenamento com permanência de células-viáveis em meio de cultivo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparo do meio BBM

Para o cultivo do *Acutodesmus obliquus* foi utilizado o meio de cultivo líquido BBM, proposto por Andersen et al. (2005), e apresentado pela Tabela 1.

2.2 Estudo da viabilidade celular do *Acutodesmus obliquus*

Foram preparados 105 tubos de ensaio contendo 5mL do meio BBM, sendo realizado em triplicata, e programado para 6 meses nas seguintes condições de armazenamento: 1. biomassa refrigerada; 2. Biomassa congelada + DMSO (dimetilsulfóxido); 3. Biomassa congelada + Gli (glicerol); 4. Biomassa congelada + Poli (polietilenoglicol); e 5. biomassa congelada.

Em cada tubo de ensaio foi inoculado o *A. obliquus*, e posta para crescimento em incubadora sob iluminação por lâmpadas fluorescentes brancas de 16 W, com fotoperíodo de 24 horas, e temperatura de 29 °C, por um período de 21 dias. Posteriormente, a biomassa da microalga foi concentrada, retirando o sobrenadante. Para a preservação com utilização de crioprotetores, a biomassa foi transferida para eppendorf e acrescido com as soluções crioprotetoras DMSO, Gli e Poli, na concentração de 10%, e ocupando um volume máximo de 1,5 mL, enquanto que nas condições de apenas refrigeração e congelamento, foi adicionado somente o meio BBM, e em seguida sendo armazenadas. As amostras que serão congeladas ficarão armazenadas na temperatura de -18 °C, aproximadamente, já as amostras que serão refrigeradas ficarão armazenadas na temperatura de 4 °C, aproximadamente. Foram retiradas amostras em triplicata nos períodos de tempo zero, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias para condução do estudo de viabilidade celular.

O estudo de viabilidade celular foi conduzido com a utilização da câmara de Neubauer para realização da contagem de células viáveis e não-viáveis. Antemão, foram retiradas as amostras e condicionadas a temperatura ambiente, e em seguida a amostra foi centrifugada a 10.000 RCF durante 1 minuto. Em seguida, a solução sobrenadante foi retirada e adicionado 1,5 mL de meio BBM. As amostras foram conduzidas ao vortex e

agitadas a 1.500 rpm durante 1 minuto. Logo após, foi adicionado a cada amostra 10 µL do corante vermelho neutro 10%, e deixou descansar por 30 minutos em câmara escura. Com a lamínula posta na câmara de Neubauer, foram coletados 500 µL do meio contendo a biomassa da microalga com o corante vermelho neutro e transferida pela borda da lamínula, preenchendo cuidadosamente a câmara de contagem, e aguardando por 2 minutos para sedimentação.

A contagem das células viáveis e não-viáveis foi realizada observando as quatro áreas da câmara de contagem por meio do microscópio fluorescente. O cálculo para obtenção do número de células mL⁻¹, foi realizada utilizando a seguinte equação:

$$n^{\circ} \text{ de células mL}^{-1} = \frac{N1}{N2} \times fd \times 10.000 \quad \text{Equação 1}$$

O *N1* corresponde ao número total de células contadas nas quatro áreas da câmara de contagem, já o *N2* confere o número de quadrantes contados. O *fd* representa o fator de diluição, que neste caso equivale a 1, isso pelo fato de não ter sido necessário fazer diluição.

2.3 Cálculo da porcentagem de células viáveis

O cálculo da porcentagem de células viáveis foi determinado com a aplicação da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Células viáveis} = \frac{(CtMt - CvMv)}{CtMt} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde, *Ct* representa a concentração total de células na suspensão original de células, *Mt* consiste no fator de multiplicação usado para a contagem total de células (fator de diluição para leitura em microscópio = 10), *Cv* indica a concentração de células não-viáveis, e o *Mv* consiste no fator de multiplicação usado para a contagem de células não-viáveis (fator de diluição para leitura em microscópio = 10).

2.4 Velocidade da inviabilidade celular

O cálculo para a determinação da velocidade do desenvolvimento de formação de células não-viáveis da microalga *A. obliquus* foi realizado após aplicação da linha de tendência polinomial, e obtenção da equação de velocidade e do coeficiente de determinação.

Tabela 1: Composição do meio BBM.

Componentes	Solução estoque (g L ⁻¹ dH ₂ O)	Quantidade utilizada (mL)	Concentração do meio no final
Macronutrientes			
NaNO ₃	25,00	10	2,94 x 10 ⁻³
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,50	10	1,70 x 10 ⁻⁴
MgSO ₄ .7H ₂ O	7,50	10	3,94 x 10 ⁻⁴
K ₂ HPO ₄	7,50	10	4,31 x 10 ⁻⁴
KH ₂ PO ₄	17,50	10	1,29 x 10 ⁻³
NaCl	2,50	10	4,28 x 10 ⁻⁴
Solução Alcalina de EDTA		1	
EDTA	50,00		1,71 x 10 ⁻⁴
KOH	31,00		5,53 x 10 ⁻⁴
Solução de Ferro Acidificada		1	
FeSO ₄ .7H ₂ O	4,98		1,79 x 10 ⁻⁵
H ₂ SO ₄		1	
Solução de Boro		1	
H ₃ BO ₃	11,42		1,85 x 10 ⁻⁴
Solução de Metais Traço		1	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,82		3,07 x 10 ⁻⁵
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,44		7,28 x 10 ⁻⁶
MoO ₃	0,71		4,93 x 10 ⁻⁶
CuSO ₄ .5H ₂ O	1,57		6,29 x 10 ⁻⁶
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,49		1,68 x 10 ⁻⁶

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo Lourenço (2006), a biomassa microalgácea concentrada não precisa necessariamente ser aproveitada imediatamente após sua coleta, mais pode ser preservada durante algum tempo antes de sua utilização, por meio de procedimentos como a refrigeração e congelamento com o uso de substâncias crioprotetoras.

Tabela 2: Porcentual quantitativo de células não-viáveis por período de tempo em dias para cada tipo de armazenamento:

Condição das células	Porcentual de células não-viáveis/dia $\pm$ dp						
	0	30	60	90	120	150	180
Biomassa refrigerada	0,00	47,93 $\pm$ 0,34	63,35 $\pm$ 0,45	73,98 $\pm$ 0,27	85,16 $\pm$ 0,18	93,02 $\pm$ 0,29	98,63 $\pm$ 0,12
Biomassa congelada + DMSO	0,00	38,94 $\pm$ 0,72	57,04 $\pm$ 0,51	70,51 $\pm$ 0,56	84,97 $\pm$ 0,39	93,50 $\pm$ 0,32	97,01 $\pm$ 0,26
Biomassa congelada + Gli	0,00	44,86 $\pm$ 0,31	61,78 $\pm$ 0,21	69,61 $\pm$ 0,38	88,54 $\pm$ 0,25	95,35 $\pm$ 0,21	97,79 $\pm$ 0,18
Biomassa congelada + Poli	0,00	41,47 $\pm$ 0,24	59,98 $\pm$ 0,47	71,44 $\pm$ 0,42	89,45 $\pm$ 0,41	94,05 $\pm$ 0,19	98,75 $\pm$ 0,24
Biomassa congelada	0,00	57,25 $\pm$ 0,19	71,19 $\pm$ 0,32	92,81 $\pm$ 0,29	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00

dp: desvio-padrão.

Neste estudo foi utilizado o vermelho neutro, que é um corante catiônico considerado fraco e solúvel em água, atuando como um marcador, neste caso na identificação de células vivas do *A. obliquus*. Este corante permeia a membrana plasmática da célula que se encontra intacta e se concentra exatamente no citoplasma e/ou nos vacúolos das células viáveis da microalga, tonalizando-a na cor vermelha. Entretanto, as células da microalga que de alguma forma sofreu danificação, ou seja, não se encontram viáveis, durante os métodos de conservação, a incorporação do corante pela membrana citoplasmática é inibida, sendo a microalga declarada com inviabilidade celular (Da Luz et al., 2016).

No seguinte estudo a conservação por simples congelamento, revelou baixa efetividade de viabilidade celular, o qual demonstrou expressiva diminuição de células viáveis, alcançando uma quantidade mínima de células vivas num período de tempo máximo 90 dias de conservação, sendo nos 90 dias o número de células viáveis expressivamente ínfima, tendo no máximo 7,19% de células viáveis, como apresentado na Tabela 2. Conforme Da Luz et al. (2016), no caso da conservação por simples congelamento, está técnica envolve a morte de todas ou quase todas as células em pequeno prazo de tempo, e acarreta alterações sejam elas pequenas ou nulas nas características químicas do material algáceo.

O *A. obliquus* que ficou armazenada nas condições de refrigeração, congelada + DMSO, congelada + Gli, congelada + Poli, e congelada, demonstraram acentuada redução no número de células viáveis no meio a qual ficaram conservadas, por um período máximo de 180 dias, conforme demonstrado na Tabela 2. Somente nos primeiros trinta dias foi verificada uma redução acentuada de 47, 93%, 38,94%, 44,86%, 41,47% e 57,25% de células viáveis nas amostras, respectivamente, e ocorrendo de forma progressiva nos 150 dias restantes de conservamento, sendo menos impactante que nos primeiros 30 dias.

Conforme Da Luz et al. (2016), raramente no método de congelamento é utilizado cultura microalgácea em meio líquido, sendo as culturas concentradas previamente, caso haja grande quantidade de água entre as células, ocasionará em grandes perdas das células viáveis, e isso se deve a ruptura das células pela formação de cristais de gelo em seu interior. Entretanto, o uso de substâncias crioprotetoras corroboram na promoção da viabilidade celular, agindo tanto de forma extracelular como intracelular, por exemplo, como no caso das substâncias glicoprotetoras que são agentes permeáveis, como o dimetilsulfóxido (DMSO) e o glicerol (Gli), tem a função de interromper a

formação de cristais de gelo intracelular, enquanto que o polietilenoglicol (Poli), que é um agente não permeável, induz a desidratação celular, promovendo o efluxo de água intracelular (Fernandes et al., 2019).

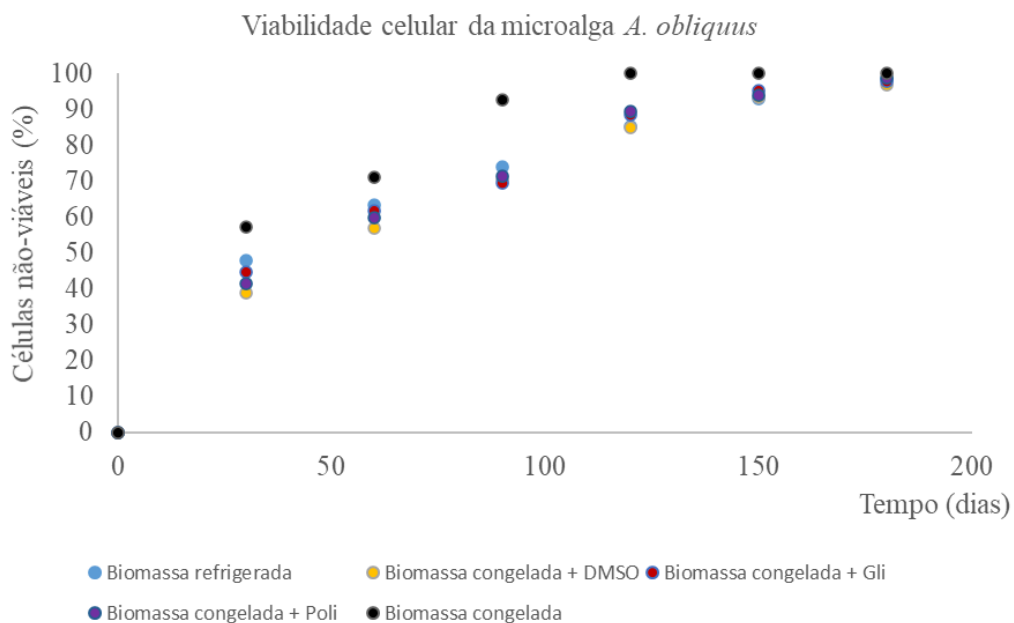


Figura 1: Representação da porcentagem de células viáveis em relação ao tempo.

A conservação por congelamento com o incremento de substâncias crioprotetoras como dimetilsulfóxido, glicerol e polietilenoglicol, utilizados neste estudo, mediante a aplicações de protocolos rigorosos, contribuem no aumento significativo na porcentagem de células vivas durante o período de congelamento, como observado na Tabela 2, em comparação a conservação por simples congelamento. A conservação por simples congelamento demonstrou uma grande queda no número de células vivas, tendo uma duração de 90 dias com presença de células do *A. obliquus* viva, enquanto que com o uso de crioprotetores houve uma sobrevivência de 100% a mais que por somente congelamento, tendo uma duração máxima de 180 dias com presença de células vivas da microalga.

Como apresentado na Figura 1, o *A. obliquus* congelada em meio contido com o crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO), revelou dentre as substâncias crioprotetoras utilizadas neste estudo ser a melhor substância crioprotetora como forma de conservação sob congelamento, ocorrendo de forma mais lenta a diminuição de células viáveis, e em consecutivo, num menor teor de células não-viáveis durante o congelamento. A amostra que foi refrigerada, mostrou-se ser uma alternativa, uma vez que apresentou baixa redução ao longo dos 180 dias, sendo semelhante as amostras que apresentavam o uso de crioprotetores durante a conservação.

Tabela 3: Verificação da velocidade de inviabilidade celular e das equações de velocidade de inviabilidade celular por tipo de armazenamento.

Condição das células	Velocidade de inviabilidade celular (% dia ⁻¹)						Equação da velocidade de inviabilidade celular	R ²
	30	60	90	120	150	180		
Biomassa refrigerada	1,60	1,06	0,82	0,71	0,62	0,55	$V_{cnv} = 6E-05t^2 + 0,0187t + 2,053$	0,9767
Biomassa congelada + DMSO	1,30	0,95	0,78	0,71	0,62	0,54	$V_{cnv} = 3E-05t^2 + 0,0116t + 1,581$	0,9770
Biomassa congelada + Gli	1,50	1,03	0,77	0,74	0,64	0,54	$V_{cnv} = 5E-05t^2 + 0,0161t + 1,885$	0,9622
Biomassa congelada + Poli	1,38	1,00	0,79	0,75	0,63	0,55	$V_{cnv} = 4E-05t^2 + 0,0128t + 1,690$	0,9716
Biomassa congelada	1,91	1,19	1,03	0,83	0,66	0,55	$V_{cnv} = 6E-05t^2 + 0,0207t + 2,389$	0,9625

A conservação por resfriamento demonstrou ser bastante efetiva em relação ao método de conservação por congelamento com o uso de substâncias crioprotetoras, apesar de ser considerado por Lourenço (2006), uma forma de conservação de curto período de vida útil para biomassas algáceas. A temperatura de 4 °C, empregada neste estudo demonstrou ser suficiente para retardar eventuais processos de deterioração da biomassa do *A. obliquus*, como demonstrado pela Tabela 2.

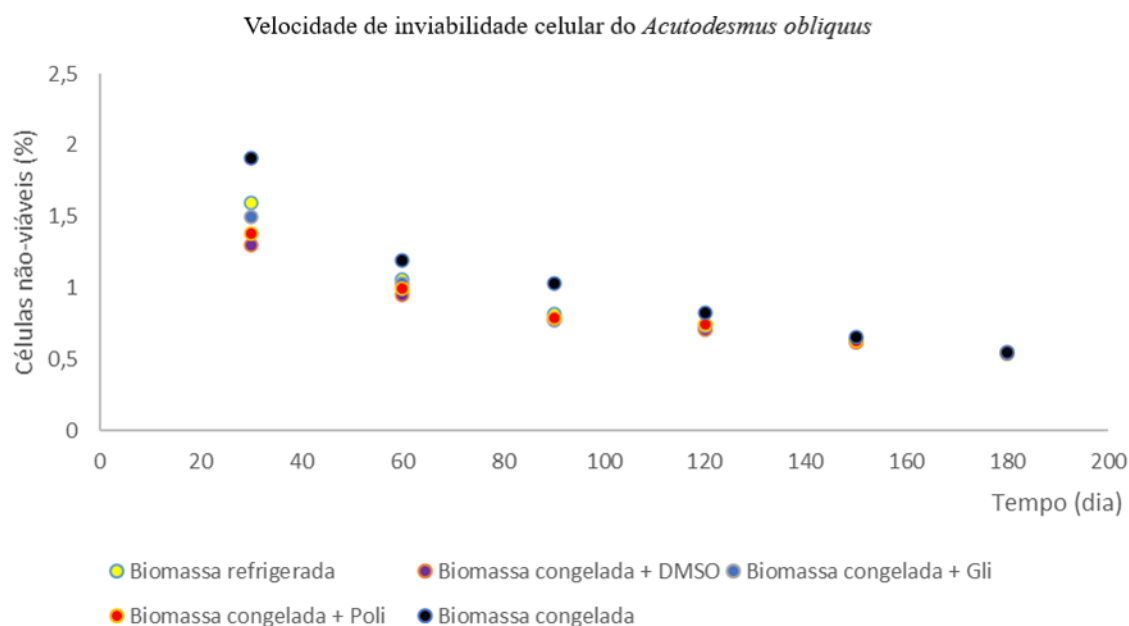


Figura 2: Representação da velocidade de inviabilidade celular do *A. obliquus* em relação ao tempo.

A Tabela 3 evidencia exatamente o que é verificado na Tabela 2, o qual é observado um aumento significativo na velocidade de inviabilidade das células do *A. obliquus* nos primeiros trinta dias, atingindo valores 1,60%, 1,30%, 1,50%, 1,38% e 1,91% para a biomassa refrigerada, congelada + DMSO, congelada + Gli, congelada + Poli e congelada, respectivamente. A velocidade de inviabilidade celular é mais evidente quando a biomassa é somente congelada, tendo um significativo número de morte de células da microalga.

É expressivo o quantitativo crescente de células não-viáveis demonstrada pela Figura 1, assim como, em contrapartida no quantitativo decrescente da velocidade de inviabilidade celular do *A. obliquus*, representada pela Figura 2, quanto ao período de 180 dias de conservação. Tanto a Figura 1 como a Figura 2, revelam que no caso da microalga, o tempo é um fator limitante quanto a conservação por refrigeração ou congelamento, mesmo com o uso de crioprotetores, sendo muito mais evidente principalmente no método por simples congelamento. O uso de substâncias crioprotetoras demonstrou ser

uma metodologia bastante eficiente. A conservação por simples resfriamento com a biomassa concentrada revelou-se de forma muito surpreendente ser uma metodologia equiparável com a metodologia de aplicação em congelamento com o uso de crioprotetores DMSO, Gli e Poli. É observável também por meio da Tabela 3, uma semelhança muito próxima após os 30 dias de conservação a velocidade decrescente de inviabilidade celular da microalga entre os métodos de refrigeração e congelamento com os crioprotetores.

Como verificado, o tempo demonstrou-se ser um fator limitante para a conservação da microalga, assim como também podemos citar a temperatura, a concentração de biomassa e o uso de substâncias crioprotetoras. A Tabela 3 revela exatamente a diminuição significativa nos primeiros 30 dias da velocidade de inviabilidade celular da microalga, e posteriormente, uma diminuição menos progressiva da velocidade de inviabilidade celular, sendo mais expressiva para as amostras que foram somente congeladas. Tanto as amostras que foram refrigeradas e congeladas juntamente com os crioprotetores demonstraram semelhança na queda da velocidade de inviabilidade celular. Por meio dos valores de velocidade de inviabilidade celular foi possível descrever as equações de velocidade de inviabilidade celular de cada método de conservação em razão do tempo como fator limitante, como apresentado na Tabela 3. Assim como também foi possível obter o coeficiente de determinação (r^2), visando aferir o grau de ajuste da equação de velocidade de inviabilidade celular da microalga a partir dos dados das variáveis tempo e velocidade de inviabilidade celular.

4 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo indicam que o fator tempo também pode ser considerado determinante para vida útil das microalgas, neste caso para o *A. obliquus*, além da temperatura, concentração de biomassa e uso de substâncias crioprotetoras para uma conservação bem-sucedida. O uso de substâncias crioprotetoras realmente demonstrou-se eficaz na preservação da microalga, assim como também, de forma surpreendente a refrigeração quando adotados protocolos rígidos metodológicos de procedimentos para manipulação e conservação da biomassa microalgácea. O seguinte estudo revelou que o *A. obliquus* pode ser conservada relativamente por um período mais longo que por simples congelamento quando aplicado a refrigeração ou mesmo quando realizado o congelamento com o uso de substâncias crioprotetoras como o DMSO, Gli ou Poli.

REFERÊNCIAS

- Andersen R.A., Berges F.A., Harrison P.F., Watanabe M.M. Algal Culturing Techniques: Appendix A. Recipes for freshwater and seawater media. Andersen R.A., Elsevier Academic Press, p. 429-538, 2005.
- Aslani A., Mohammadi M., Gonzalez M.J.I., Sobczuk T.M., Nazari M., Bakhtiar A. Evaluation of the potentials and feasibility of microalgae production in Iran. Bioresource Technology Reports, v. 1, p. 24-30, 2018.
- Branco K.B.Z.F., Balmant W., Trevisan E., Taher D.M., Mariano A.B., Arroyo P.A. Phenomenological modeling of *Acutodesmus obliquus* microalgae in situ transesterification. Biochemical Engineering Journal, p.1-37, 2019.
- Choi W.J., Chae A.N., Song K.G., Park J., Lee B.C. Effect of trophic conditions on microalga growth, nutrient removal, algal organic matter, and energy storage products in *Scenedesmus (Acutodesmus) obliquus* KGE-17 cultivation. Bioprocess and Biosystems Engineering, p.1-10, 2019.
- Da Luz, D.S.; Da Silva, D.G.; Souza, M.M.; Giroldo, D.; Martins, C.M.G. Efficiency of neutral red, evans blue and MTT to assess viability of the freshwater microalgae *Desmodesmus communis* and *Pediastrum boryanum*. Phycological Research, v. 64, p. 56-60, 2016.
- D'Alessandro E.B., Antoniosi Filho N.R. Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 18, p. 832-841, 2016.
- D'Alessandro E.B., Soares A.T., Pereira J., Antoniosi Filho, N.R. Viability of biodiesel production from a thermophilic microalga in conventional and alternative culture media. Brazilian Journal of Botany, v. 41, p. 319-327, 2018.
- D'Alessandro E.B., Soares A.T., D'Alessandro N.C.O., Antoniosi Filho N.R. Potential use of a thermal water cyanobacterium as raw material to produce biodiesel and pigments. Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 42, p. 2015-2022, 2019.
- Fernades, M.S.; Calsing L.C.G.; Nascimento, R.C.; Santana, H.; Morais, P.B.; Capdeville, G.; Brasil, B.S.A.F. Customized cryopreservation protocols for chlorophyles based on cell morphology. Algal Research, v. 38, p. 1-9, 2019.
- Hanashiro R.H.R., Stoco C.B., Oliveira T.V., Lenzi M.K., Mariano A.B., Vieira R.B. Experimental validation of hindered settling models and flux theory applied in continuous flow process for harvesting *Acutodesmus obliquus*. The Canadian Journal of Chemical Engineering, v. 97, p. 1903-1912, 2019.

- Hegewald E., Hanagata N. Phylogenetic studies on Scenedesmaceae (Chlorophyta). Archiv für Hydrobiologie, suppl. 136, Algological Studies, v. 100, p. 29-49, 2000.
- Lourenço, S.O. *Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações*. São Carlos: RiMa, 2006, 606 p.
- Preisig H.R., Andersen R.A. (2005) Algal Culturing Techniques: Historical review of algal culturing techniques. Andersen R.A., Elsevier Academic Press, p. 1-12, 2005.
- Selvan S.T., Govindasamy B., Muthusamy S., Ramamurthy D. Exploration of green integrated approach for effluent treatment through mass culture and biofuel production from unicellular alga, *Acustodesmus obliquus* RDS01. International Journal of Phytoremediation, v. 21, n. 3, p. 1-19, 2019.
- Soares A.T., da Costa, D.C., Silva B.F., Lopes R.G., Derner R.B., Antoniosi Filho N.R. Comparative analysis of the fatty acid composition of microalgae obtained by different oil extraction methods and direct biomass transesterification. BioEnergy Research, v. 7, p. 1035-1044, 2014.
- Umamaheswari J., Shanthakumar S. Efficacy of microalgae for industrial wastewater treatment: a review on operating conditions, treatment efficiency and biomass productivity. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, v.15, p. 265-284, 2016.
- West J.A. (2005) Algal Culturing Techniques: Historical review of algal culturing techniques. Andersen R.A. Elsevier Academic Press, p. 165-188, 2005.
- Wynne M.J., Hallan J.K. Reinstatement of *Tetrademus* G. M. Smith (Sphaeropleales, Chlorophyta). Feddes Repertorium, v. 126, p. 83-86, 2015.

APÊNDICE 2

ARTICLE 1

Title: Phosphorus Biosolubilization by Micro Organisms

Authors: Glalber Luiz da Rocha Ferreira^{1*}, Nelson Roberto Antoniosi Filho², José Daniel Gonçalves Vieira²

¹Laboratory of Environmental Microbiology and Biotechnology. Institute of Tropical Pathology and Public Health. Federal University of Goiás. Cep 74605-050, Goiânia, GO, Brazil.

*e-mail: glalberocha@gmail.com

e-mail: jdgvieira62@gmail.com

²Institute of Chemistry, Laboratory of Extraction and Separation Methods. Federal University of Goiás. Campus Samambaia, CEP 74690-900, Goiânia, Goiás, Brazil.

e-mail: nlliantoniosi@gmail.com

Published in Revista: Journal of Earth and Environmental Sciences Research

Publication date: 28/11/2020

Review Article

Open Access

Phosphorus Biosolubilization by Micro-Organisms

Glaber Luiz da Rocha Ferreira^{1*}, José Daniel Gonçalves Vieira² and Nelson Roberto Antoniosi Filho³

¹Department of Microbiology, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás-UFG. Goiânia, Goiás / Brazil. Rua Delenda Resende de Melo Left / 1. Avenida S/N Laboratory of Environmental Microbiology and Biotechnology, University Sector, CEP 74605-050.

²Department of Microbiology, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás-UFG. Goiânia, Goiás / Brazil. Rua Delenda Resende de Melo Left / 1. Avenida S/N Laboratory of Environmental Microbiology and Biotechnology, University Sector, CEP 74605-050.

³Institute of Chemistry, Laboratory of Extraction and Separation Methods. Federal University of Goiás-UFG. Goiânia, Goiás/Brazil. Campus Samambaia, CEP 74690-900.

ABSTRACT

Phosphorus (P) is one of the essential macronutrients for the growth and reproduction of plants, the main source of which is phosphate rocks (PRs). In view of the extraction process of this mineral, major environmental impacts are characterized, with the generation of solid residues that represent great economic value when using appropriate techniques for using minerals in solid residues, representing an extractive process with better efficiency and utilization of the extracted amount. There are many possible techniques applicable to a better yield in the extractive process, for example, in particular biosolubilization, which makes use of different microorganisms in the solubilization of the phosphorus element. In this review article, different microorganisms will be presented in the phosphorus solubilization, as well as the knowledge of the chemical and biological characteristics of the microorganisms in the biosolubilization process.

*Corresponding author

Glaber Luiz da Rocha Ferreira, Department of Microbiology, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás-UFG. Goiânia, Goiás / Brazil. Rua Delenda Resende de Melo Left / 1. Avenida S / N Laboratory of Environmental Microbiology and Biotechnology, University Sector, CEP 74605-050. Tel: (62)99113-9140; E-mail: glalberocha@gmail.com

Received: November 19, 2020; **Accepted:** November 25, 2020; **Published:** November 28, 2020

Keywords: Biosolubilization, Phosphorus, Microorganisms, Solubilization, Phosphate Rocks.

Introduction

Inevitably, the challenges of the environmental issue permeate all activities related to industrial processes. And that is why it is possible to affirm that mining, added to agriculture, forestry, energy production, transportation, civil construction (urbanization, roads, etc.) and basic industries (chemical and metallurgical) are considered the causes of almost all the environmental impact on Earth [1].

In highlight, the mining activity in Brazil, asserts itself with great socio-economic prominence for the country, contributing decisively to the well-being and improving the quality of life of present and future generations, which is fundamental for the development of an egalitarian society, which is through social responsibility, always considering the precepts of sustainable development. It is important to recognize and keep under control the impacts that this activity causes on the environment, and thus, providing an adequate environment for future generations [2].

According to the Mineral Yearbook of Brazil, the main substances

extracted in the Brazilian territory are: iron; limestone, titanium, phosphate / phosphate rock, aluminum (bauxite); gold; tin; copper; zirconium; niobium; kaolin; manganese; nickel and zinc [3]. Among the minerals mentioned above, phosphate rock stands out, data presented by the United States Geological Survey - USGS indicate that, in 2019, the global production of phosphate rock was 240 million tons, with China responsible for half of the production of 2019, worldwide [4].

As presented to USGS, referring to the years 1996 to 2019, corresponding to data from 24 years of phosphate rock extraction process, 129,950,000 tons of concentrated phosphate in the form of phosphorus pentoxide (P_2O_5) were produced in the mines of Brazil. As shown in Figure 1, it is possible to observe a progression in the increase in the production of P_2O_5 in mines in Brazil, and thus, accounting for a significant increase of 47.22% from 1996 to 2019, which is suggestive to an average of 5,414,610 tonnes of P_2O_5 produced in Brazil. In Figure 2, there is a clear verification of a fluctuation in the indices of P_2O_5 production capacity by reserves in Brazil, with a significant drop in the production capacity of P_2O_5 from 2016, reaching a drop of 48.48%, being this corresponding to the period from 1996 to 2019.

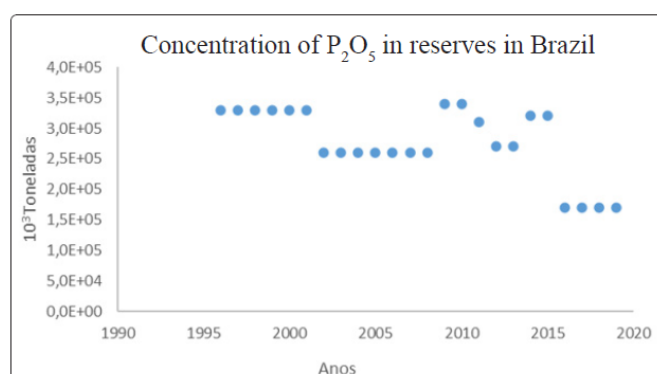


Figure 1: Graphical representation of the concentration of P₂O₅ in reserves in Brazil from the information generated from the USGS database (2020).

In Brazil, the largest deposits of phosphorus (P) are associated with alkaline-carbonatitic complexes, of igneous origin, and this is due to processes of weathering, as seen in Complexes de Salitre, in which they have a low content of P, when compared to deposits of sedimentary origin, such as marine phosphorites, and deposits associated with alkaline complexes, presenting a marked mineralogical complexity [5].

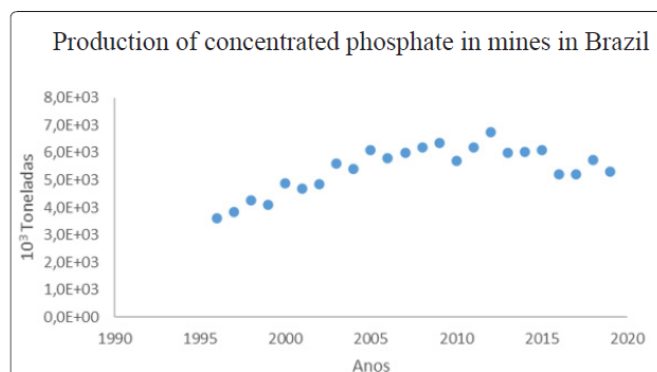


Figure 2: Graphical representation of the production of concentrated Phosphorus in mines in Brazil from information generated from the USGS database (2020).

In the various mining activities, large volumes and masses of materials are extracted and moved, causing great environmental impacts, as in the generation of solid waste, known as sterile and tailings. Sterile waste is waste generated by extraction or mining activities, in the stripping of the mine, considered as material with no economic value and is usually disposed of in piles. Waste, on the other hand, is waste resulting from the treatment and processing of mineral substances [6].

There is also another type of waste, consisting of a very diverse set of materials, such as the waste containment dam, from the operation of the extraction and processing plants for mineral substances. The amount of waste generated is always very large and depends, among other factors, on the process used to extract the ore and the location of the deposit in relation to the surface [7]. The mineral substances contained in solid waste have the potential for use in other industrial activities or in agriculture [8].

The P contained in phosphate is not considered a toxic element to the health of living beings, being, on the contrary, essential to the maintenance of life. The harmful presence of P in the environment is related to the excessive intake of water. In this case, the nutrient

can trigger processes of eutrophication, or fertilization, causing, for example, the proliferation of algae and other higher aquatic plants, the macrophytes [9]. The increase in eutrophication levels may lead to a decrease in the quantity and quality of water and a loss of the system's sustainability capacity, with a consequent increase in the level of toxicity and deterioration of human health [10]. According to the analysis of current technological expectations, the mining sector has not stood out as a sector with high standards of innovation, even if it uses high technology equipment, and for this reason, the mining industry has not been able to achieve its goal. full use of the elements of nature, and this is due to fallible methods of the mining process [11]. In view of this situation, it is necessary for the mining companies to face the search for new challenges in the search for innovative behavior, given the market pressures, and thus, needing new technologies that are more productive, with less losses in the extraction process and productive and at the same time are less expensive than current technologies [12].

In view of this, several techniques, being physical, chemical and biological, have been developed for the solubility of toxic elements and mineral metals. Therefore, the solubility of phosphorus can be achieved by several physical-chemical processes, among them, by methods considered conventional, more that result in many disadvantages, such as high cost, low metal removal and high demand for reagents, and can still be ineffective, especially when dealing with large volumes and low concentrations [13,14].

As a solution to the problem itself, it is possible to mention the biosolubilization technique as a promising alternative, as it is a low-cost process, with high removal efficiency, capable of regeneration, high selectivity in relation to different metallic species, high recovery capacity metal, in addition to being less aggressive to the environment [15]. And as an advantage, the biosolubilization technique consists of the detoxification of the site, or even the removal of contaminating elements from the soil by biomass through active microorganisms, which have the ability to modify or decompose such toxic elements and mineral metals [16].

Highlighted, biosolubilization makes use of several microorganisms in their active function, such as bacteria, fungi, yeasts and cyanobacteria, which have specific underlying mechanisms necessary for biosolubilization, being dependent on several factors such as the chemical composition of the cell wall of the biosorbent, the physical-chemical conditions of the external environment, and finally, the chemical properties of the metal [15].

Match

Phosphorus (P) is an essential element for all living organisms, considered an essential macronutrient, being present in nucleic acids, phospholipids, lipopolysaccharides, as well as in several cytoplasmic solutes, as well as in the energy metabolism of animated beings, as in the cycle of ATP-ADP, storage, expression of genetic information (DNA and RNA), and bone structure, in addition to actively participating in the process of growth and bodily support of plants and animals. Comparing phosphorus with other chemical elements, it is considered irreplaceable [17].

Considering in world terms, P is found in the rocks of deposits of sedimentary, igneous and biogenetic origins. In terms of development and maintenance of plant growth, P is generally disposed in the form of P₂O₅, being largely responsible for generating energy for plant production [18]. Among the existing minerals, phosphorus is one of the most scarce resources in the

world, besides being one of the main as a limiting factor for several cultures in different types of soils. The mineral phosphorus in its soluble form is considered highly reactive with the elements calcium, iron, aluminum, as well as clays, organic matter and carbonates, and thus, leading to the formation of complexes with high insolubility, that is, they become unavailable for plants [19].

The main source of phosphorus are the so-called phosphate rocks (PRs), which represents an imprecise term, because the phosphate rocks are available in unprocessed and concentrated forms, that is, in the benefited form, which is considered the main economically viable source. phosphorus, being expressed as P_2O_5 . In Brazil, it is known that 80% of the phosphate deposits are of igneous origin with considerable content of P_2O_5 , representing a percentage of about 17% worldwide [20,21].

Elemental phosphorus is not found available in nature, but it spontaneously and easily combines with the chemical element oxygen, forming phosphorus pentoxide (P_2O_5), and that when combined with water, phosphoric acid is formed. P_2O_5 occupies the eleventh place in the order of abundance of elements in the igneous rocks of the earth's crust [17].

In Brazil, most of the soil is classified as oxisols, which has high depth, highly degraded, highly drained and strongly acidic characteristics. In this type of soil there is a dominance of oxides, hydroxides and oxy-hydroxides of the elements iron (Fe) and aluminum (Al), which easily facilitate adsorption with phosphate, occurring the formation of iron and aluminum phosphates [22].

Table 1: Presentation of bacteria, fungi, intercropping between bacteria and intercropping between bacteria and fungi in the solubilization of the chemical element phosphorus

Microorganism	Genre	Amount of solubilized P	Efficiency (%)	Reference
Bactéria	<i>Pantoea. agglomerans</i> ZB	1247,78 mg L ⁻¹	24,95	Li et al., 2020
	<i>Enterobacter sakazakii</i>	1728,00 mg L ⁻¹	79,00	
	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	1432,20 mg L ⁻¹	77,00	Mouradi et al., 2017
	<i>Pseudomonas cepacia</i>	1272,10 mg L ⁻¹	60,00	
	<i>Bacillus megaterium</i>	2,757 mg L ⁻¹	55,14	Carmo et al., 2019
	<i>Bacillus licheniformis</i>	2,730 mg L ⁻¹	54,60	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1,395 mg L ⁻¹	27,90	
Fungos	<i>Aspergillus niger</i>	75,79 mg L ⁻¹	40,53	Xiao et al., 2011
	<i>Aspergillus japonicus</i>	66,18 mg L ⁻¹	35,39	
	<i>Aspergillus simplicissimum</i>	85,43 mg L ⁻¹	45,68	
	<i>Fusarium moniliforme</i>	11,54 mg L ⁻¹	3,59	Abdel-Ghany et al., 2019
	<i>Aspergillus chevalieri</i>	24,40 mg L ⁻¹	7,60	
	<i>Trichoderma harzianum</i>	28,40 mg L ⁻¹	8,85	Kribel et al., 2019
	<i>Trichoderma asperellum</i>	11,92 mg L ⁻¹	95,39	
Consórcio bacteriano	<i>Serratia liquefaciens</i>	TCP – $Ca_3(PO_4)_2$ – 715 µg mL ⁻¹ TRP – fosfato de rocha da Tunísia – 605 µg mL ⁻¹	TCP – 71,60 TRP – 92,42	Zineb et al., 2020
	<i>Pseudomonas spp</i>			
	<i>Pseudomonas koreensis</i>			
	<i>Pseudomonas corrugata</i>			
	<i>Bacillus safensis</i>			
	<i>Burkholderia spp</i>			
	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>			
	<i>Bacillus circulans</i>	299,0 µg L ⁻¹	29,0	Emami et al., 2020
	<i>Bacillus</i>			
	<i>Pseudomonas</i>			
	<i>Staphylococcus</i>			
	<i>Paenibacillus</i>			
	<i>Stenotrophomonas</i>			
	<i>Sphingobacterium</i>			
	<i>Lysinibacillus</i>			
	<i>Advenella</i>			
	<i>Enterobacter</i>			
	<i>Variovorax</i>			

	<i>Plantibacter</i>			
Consórcio entre bactéria e fungo	<i>Rhodospirillales</i>	153,00 mg L ⁻¹	86,10	Xiao et al., 2017
	<i>Rizobiales</i>			
	<i>Esfingebacteriana</i>			
	<i>Esfinge</i>			
	<i>Lactobacillales</i>			
	<i>Burkholderiales</i>			
	<i>Rhodocyclales</i>			
	<i>Flavobacterianos</i>			
	<i>Caldilineales</i>			
	<i>Xanthomonadales</i>			
	<i>Bacillales</i>			
	<i>Nitrosomonadales</i>			
	<i>Rodobacterales</i>			
	<i>Planctomycetales</i>			
	<i>Clostridiales</i>			
	<i>Saccharomycetales</i>			
	<i>Hypocreales</i>			
	<i>Ofiostomatales</i>			
	<i>Bacillus sp</i>	370 µg mL ⁻¹	18,53	Saxena et al., 2015
	<i>Aspergillus niger</i>			

Biosolubilization

Many studies show that microorganisms could solubilize chemical elements considered insoluble, and convert them into soluble form, and among the techniques mentioned by the bioremediation process, the biosolubilization technique arises, which can be explored through environmental biotechnology in the removal of contaminants of soils, sediments and industrial residues [21].

In the search for environmentally sound technologies for the mining industry, biological processes such as biosolubilization are seen as one of the most promising and certainly the most revolutionary solutions for solving different types of environmental problems, mainly applicable in mining industries [23].

Considering the biosolubilization process, it is seen as a biological treatment carried out by microorganisms, which, through their metabolic reactions, generate chemicals such as mineral acid, organic acids, polymers and enzymes. These chemical by-products attack the tailings contained in the ore, promoting its dissolution and producing its selective removal [24].

There are several microorganisms that have been used with considerable efficiency in the solubilization of various chemical elements, such as bacteria, fungi, or even when associated, as shown in Table 1, when bacteria, fungi, intercropping of bacteria and consortium of bacteria and fungi in phosphorus solubilization.

Bacteria

Under optimized culture conditions Li et al., carried out studies of phosphorus solubilization from the bacterium *Pantoea* [25]. agglomerans ZB, the same obtained from the rhizospheric soil of *Araucaria* that grows on the beach of the Qingshan River in the capital Wuhan, province of Hubei in China, and thus, reaching a maximum solubilization of 1247.78 mg L⁻¹ of phosphorus, which corresponds at a 24.45% efficiency of biosolubilization.

According to studies by Mouradi et al., strains isolated from the El Halassa phosphate deposit identified as *Enterobacter sakazakii*, *Pseudomonas pseudomallei* and *Pseudomonas cepacia*, showed a maximum capacity to release soluble phosphate from Ca₅(PO₄)₃(OH) in concentrations of 1728 ± 0, 5, 1432.2 ± 1 and 1272.1 ± 0.5 mg Pi L⁻¹ respectively, corresponding to the efficiency values of 79%, 77% and 60% respectively in the applied phosphorus biosolubilization technique [26].

Carmo et al., in its phosphorus biosolubilization studies, proceeded to its solubilization tests in an air lift bioreactor from phosphate rocks, using three separate strains, *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis* and *Pseudomonas fluorescens*, who responded with a biosolubilization of 2.757 mg L⁻¹, 2.730 mg L⁻¹ and 1.395 mg L⁻¹, respectively of phosphorus, corresponding to an efficiency of 55.14%, 54.60% and 27.90% of phosphorus solubilization [21].

Fungi

In the studies developed by Xiao et al., three fungal strains were used, *Penicillium simplicissimum*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus japonicus* and, which were isolated from the rhizospheric soil of wheat, which strains demonstrated the phosphorus solubilization capacity of the order of 85.43 mg L⁻¹, 75.79 mg L⁻¹ and 66.18 mg L⁻¹, respectively, on the seventh day of incubation, and thus, corresponding to an efficiency of 45.68%, 40.53% and 35.39% of phosphorus solubilization, respectively [27].

Fusarium moniliforme, *Aspergillus chevalieri* and *Trichoderma harzianum*, obtained in isolation from rhizospheric soil grown with *Sorghum bicolor* L., are fungi that were used by Abdel-Ghany et al., aiming at the solubilization of inorganic phosphorus, obtained a maximum biosolubilization of P of 11.54 mg L⁻¹, 24.40 mg L⁻¹ and 28.40 mg L⁻¹, respectively, meaning in this order an efficiency of 3.59%, 7.60% and 8.85% in phosphorus solubilization [28].

Kribel et al., in his studies carried out the isolation of the Trichoderma fungus from the soil with roots adjacent to the Moroccan phosphate mines, which tested qualitatively in vitro as to its potential to solubilize phosphorus from phosphate rock, being positive the development in Modified Pikovskaya Agar (MPA) medium, containing the phosphorus analyte, with a good radial growth greater than 79.8 mm being observed in the period of 6 days, even if there was no clear zone around the colony, which is characterized as a potential phosphorus solubilizer [29]. The fungus demonstrated the ability to solubilize a maximum concentration of 11.92 mg L⁻¹ of phosphorus, referring to an efficiency of 95.39% of P. biosolubilization.

Microbial consortium

There are many different types of phosphorus-solubilizing microorganisms, as mentioned in Table 1, as well as bacteria and fungi, make phosphorus insoluble in soluble, by the function called phosphorosolubilizer (PS), which can be easily absorbed by plants [30]. There are few studies that report the use of the microbial consortium in biosolubilization studies, therefore, little is known about its solubilization mechanisms, making it difficult to carry out comparative reports for new studies [31].

Bacterial consortium

In the studies developed by Zineb et al., the bacteria *Serratia liquefaciens*, *Pseudomonas* spp, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas corrugata*, *Bacillus safensis*, *Burkholderia* spp, *Pseudomonas frederiksbergensis* and *Bacillus circulans*, were used in consortium in the phosphate solubilization process in phosphate (TCP) samples Ca₃(PO₄)₂ and Tunisia rock phosphate (TRP), containing 30% P₂O₅. The results presented by Zineb, demonstrate a solubilization of 715 µg mL⁻¹ of phosphorus in the TCP sample, and 605 µg mL⁻¹ of phosphorus in the TRP sample, equivalent to an efficiency of 71.60% and 92.42%, respectively [23].

The bacterial consortium of *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Sphingobacterium*, *Lysinibacillus*, *Advenella*, *Enterobacter*, *Variovorax* and *Plantibacter*, target of Emami et al., revealed the solubilization of 299 µg mL⁻¹ of phosphorus from soil samples of wheat root and rhizosphere (*Triticum aestivum* L.), indicating a 29% efficiency of phosphorus solubilization [32].

Consortium between bacteria and fungus

Xiao et al., in his study made use of a microbial consortium obtained through the isolation and further enrichment made from the activated sludge, collected from a municipal wastewater treatment plant in Edmonton, Canada [19]. The researchers used a microbial consortium composed of (Bacteria) Rhodospirillales (8.73%), Rizobiales (8.13%), Sphingobacterial (7.57%), Sphinx (6.70%), Lactobacillales (5.30%), Burkholderiales (5.22%), Rhodocyclales (3.6%) 2%), Flavobacteriales (3.10%), Caldilineales (2.79%), Xanthomonadales (2.71%), Bacillales (1.96%), Nitrosomonadales (1.95%), Rodobacterales (1.95%), Planctomycetales (1.72%) and Clostridiales (1.56%), at the order level, and (Fungi) Saccharomycetales (39.46%), Hypocreales (0.51%) and Ophiostomatales (0.18%) at the order level. The results obtained by Xiao's group obtained a solubilization of 153.00 mg L⁻¹ of phosphorus, revealing an efficiency of 86.10%.

The scientists Saxena et al., the bacterial and fungal consortium worked on their study, reporting the use of *Bacillus* sp and *Aspergillus niger* in the solubilization of phosphorus, in function of the growth and promotion of the chickpea, which was reported a greater increase in the length of the shoot and the root of 43.73

and 13.96 cm in the plant, respectively, being also observed a maximum solubilization of phosphorus by the consortium around 370 µg mL⁻¹, corresponding to the efficiency of 18.53% solubilization of the chemical element phosphorus, after the second day of incubation [33].

Phosphorus biosolubilization

The solubilization of phosphorus (P) compounds by microorganisms, called P-solubilizers which are naturally abundant in soils, are effective in releasing inorganic P through solubilization by organic functions of the microorganism, driven by insoluble phosphorus mineralization, present in the soil and availability to the plant [25]. It is also known that the soil's microbial biomass contains a significant amount of immobilized phosphorus, which is potentially available to plants [28].

However, there are several theories proposed that explain the mechanisms of P solubilization by microorganisms, which are organized into three groups, the first referring to the theory proposed by Cunningham and Kuiack, based on the function of organic acids; the second contemplates the sink theory, defended by Halvorson, keynan and Kornberg; and finally the third contribution by Illmer and Schinner, which explains about the theory of acidification and excretion of H⁺. Of these, the organic acid theory is the one that best explains the phosphorus solubility mechanism and is the most accepted theory by the majority of the scientific community worldwide [27,34-36].

In the theory of organic acid, the insoluble sources of P are solubilized by bacteria and fungi P-solubilizers promoting the lowering of the pH, that is, increasing the acidity of the reaction medium. The decrease in pH in the reaction medium suggests the release of organic acids by microorganisms [37]. Such organic acids can directly dissolve the mineral phosphorus, this as a result of the anionic exchange of PO₄³⁻ by acid anion, or even, it can chelate the Fe and Al ions associated with P. In this synthesis, the discharge of organic acid by strains occurs microbials becoming acidic and the surrounding environment, which ultimately leads to the release of P ions from mineral P by replacing H⁺ with Ca²⁺ [38]. Of the different organic acids involved in the solubilization of insoluble P, the most prominent are released by fungal strains, such as: succinic, citric, gluconic, α-acetogluconic and oxalic acids [39].

In the dissipation theory proposed by Halvorson, keynan and Kornberg, P-solubilizing microorganisms assimilate phosphorus from the liquid medium, activating the indirect dissolution of calcium phosphate compounds by consistent removal of phosphorus from the culture medium [35]. The dissipation theory generally elucidates solubilization in the form of mineralization of organic P compounds in which the P content in the microbial biomass is consistently correlated with the decomposition of organic substrates.

The ability of enzymes made available by microorganisms to perform a desired function in the rhizosphere is a crucial aspect for their effectiveness in plant nutrition. And these enzymes play an important role in the release of phosphorus through organic compounds in the soil, such as: i. nonspecific phosphatase from dephosphorylation of organophosphate or phosphoanhydride bonds of organic matter; ii. Phytases, responsible for specifically causing the release of P from phytic acid, and finally iii. phosphonates and C-P lyases, and the latter causes the cleavage of the C-P bond of organophosphonates [37].

According to Rodriguez et al., the organic depletion of phosphorus by the plant in the rhizosphere has been compensated by the absorption of phosphorus by plants, through the efficiency of microbial phosphatases, which are released outside the cell and participate in the dissolution and mineralization of organic phosphorus compounds [40]. Among phosphatases, acid phosphatase stands out, which is commonly found in fungi, being detected in vacuoles, vesicles and other intracellular and extracellular fungi organs.

Another significant application of phosphorus-dissolving enzymes is the solubilization of organic phosphorus present in the soil through the degradation of phytate, which is mediated by the action of the phytase enzyme [39]. According to Richardson et al., it is reported in their studies that the ability of plants to obtain phosphorus directly from phytate is very limited, but that when phytate is supplied the plant shows a significant improvement in plant growth and nutrition, leading to an increase in phosphorus nutrition to such an extent that the growth and phosphorus content of the plant were equivalent to the control of plants supplied with inorganic phosphorus [41].

Final considerations

The study consisted of assessing different microorganisms such as bacteria, fungi, consortium of bacteria, and consortium of bacteria with fungi, applicable to the phosphorus solubilization technique, since it is insoluble in the soil, and thus, being solubilized by the biosolubilization process. As well as understanding the chemical and biological functions of microorganisms in the process of biosolubilization, to improve the technique, and aiming at higher yields and efficiency in the phosphorus biomineralization process [42].

Thanks

The authors would like to thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for their financial support.

References

- De Boer MA, Wolzk L, Sloopweg JC (2018) Phosphorus: Reserves, Production, and Applications. In: Ohtake H., Tsuneda S. (eds) *Recuperação e Reciclagem de Fósforo*. Springer, Cingapura, cap 5: 75-100.
- Pena JCC, Goulart F, Fernandes GW, Hoffmann D, Leite FSF, et al. (2017) Impacts of mining activities on the potential geographic distribution of eastern Brazil mountaintop endemic species. *Perspectives in Ecology and Conservation* 15: 172-178.
- DNPM (2017) Departamento Nacional de Produção Mineral. Anuário Mineral Brasileiro: Principais substâncias Metálicas. Ano base 43. http://www.anm.gov.br/dnpm/publicacoes/serie-estatisticas-e-economia-mineral/anuario-mineral/anuario-mineral-brasileiro/amb_metalicos2017.
- USGS - United States Geological Survey. National Minerals Information Center – Phosphate Rock Statistics Information. Annual Publications: Phosphate rock. Referente from 1996 to 2019. <https://www.usgs.gov/centers/nmic/phosphate-rock-statistics-and-information>.
- Uliana D, Kahn H, Braz AB (2009) Technological characterization of phosphate ore types from the Salitre Alkaline Complex, MG – Fosfertil Area. *Revista Escola de Minas* 62: 511-516.
- IBRAM (2016) Brazilian Mining Institute. Mining tailings management and management. Brasília 128. <http://www.ibram.org.br>.
- Mechi A, Sanches DL (2010) Environmental impacts of mining in the State of São Paulo. *Advanced Studies*, São Paulo 24: 209-220.
- Bringezu S, Bleischwitz R (2017) Environment and Sustainability. In: *Sustainable Resource Management*. 1 st Edition. London: Routledge 344p.
- Arias TL, Peralta VF, Diana DMF, Delgado EG, Márquez FSA, et al. (2016) Índices de calidad ambiental de aguas del Arroyo Caañabe mediante tests microbiológicos y ecotoxicológico. *Revista Ambiente & Água* 11: 548-565.
- Faustino SB, Fontana L, Bartozek ECR, Beaked CEM Bicudo DC (2016) Composition and distribution of diatoms with a sedimentary profile and superficial sediments in a supply reservoir in southeastern Brazil. *Biota Neotropica*, Campinas 16: 1-14.
- Behera BC, Yadav H, Singh SK, Mishra RR, Sethi BK, et al. (2017) Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil Mahanadi river delta, Odisha, India. *J. Genet. Eng. Biotechnol* 15: 169-178.
- Mendes GO, Dias CS, Silva IR, Junior JIR, Pereira OL, et al. (2013) Fungal rock phosphate solubilization using sugarcane bagasse. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29: 43-50.
- Dal Magro C, Deon MC, Thomé A, Piccin JS, Colla LM (2013) Biossorção passiva de cromo (VI) através da microalga *Spirulina platensis*. *Química Nova* 36: 1139-1145.
- Farhan SN, Khadom AA (2015) Biosorption of heavy metals from aqueous solutions by *Saccharomyces Cerevisiae*. *International Journal of Industrial Chemistry* 6: 119-130.
- Ye S, Zeng G, Wu H, Zhang C, Dai J, et al. (2017) Biological technologies for the remediation of co-contaminated soil. *Critical Reviews in Biotechnology* 37: 1062-1076.
- Dotaniya ML, Panwar NR, Meena VD, Dotaniya CK, Regar KL, et al. (2018) Bioremediation of metal contaminated soil for sustainable crop production. In: *Role of metal contaminated soil for sustainable crop production*. Springer Nature Singapore Pte Ltda. Cap 6: 143-173.
- Shrivastava M, Srivastava PC, D'souza SF (2018) Phosphate-solubilizing microbes: diversity and phosphates solubilization mechanism. *Role of Rhizospheric Microbes in Soil*, chapter 5:137-165.
- Roy ED (2017) Phosphorus recovery and recycling with ecological engineering: A review. *Ecological Engineering* 98: 213-227.
- Xiao C, Wu X, Liu T, Xu G, Chi R (2017) Optimizations of particle size and pulp density for solubilization of rock phosphate by a microbial consortium from activated sludge. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 47: 562-569.
- Mazzilli BP IPEN (2016) Phosphate mining and phosphoric acid production. In: REIS, RÓCIO G dos (Ed.). *NORM: practical guide*. Rio de Janeiro, RJ: Author's Edition chap 5: 89-98.
- Carmo TS, Moreira FS, Cabral BV, Dantas RCC, Resende MM, et al. (2019) Phosphorus recovery from phosphate rocks using phosphate-solubilizing bacteria. *Geomicrobiology Journal* 36:195-203.
- Khan MS, Zaidi A, Ahemad M, Oves M, Wani PA (2010) Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi - current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science* 56: 73-98.
- Zineb AB, Trabelsi D, Ayachi I, Barhoumi F, Aroca R, et al. (2020) Inoculation with elite strains of phosphate-solubilizing bacteria enhances the effectiveness of fertilization with rock phosphates. *Geomicrobiology Journal* 37: 22-30.
- Chime TO (2013) Optimization of Process Variables for the Biodephosphorization of Iron ore using *Leptospirillum ferrooxidans*. *International Journal of Multidisciplinary*

- Sciences and Engineering, Nigeria 4: 57-64.
25. Li L, Chen R, Zuo Z, Lv Z, Yang Z, et al. (2020) Evaluation and improvement of phosphate solubilization by na isolated bacterium *Pantoea agglomerans* ZB. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 36: 1-14.
26. Mouradi M, Kadmiri IM, Amehdar L, Latrach L, Hilali A (2017) Assessing hydroxyapatite biosolubilization by bacterial strains isolated from EL Halassa Khouribga P deposit. *Moroccan Journal of Chemistry* 5: 697-707.
27. Xiao C, Chi R, Li X, Xia M, Xia Z (2011) Biosolubilization of rock phosphate by three stress-tolerant fungal strains. *Appl. Biochem. Biotechnol* 165: 719-727.
28. Abdel-Ghany TYM, Mohamed ZH, Abboud MAA, Helmy EA, Al-Rajhi AMH, et al. (2019) Solubilization of inorganic phosphate by rhizospheric fungi isolated from soil cultivated with sorghum bicolor L. *Biorecursos* 14: 5521-5532.
29. Kribel S, Qostal S, Touhami O, Selmaoui K, Mouria A, et al. (2019) Quantitative and qualitative estimation of moroccan *Trichoderma* isolates capacity to solubilize rock phosphate. *Acta Phytopathologia et Entomologica Hungarica* 54:157-172.
30. Xiao C, Wang Q, Feng B, Xu G, Chi R (2018) Biosolubilization of rock phosphates in a bioreactor usin a microbial consortium from rhizospheric soils: An analysis of the microbial community and technical feasibility. *Mining, Metallurgy & Exploration* 35: 184-191.
31. Prakash VJ, Kumar JD, Saurabh S, Ashok K, Satya P, et al. (2017) Consequence of phosphate solubilizing microbes in sustainable agriculture as efficient microbial consortium: A review. *Climate Change and Environmental Sustainability* 5:1-19.
32. Emani S, Aalikhani HA, Pourbabaee AA, Etesami H, Motasharezadeh FS (2020) Consortium of endophyte and rhizosphere phosphate solubilizing bacteria improves phosphorous use efficiency in wheat cultivars in phosphorus deficient soils. *Rhizosphere* 14: 1-31.
33. Saxena J, Saini A, Ravi I, Chandra S, Garg V (2015) Consortium of phosphate-solubilizing bacteria and fungi for promotion of growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum*). *Journal of CropImprovement* 29: 353-369.
34. Cunningham JE, Kuiack C (1992) Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaji*. *Appl Environ Microbiol* 58:1451-1458.
35. Halvorson HO, Keynan A, Kornberg HL (1990) Utilization of calcium phosphates for microbial growth at alkaline pH. *Soil Biol Biochem* 22: 887-890.
36. Illmer PA, Schinner F (1992) Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biol Biochem* 24: 389-395.
37. Adhikari P, Pandey A (2019) Phosphate solubilization potencial of endophytic fungi isolated from *Taxus wallichiana* Zucc. roots. *Rhizosphere* 9: 2-9.
38. Behera BC, Singdevsachan SK, Mishra RR, Dutta SK, Thatoi HN (2014) Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—a review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3: 97-110.
39. Govarthanam M, Mythili R, Selvankumar T, Kamala-Kannan S, Kim H (2018) Myco-phytoremediation of arsenic- and lead-contaminated soils by *Helianthus annuus* and wood rot fungi, *Trichoderma* sp. isolated from decayed wood. *Ecotox Environ Safe* 151: 279-284.
40. Rodriguez H, Fraga R, Gonzalez T, Bashan Y (2006) Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil* 287: 15-21.
41. Richardson AE, Hadobas PA, Hayes JE, O'hara CP, Simpson RJ (2001) Utilization of phosphorus and pasture plants supplied with myo-inositol hexaphosphate is enhanced by the presence of soil microorganisms. *Plant and Soil* 229: 47-56.
42. Nandimath AP, Karad DD, Gupta SG, Kharat AS (2017) Consortium inoculum of five thermo-tolerant phosphate solubilizing Actinomycetes for multipurpose biofertilizer preparation. *Iranian Journal of Microbiology* 9: 295-304.

APÊNDICE 3

ARTICLE 2

Title: Solubilization of Phosphorus by Isolated Fungus of Iron ore Tailings.

Authors: Glalber Luiz da Rocha Ferreira^{1*}, Lilian Carla Carneiro¹, Geraldo Sadoyama², José Daniel Gonçalves Vieira¹

¹Laboratory of Environmental Microbiology and Biotechnology. Institute of Tropical Pathology and Public Health. Federal University of Goiás. Cep 74605-050, Goiânia, GO, Brazil.

*e-mail: glalberocha@gmail.com

e-mail: jdgvieira62@gmail.com

e-mail: carlacarneirililian@gmail.com

²Department of Biological Sciences CAC - UFG. Federal University of Goiás. Cep 75704-020, Catalão, GO, Brazil.

e-mail: sadoyama@ufg.br

Published in Revista: Journal of Earth and Environmental Sciences Research

Publication date: 03/12/2020

Research Article

Open Access

Solubilization of Phosphorus by Isolated Fungus of Iron ore Tailings

Glaber Luiz da Rocha Ferreira^{1*}, José DG Vieira¹, Lilian C Carneiro¹ and Geraldo Sadoyama²

¹Laboratory of Environmental Microbiology and Biotechnology. Institute of Tropical Pathology and Public Health. Federal University of Goiás. Cep 74605-050, Goiânia, GO, Brazil

²Department of Biological Sciences CAC - UFG. Federal University of Goiás. Cep 75704-020, Catalão, GO, Brazil

ABSTRACT

In view of the high technological expectations in the mining sector today, an inability of miners to reach their totality in the use of minerals present in nature is verified, and this is caused primarily by the use of methods considered fallible in the mining process. In view of this condition, it is necessary to develop new technologies with innovative behavior, seeking more productive forms. Among the existing technologies, a study with a technological and promising view is proposed, which deals with the process of phosphorus biosolubilization from a synthetic source considered insoluble by a fungus isolated from iron ore. Genetic tests revealed that the microorganism belongs to the *Aspergillus* genus, that is, the *Aspergillus terreus* species. The analytical tests proposed in this study pointed to a solubilization of 90.93 % of phosphorus by fungal biomass, which corresponds to 296.56 mg L⁻¹ of soluble phosphorus, occurring in a 168 hour process, accounting for an average solubilization of 1,76 mg h⁻¹. The biosolubilization process proved to be a great technological alternative in reducing production costs and establishing the sustainability of the mineral extraction system, being a viable alternative in purifying and adding value to iron ore, and also in obtaining another compound consisting of phosphorus, generating a new economic source, as an example in the production of fertilizers.

*Corresponding author

Glaber Luiz da Rocha Ferreira, Department of Microbiology, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás-UFG. Goiânia, Goiás / Brazil. Rua Delenda Resende de Melo Left / 1. Avenida S / N Laboratory of Environmental Microbiology and Biotechnology, University Sector, CEP 74605-050. Tel: (62)99113-9140; E-mail: glalberocha@gmail.com

Received: November 19, 2020; **Accepted:** November 25, 2020; **Published:** December 03, 2020

Keywords: Biosolubilization, Solubilization, Fungus, Phosphorus, *Aspergillus Terreus*.

Introduction

Iron ore is considered the main raw material in the steel industry, acting directly in the manufacture and transformation of pig iron and steel [2]. Brazil, as well as Western Australia, South Africa and south-central China, are highlighted for having an enormous amount of iron resources, more with high phosphorus content, in many areas of iron ore production [3]. Iron ore is generally designated as having a high or low grade based on its iron content, with high quality ores, which are found to contain less than 0.07% phosphorus, being considered commercially as most desired, and for this reason they are running out very quickly, leaving in the future the exploration and processing of low-grade iron ores [4,5].

As it is not known exactly how phosphorus is found in iron ore, it is deduced that phosphorus is present in the ore in the form of phosphate, adsorbed on the surface of the particle or occluded in the micropores. Another possibility also suggested is that phosphorus is within the structure of oxyhydroxides or as a phosphate mineral. In Brazil, wavellite, Al₃(PO₄)₂(OH)₃.5(H₂O); senegalite, Al₃(PO₄)(OH)₃(H₂O); turquoise, CuAl₆(PO₄)₄(OH)₈.0.5(H₂O), are the main phosphates found in iron ore [6].

In the iron ore steelmaking process, phosphorus is highlighted as being a harmful element in the steel production process, and thus significantly damaging the quality of steel products, such

as increasing hardness, fragility and consecutively ductility [3]. In other industrial segments, phosphorus is seen as an essential element, such as in the production of fertilizers, automobiles, electronics, medicines, fuel cells and processed foods [1].

In order for us to have the continuous availability of iron ore, it is essential to develop new systems and methods for the exploitation of low quality iron ore, which are unusable and unexplored, and thus, contributing in the future with the supplementation of reserves that smaller in high-grade iron ore [7].

Iron ore dephosphorization is an important challenge for the sustainable development of the steel industry, and for this reason, efforts have been intensified in the search for new technologies to remove phosphorus from iron ore a acceptable levels [4]. There are several processes used to remove phosphorus from iron ores, including roasting magnetization, direct reduction based on coal, heat treatment, microwave treatment, ultrasonic treatment, acid leaching, alkaline leaching, selective agglomeration, and flotation [4,8,9].

Considering the biosolubilization process, it is seen as a biological treatment carried out by microorganisms, which, through their metabolic reactions, generate chemicals such as mineral acid, organic acids, polymers and enzymes. These chemical by-products attack the tailings contained in the ore, promoting its dissolution and producing its selective removal [10]. There are several microorganisms that have been used with considerable efficiency

in phosphate solubilization, such as bacteria and fungi [8,11- 20].

As a general rule, edaphic microorganisms that are added to the ore, react with better efficiency, and this is due to a better adaptation and less ecological distortions of the environment. For this reason, this study will use a filamentous fungus, extracted from raw iron ore, aiming to dephosphorize iron ore and biosolubilize phosphorus in liquid medium, and thus, contributing to the viability of new biotechnological studies.

Experimental Part

The iron ore tailing sample obtained came from a mining company, located in the city of Catalão, Goiás. Approximately a 10 kg portion of the waste generated under the mining company's soil was separated for later isolation of biological material and conducting studies of phosphorus solubilization.

Means of growth and enrichment

The microorganism was obtained from the inoculation of the iron ore tailing sample in four different enrichment media, which are the following media: NBRIP, 9K-Glucose, 9K and general purpose, as shown in Table 1. All media were dissolved in distilled water, and sterilized at 121 °C for 20 minutes.

Microbial growth and enrichment

To obtain the microorganism from the iron ore sample, 5 g of the iron ore tailing sample was inoculated into the four culture media, as shown in Table 1, in Erlenmeyers flasks containing 50 mL of the medium. The incubation occurred for a period of seven days in an incubator under the conditions of 30 ± 2 °C and 130 rpm. After incubation, the inoculation was repeated by removing an aliquot of 1 ml of each medium for the same four new media in Erlenmeyers presented in Table 1, containing 5 g of iron ore sample and sterilized at 121 °C for 20 minutes. He led them back to the incubator under the same conditions as described above. The same procedure was repeated two more times, completing three stages of enrichment.

Isolation of the microorganism

The microorganisms belonging to the third enrichment stage were transferred by inoculating 100 µL of the enrichment medium in Petri dishes containing the four culture media shown in Table 1, plus 1.7% agar and 0.5% calcium phosphate, $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$, as a phosphorus source, sterilized at 120 °C for 20 minutes, and incubated at 30 ± 2 °C, for 10 days. The microorganism considered predominant, morphologically distinct and phosphorus solubilizer, showing the formation of a clear halo at the edges, was selected and purified in Petri dishes with medium containing 1.7% agar and 0.5% agar. calcium phosphate, $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$, and incubated at 30 ± 2 °C, for 7 days. This procedure was repeated for two more times, completing three stages of isolation of the microorganism. After incubation, the isolate was preserved by cultivation in Petri dishes with PDA medium, being incubated at 30 ± 2 °C, for 7 days, and kept refrigerated at 4 °C until its next use.

Fungal DNA extraction

DNA extraction was tested using the mycelium as biological material. A small fragment of the fungal mycelium was inoculated, grown in PDA medium, in a test tube containing 10 mL of Malt Extract Broth (MEB), which consists of: 2% malt extract, 2% glucose and 1% glucose. peptone. The inoculated MEB was incubated for 72 hours at 30°C, in the dark and shaking at 130 rpm. The mycelium was collected by vacuum filtration on a sterile cellulose filter and then washed twice with 10 ml of 0.85% NaCl.

The mycelium was collected and used for DNA extraction. DNA extraction was performed using the SDS Lysis Buffer solution, as described in [21]. The DNA extract was resuspended in 100 µL of ultra pure water and stored at -20°C.

DNA amplification and purification

The extracted DNA was used for PCR amplification in the ITS1-18S-ITS2 region, using primers ITS1 (5'-GAACCGGCGGARGGATCA-3') and ITS2 (3'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-5') [22,23]. The amplifications were performed in a total volume of 20 µL containing 50 ng of extracted DNA, 4 µL of HOT MOLPol Blend Master Mix (Molegene, Germany), and 0.5 µM of each of the primers (F) forward and (R) reverse. The amplification was carried out in a thermocycler programmed for an initial denaturation of 15 min at 95 °C, followed by 35 cycles from 30 s to 95 °C, 30 s at 55°C and 30 s at 72 °C. The annealing was carried out with a temperature of 52 °C for 30 s in triplicate. The final stretching was done at 72 °C for 5 min. Purification was done using Agencourt AMPure XP SPRI magnetic spheres. The PCR products were normalized after quantifying them with a Qubit 2.0 fluorometer (Invitrogen), with the Qubit dsDNA HS test kit (Invitrogen).

DNA sequencing

The amplified DNA fragments were sequenced using the MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA), using together the Kit V2, with 300 cycles and single-end sequencing. The sequences were analyzed using the Sentinel pipeline. In the Sentinel pipeline, the fastq files were evaluated for Phred quality (QP) using the FastQC v.0.11.8 program [24]. Then, the fastq files were subjected to the trimming of primers and sequences with low quality (QP < 20). The proprietary software used for this purpose was built in Python v.3.6, which was inspired by the features of the BioPython project [25]. The BLAST software tool, available at: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, was used to compare the similarities of the nucleotide acid sequence with the sequences of the ITS1-18S-ITS2 region of fungal species deposited with GenBank.

Phosphorus solubilization in synthetic medium

For the biosolubilization process, calcium phosphate, $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$, was used as a known source of phosphorus. In view of this, twenty-two Erlenmeyers flasks containing 1.7631 g of $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$ were prepared in 100 mL of solution in the NBRIP medium, corresponding to 1000 mg L⁻¹ of phosphate or 326.3 mg Phosphorus L⁻¹, with pH 7.0 ± 0.2 sterilized at 121 °C for 20 minutes. Then, 3 fragments of 4 mm of the inoculum grown in Petri dishes were inoculated in each Erlenmeyer flask, and incubated at 30 ± 2 °C and 130 rpm for 7 days. One Erlenmeyer flask was removed on the day, corresponding to time zero, and three Erlenmeyer flasks within 24 hours. After the incubation, samples were collected from each Erlenmeyer flask, evaluating for the content of soluble phosphorus, using the Spectro kit (Alfakit); the acid phosphatase activity, using the commercial kit (Labtest®); biomass production by measuring dry mass content and hydrogen potential.

Results and Discussion

The microorganism isolated from the iron ore tailing sample, and grown in a medium enriched with a known source of phosphorus, $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$, considered predominant in solid medium, morphologically distinct and phosphorus solubilizer, being in the latter forming a clear halo at the edges of the colony, proved to be a fungus in terms of genetic analysis.

Through genome sequencing was obtained from a nucleotide sequence (TTACCGAGTGCGGGTCTTTATGGCCCAACCT CCCACCCGTGACTATTGTACCTTGTTGCTTCG GCGGGCCCGCCAGCGTTGCTGGCCGCCGGG GGGCGACTCGCCCCCGGGCCCGTGCCCCCGG GAGACCCCAACATGAACCTGTTATGAAAGC TTGCAGTCTGAGTGTGATTCTTTGCAATCAG TTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCG) of the regions of interest (ITS) IT-ITS1-18S ITS2 region, the sequence being subjected to all the species level identification by means of comparison with sequences deposited in the database Genbank, which made it possible to identify the fungal species as *Aspergillus terreus*.

In a previous test, the fungus *Aspergillus terreus* was subjected to enrichment and growth in NBRIP media, general use, 9K-glucose and 9K, as shown in Figure 1. *A. terreus* isolated from the iron ore sample showed great growth potential in previous test in the NBRIP medium, and thus, being defined as the main means of growth and development of the phosphorus biosolubilization process in this study, thus represented in Figure 1A. The ability to solubilize phosphorus by the fungal strain in the NBRIP medium remained at a high level over 7 days, favoring the use of the NBRIP medium in the process in an efficient way to solubilize phosphorus.

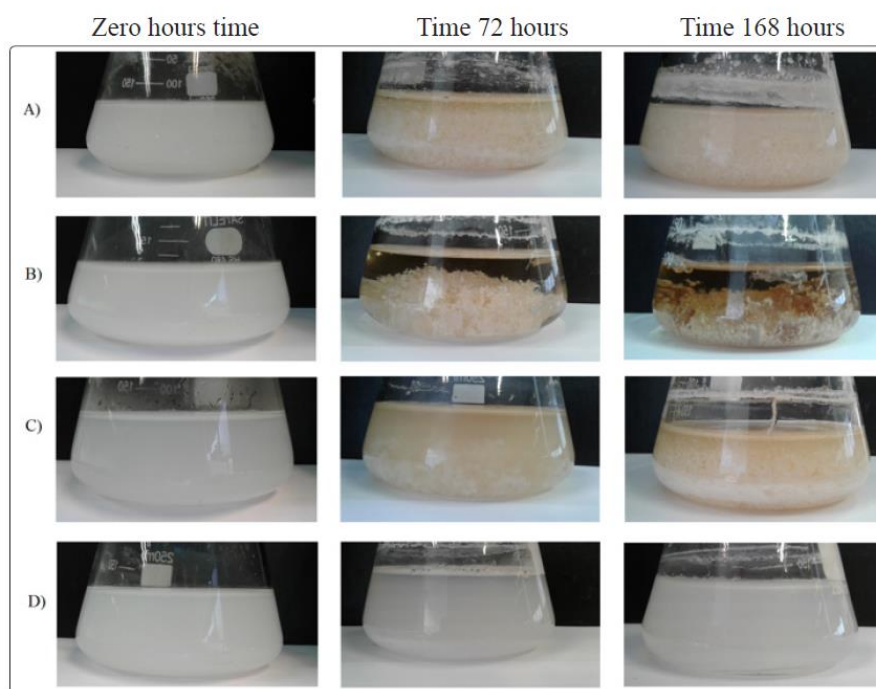


Figure 1: Evolution of fungal biomass in 168 hours in NBRIP (A), general use (B), 9K-glucose (C), and 9K (D) media

The *Aspergillus terreus* fungus isolated from the iron ore sample showed a potential for phosphorus solubilization capacity in a medium enriched with calcium phosphate, $\text{Ca}_3(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$, as shown in Table 2. A maximum biosolubilization of 908 was observed, 85 mg L^{-1} of phosphate or 296.56 mg L^{-1} of phosphorus by the fungus, contributing to the total solubilization of 90.93% of the phosphorus present in the medium enriched with calcium phosphate. Considering the maximum amount of phosphorus solubilized by the fungal biomass and the maximum process time, an average solubilization of 1.76 mg h^{-1} of phosphorus by the biosolubilization process. This allows us to conclude that approximately 182.13 mg of phosphorus per gram of calcium phosphate sample was solubilized.

From Figure 2A, an important interaction of *Aspergillus terreus* is observed in the process of converting insoluble phosphorus into its soluble form, with a marked solubilization of the mineral element phosphorus present in the iron ore sample, and thus, the stabilization is perceived. between 144 and 168 hours of phosphorus solubilization.

As shown in Table 2, the fungus *Aspergillus terreus* resulted in a final mycelial mass production of 1544.4 mg of biomass, being represented significantly by a progressive increase in the fungal mycelium mass. Figure 2B corroborates with the confirmation of the efficient capacity in the production of biomass tangentially to the solubilization of phosphorus, with an important jump observed in the first 48 hours in the biomass content. The speed of development of fungal biomass occurred similarly to the production of biomass in the first 48 hours, demonstrating an increase in the speed of up to 31.1 mg h^{-1} , after which there was a reduction in this speed, which is ascertained by the reduction of assimilation capacity of the source of insoluble phosphorus present in the medium. Paralleling the amount of solubilized phosphorus and the quantitative production of fungal biomass, a solubilization of approximately 0.19 mg of phosphorus per gram of biomass produced was verified.

Table 1: Elementary constitution of means of enrichment and growth

Growth Means	Concentration in g 100 mL ⁻¹										Reference
	Glicose	MgCl ₂ ·6H ₂ O	MgSO ₄ ·7H ₂ O	(NH ₄) ₂ SO ₄	Ca(NO ₃) ₂	FeSO ₄ ·7H ₂ O	KCl	NaCl	NH ₄ Cl	pH	
NBRIP	1,0	0,5	0,025	0,01	-	-	0,02	-	-	7,0 ± 0,2	Nautiyal, 1999.
9K – Glucose	1,0	-	0,05	0,3	0,0013	0,001	0,01	-	-	4,5 ± 0,2	Silverman e Lundgren, 1959.
9K	-	-	0,05	0,3	0,0013	0,001	0,01	-	-	4,5 ± 0,2	Silverman e Lundgren, 1959.
General use	1,0	-	0,1	-	-	-	-	0,1	0,5	7,2 ± 0,2	Verma et al., 2001.

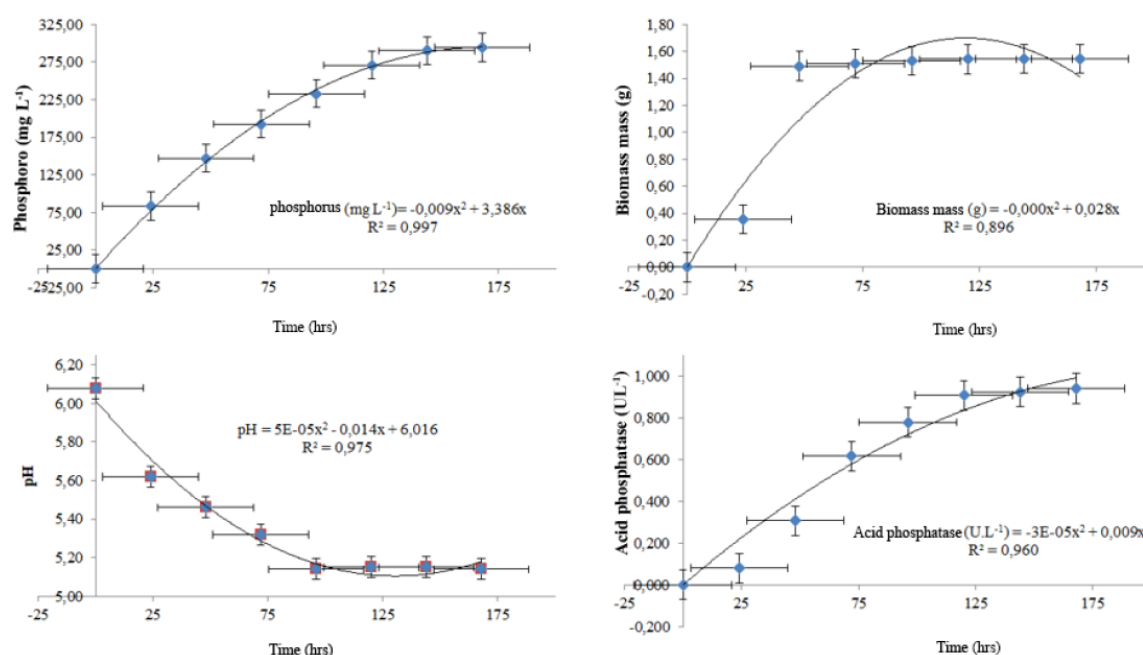


Figure 2: Graphical representation of physical-chemical tests to verify the phosphorus solubilization potential

Both pH and acid phosphatase contributed to the phosphorus solubilization process by the fungus *Aspergillus terreus*, representing an excellent quality marker of the biosolubilization process [26]. report that the primary mechanisms in phosphorus solubilization carried out by both plants and microorganisms are exercised through the excretion of H⁺, the production of organic acids, and acid phosphatase biosynthesis. The results presented in Table 2, as also shown by Figure 2C and 2D, demonstrate exactly the correlation of the primary mechanisms of phosphorus solubilization, by decreasing the hydrogen potential (pH) and increasing the enzymatic activity of acid phosphatase, contributing to the dissolution efficiency of the insoluble phosphorus present in the calcium phosphate enriched medium. The increase in the enzymatic activity of acid phosphatase shown in Table 2, is discussed by Mónica et al., [27]. As the main mechanism of phosphorus mineralization in the soil, which also has its optimal pH activity. Other works such as Govarthanan et al. and Adhikari and Pandey, argue that the release of acid phosphatase is directly related to the production of organic acids, and consequently by reducing the pH, through the release of protons, and so, being considered the main mechanism used in the solubilization of phosphorus in the soil [9,28].

According to Behera et al., organic acids can form complexes with cations (Ca²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Al³⁺), contributing to the release of phosphorus, either by chelation reaction or simple exchange [24]. It is evident that the increase in acidity contributes to the accessibility of phosphorus in the liquid medium, making the phosphorus that was previously insoluble in its soluble form, which also due to the identity of the fungus isolated from the iron ore tailings proved to be great development capacity in an inhospitable condition of acidity, more than contributing to an efficient mobilization and solubilization of insoluble phosphorus compounds.

Table 2: Evolution of the potential and verification of the mechanisms of phosphorus solubilization by the fungus strain

Time (hrs)	[PO ₄₃ -] soluble (mg L ⁻¹) ± SD	[P] soluble (mg L ⁻¹) ± SD	P reduction in iron ore%	Biomass production (mg) ± SD	Growth rate (mg h ⁻¹)	pH ± DP	Acid phosphatase (U L ⁻¹) ± SD
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00	0,0 ± 0,0	0,0	6,08 ± 0,000	0,000 ± 0,000
24	255,16 ± 6,10	83,26 ± 1,99	25,53	354,7 ± 0,2	14,8	5,65 ± 0,035	0,086 ± 0,041
48	456,42 ± 4,72	148,93 ± 1,54	45,67	1491,6 ± 0,6	31,1	5,43 ± 0,025	0,395 ± 0,082
72	590,15 ± 3,50	192,57 ± 1,14	59,05	1511,8 ± 1,4	21,0	5,29 ± 0,025	0,719 ± 0,098
96	717,56 ± 3,99	234,14 ± 1,30	71,80	1538,7 ± 1,3	16,0	5,14 ± 0,020	0,751 ± 0,092
120	839,32 ± 8,98	273,87 ± 2,93	83,98	1542,1 ± 1,0	12,9	5,13 ± 0,015	0,811 ± 0,049
144	889,88 ± 3,05	290,37 ± 0,99	89,04	1544,0 ± 0,8	10,7	5,13 ± 0,021	0,822 ± 0,050
168	908,85 ± 6,02	296,56 ± 1,96	90,93	1544,4 ± 1,1	9,2	5,13 ± 0,006	0,832 ± 0,025

DP – Standard Deviation.

Conclusion

This study confirmed that the fungus *Aspergillus terreus* isolated from iron ore tailings showed great potential for solubilization of insoluble phosphorus, and thus, being proven through the results of physical-chemical attributes, such as pH and acid phosphatase, such as main mechanisms of phosphorus mineralization in the tailings. These attributes demonstrated an important correlation tool both in the development of the fungal biomass of *Aspergillus terreus* and in the efficiency of phosphorus solubilization in the reaction medium. It is suggestive that other works should be carried out aiming at the removal and or use of phosphorus contained in the reaction medium, in the application of different biotechnologies, as an example, in biofertilization.

Thanks

The authors would like to thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), for the support and sponsorship of this research.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Yamamoto T, Nakamoto M (2018) Extraction of phosphorus from dephosphorization slag. In: OHhtake, O.; Tsuneda, S., eds.; Phosphorus Recovery and Recycling, Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd., Kyoto, Japan 23: 339-347.
- Nakajima K, Noda S, Nansai K, Matsubae K, Takayanagi W, et al. (2019) Global distribution of used and unused extracted materials induced by consumption of iron, copper, and nickel. *Environ Sci Technol* 53: 1555-1563.
- Su J, Xiu YF, Huang K, Yu JT, Alam S, et al. (2018) Selective recovery of phosphorus from acid leach liquor of iron ore by garlic peel adsorbent. *RSC Advances* 8: 22276-22285.
- Tudu K, Kumar S, Mandre N (2017) Enhanced recovery of low-grade iron ore by selective flocculation method. *J Disp Sci Technol* 39: 1075-1079.
- Ofoegbu SU (2019) Characterization studies on Agbaja iron ore: a high-phosphorus content ore. *SN Appl Sci* 204: 1-11.
- Pereira AC, Papini RM (2015) Processes for phosphorus removal from iron ore – a review. *Rev Esc Minas* 68: 331-335.
- Taylor DJC, Page DC, Geldenhuys P (1988) Iron and steel in South Africa. *J S Afr Inst Min Metall* 88: 73-95.
- Wei Y, Zhao Y, Shi M, Cao Z, Lu Q, et al. (2018) Effect of organic acids production and bacterial community on the possible mechanism of phosphorus solubilization during composting with enriched phosphate-solubilizing bacteria inoculation. *Bior Technol* 247: 190-199.
- Govarthanan M, Mythili R, Selvankumar T, Kamala-Kannan S, Kim H (2018) Myco-phytoremediation of arsenic- and lead-contaminated soils by *Helianthus annuus* and wood rot fungi, *Trichoderma* sp. isolated from decayed wood. *Ecotox Environ Safe* 151: 279-284.
- Chime TO, Menkiti MC, Onukwuli OD (2011) Biodesphosphorization of iron ore using *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *N Y Sci J* 4: 1-6.
- Tahir M, Khalid U, Ijaz M, Shah GM, Naeem MA, et al. (2018) Combined application of bio-organic phosphate and phosphorus solubilizing bacteria (*Bacillus* strain MWT 14) improve the performance of bread wheat with low fertilizer input under an arid climate. *Braz J Microbiol* 49S: 15-24.
- Paul D, Sinha SN (2016) Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential river Ganga, India. *Annals Agra Sci* 15: 130-136.
- Li X, Luo L, Yang J, Li B (2015) Mechanisms for solubilization of various insoluble phosphates and activation of immobilized phosphates in different soils by an efficient and salinity-tolerant *Aspergillus niger* strain An2. *Appl Biochem Biotechnol* 175: 2755-2768.
- Solanki M, Kundu BS, Nehra K (2018) Molecular diversity of phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere of chickpea, mustard and wheat. *Annals Agra Sci* 16: 458-563.
- Ghosh R, Barman S, Mukherjee R, Mandal NC (2016) Role of phosphate solubilizing *Burkholderia* spp. for successful colonization and growth promotion of *Lycopodium cernuum* L. (*Lycopodiaceae*) in lateritic belt of Birbhum district of West Bengal, India. *Microbiol Res* 183: 80-91.
- Xiao C, Wu X, Chi R (2015) Dephosphorization of high-phosphorus iron ore using different sources of *Aspergillus niger* strains. *Appl Biochem Biotechnol* 176: 518-528.
- Jain R, Saxena J, Sharma V (2017) The ability of two fungi to dissolve hardly soluble phosphates in solution. *Mycol J* 8: 104-110.
- Mendes GO, Zafra DL, Vassilev NB, Silva IR, Ribeiro JI, et al. (2014) Biochar enhances *Aspergillus Niger* rock phosphate solubilization by increasing organic acid production and alleviating fluorid toxicity. *Appl Environ Microbiol* 80: 3081-3085.
- Li Z, Bai T, Dai L, Wang F, Tao J, et al. (2016) A study of organic acid production in contrasts between two phosphate solubilizing fungi: *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger*. *Sci Rep* 6: 1-8.

20. Liu Z, Li YC, Zhang S, Fu Y, Fan X (2015) Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. *Appl Soil Ecol* 96: 217-224.
21. Rodrigues P, Venâncio A, Lima N (2017) Toxic reagents and expensive equipment: are they really necessary for the extraction of good quality fungal DNA? *Letters in Appl Microbiol* 66: 32-37.
22. Schmidt PA, Bálint M, Greshake B, Bandow C, Römbke J, et al. (2013) Schmitt, I. Illumina metabarcoding of a soil fungal community. *Soil Biology & Biochemistry* 1-5.
23. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Chapter 38: 315-322.
24. Andrews S (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
25. Cock PJA, Antao T, Chang JT, Chapman BA, Cox Cj, et al. et al. (2009) Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics* 25: 1422-1423.
26. Behera BC, Yadav H, Singh SK, Mishra RR, Sethi BK, et al. (2017) Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil Mahanadi river delta, Odisha, India. *J. Genet. Eng. Biotechnol* 15: 169-178.
27. Mónica IFD, Godoy MS, Godeas AM, Scervino JM (2017) Fungal extracellular phosphatases: their role in P cycling under different pH and P sources availability. *J Appl Microbiol* 124:155-165.
28. Adhikari P, Pandey A (2019) Phosphate solubilization potencial of endophytic fungi isolated from *Taxus wallichiana* Zucc. roots. *Rhizosphere* 9: 2-9.