

SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS DE ROCHA POR *ASPERGILLUS NIGER* EM DIFERENTES TIPOS DE VINHAÇA¹

ELY NAHAS² e LUIZ CARLOS DE ASSIS³

RESUMO - *Aspergillus niger* foi inoculado em frascos contendo vinhaças mistas de diferentes origens e fluorapatita como fonte de fósforo, ou alternativamente fosfatos de rocha com diferentes composições. O crescimento do fungo e a solubilização de fluorapatita não diferiram quando foi usada vinhaça esterilizada ou não. O teor de sólidos totais e solúveis foi, pelo menos, duas vezes superior na vinhaça a 65:35 (caldo: melação) que a 10:1 (caldo: mel). Possivelmente, o maior teor de açúcares totais - acarretando maior teor de acidez titulável -, ou o menor crescimento fúngico, tenham propiciado maior acúmulo de fosfato solúvel na vinhaça a 10:1 que na vinhaça a 65:35. Não se constatou diferença apreciável entre os teores de fosfato solúvel residual quando se empregou concentrações crescentes de fluorapatita. Fosfatos de rocha de diferentes origens e concentrações de fósforo influíram na capacidade solubilizadora do fungo. Enquanto com o fosfato concentrado apatítico grosso obteve-se favorecimento ao maior acúmulo de fosfato solúvel no meio de cultura (1,08 mg/ml), com o bitolato Patos de Minas obteve-se a maior solubilização, correspondendo a 72% do total de fosfato.

Termos para indexação: inoculação, fluorapatita, fungus, sólidos totais, sólidos solúveis, açúcar.

ROCK PHOSPHATE SOLUBILIZATION BY *ASPERGILLUS NIGER* IN DIFFERENT TYPES OF VINASSE

ABSTRACT - *Aspergillus niger* was inoculated into flasks containing mixed vinasses of different origins and fluorapatite as a source of phosphorus, or alternatively rock phosphates of different compositions. There was no difference in fungal growth or fluorapatite solubilization when sterilized or unsterilized vinasse was used. Total and soluble solid content was at least two times higher in 65/35 vinasse than in 10/1 vinasse. The higher total sugar content causing higher titratable acidity levels, or the lower fungal growth, may possibly have favored the greater accumulation of soluble phosphate in 10/1 than in 65/10 vinasse. No appreciable differences in residual soluble phosphate levels were detected with increasing fluorapatite concentrations. Rock phosphates of different origins and with different phosphorus concentrations affected the solubilizing ability of the fungus. Whereas crude concentrated apatite phosphorus favored the greatest accumulation of soluble phosphate in the culture medium (1.08 mg/ml), the highest solubilization (72% total phosphate) was achieved with Patos de Minas material obtained from the first crushing.

Index terms: rock phosphates, solubilization, vinasse.

INTRODUÇÃO

Dos diversos elementos, um dos mais críticos para a nutrição das plantas, além do nitrogênio, é o fósforo. Somada a isto, está a sua

baixa disponibilidade nos solos, o que pode comprometer a produção agrícola (Malavolta 1980). A utilização de fosfatos solúveis em água constitui a forma mais satisfatória de suprir as necessidades das plantas. Contudo, dada a possibilidade de fixação do fósforo no solo, há necessidade de adubações além das quantidades requeridas pelas plantas (Brady 1974). A disponibilidade de fósforo solúvel pela aplicação de fosfatos naturais está sujeita a inúmeros fatos, porém, a lenta solubilização

¹ Aceito para publicação em 13 de agosto de 1991

² Eng.-Agr., Prof.-Adjunto, Dep. de Microbiol. Fac. de Ciências Agrárias e Vet. - UNESP. CEP 14870 Jaboticabal, SP.

³ Técnico Agríc., Fac. Ciências Agrárias e Vet. Jaboticabal.

do fosfato limita a sua aplicação em culturas de rápido crescimento (Kucey et al. 1989). O processo de solubilização é efetivamente realizado por microorganismos do solo (Thomaz et al. 1985) como também através de exsudatos das plantas (Hoffland et al. 1989). Ensaio com inoculações de microorganismos solubilizadores de fosfatos de rocha permitiram a obtenção de dados comparáveis à aplicação de fosfato solúvel em trigo (Kucey 1988). A solubilização microbiana de fosfatos de rocha em cultura pura foi demonstrada em inúmeros trabalhos com uma eficiência que variou de 80 (Agnihotri 1970) a 88% (Cerezine et al. 1988). Tendo como objetivo a investigação de alternativas para a obtenção de fósforo solúvel, foi demonstrada a possibilidade de produção de 1,2 g/l de fosfato solúvel pela ação de *Aspergillus niger* sobre fluorapatita em meio de vinhaça (Nahas et al. 1990). Continuando essa linha de trabalho, foram estudadas as condições de solubilização de fluorapatita por *A. niger* 26, empregando-se as concentrações crescentes de fosfato de rocha em vinhaças mistas com diferentes composições, e além disso, de diversos fosfatos de rocha.

MATERIAL E MÉTODOS

Microorganismo

A linhagem de *Aspergillus niger* empregada neste trabalho foi selecionada entre 17 linhagens como maior produtora de acidez titulável (Ishisaka et al. 1988). Culturas estoque foram mantidas a 4°C em tubos hermeticamente fechados para não perder sua viabilidade. Inóculos dessas culturas foram transferidos para tubos contendo ágar Sabouraud e cultivados por 8 a 10 dias, a 30°C. A dois dos tubos dessas culturas, adicionaram-se 10 ml de solução esterilizada de Tween 80 a 0,01% (v/v), procedendo-se à raspagem dos esporos e filtragem em gaze para retenção do micélio. A concentração dos esporos foi ajustada para 1×10^6 /ml e a concentração dos inóculos nos cultivos líquidos foi de 1% (v/v).

Cultivos Líquidos

Vinhaças mistas provenientes de usinas da região foram utilizadas sem esterilização, a não ser em en-

saio específico. Volumes de 30 ml foram adicionados a frascos Erlenmeyer de 250 ml, contendo 5 g/l da fluorapatita, a não ser quando assinalados, e inoculados com a suspensão de esporos. As culturas foram incubadas a 30°C por nove dias.

As medidas do crescimento do fungo e as determinações dos valores de pH final, de acidez titulável e de sólidos totais e solúveis foram obtidas como anteriormente descritas (Nahas et al. 1990), após filtração dos cultivos. Ainda, no filtrado, determinaram-se os teores de açúcares totais (Dubois et al. 1956), de açúcares redutores (Somogyi 1952) e de fosfato solúvel (Ames 1966).

Os ensaios foram efetuados segundo delineamento inteiramente casualizado com três repetições, sendo que as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. As curvas foram obtidas de equações de regressão polinomial de 3º grau correspondentes ao maior coeficiente de determinação (R^2).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão resumidos os resultados referentes à composição química das vinhaças utilizadas neste trabalho. O teor de sólidos totais e solúveis foi, pelo menos, duas vezes superior na vinhaça mista, contendo 35% de

TABELA 1. Composição química das vinhaças mistas provenientes das usinas da região de Jaboaticabal, SP, empregadas neste trabalho.

Componentes	Vinhaças*	
	35% melaço 9% mel	
	(mg/ml)	
Açúcares totais	5,40	6,67
Açúcares redutores	1,15	0,94
Sólidos totais	25,03	9,95
Sólidos solúveis	12,63	6,76
Nitrogênio total	0,30	0,42
Fosfato solúvel (μ g/ml)	5,63	16,11
Cinzas	7,46	5,09
Acidez titulável (μ E/ml)	30,32	47,25
pH	4,3	3,7

(*) Percentagens em relação ao teor de caldo (v/v).

melaço, que na vinhaça com 9% de mel, enquanto o teor de fosfato solúvel foi cerca de três vezes superior na vinhaça com 35% de melaço. Contudo, o teor de fosfato solúvel foi, comparativamente, bastante reduzido em relação aos outros nutrientes.

Provavelmente, o efeito da esterilização ou não da vinhaça não influenciou no crescimento do fungo, medido em massa seca (Fig. 1), e nem no teor de fosfato solubilizado, porquanto a análise estatística não mostrou diferença significativa (teste F). As curvas representativas do

crescimento e da solubilização de fosfato em relação ao tempo de cultivo obedeceram a funções exponenciais de 3º grau, constatando-se equivalência nos produtos máximo e mínimo relativos, respectivamente.

A Tabela 2 mostra que, aumentando-se a concentração de fluorapatita, não se obteve maior solubilização de fosfato. Não se notou também diferenças significativas apreciáveis nas outras características analisadas, exceto nos teores de sólidos e de acidez titulável que variaram de aproximadamente 16 a 20 $\mu\text{E}/\text{ml}$.

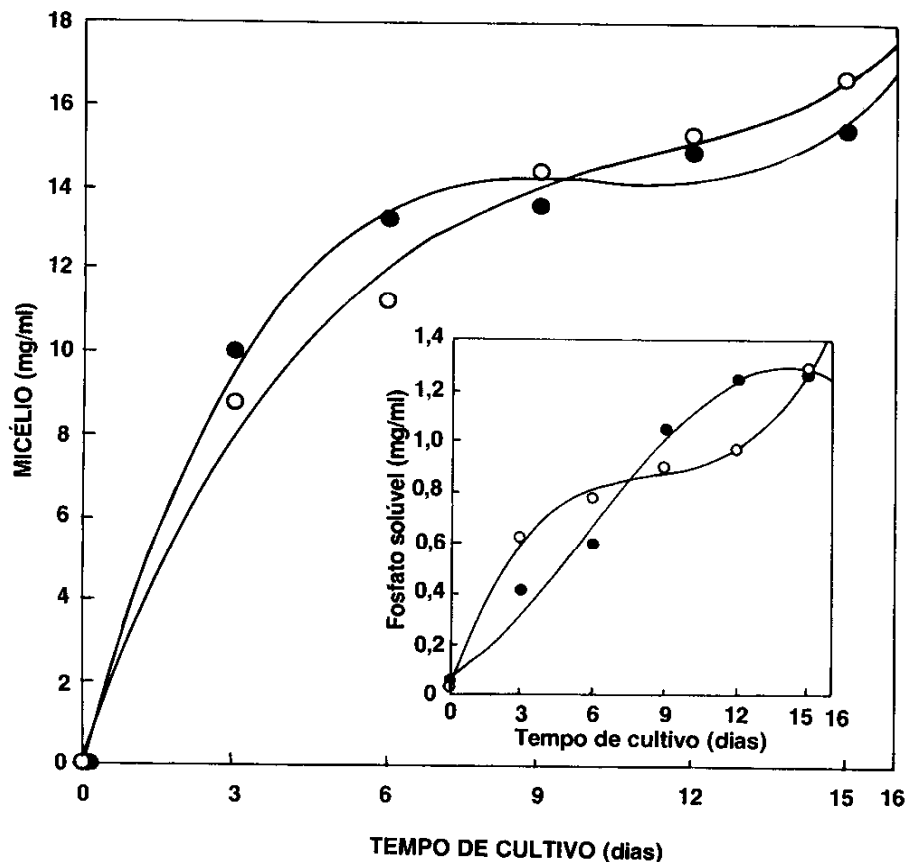


FIG. 1. Crescimento de *A. niger* e solubilização de fluorapatita em vinhaça esterilizada (o) e não esterilizada (●). Volumes de 30 ml de vinhaça contendo 5 g/l fluorapatita foram inoculados com uma suspensão do fungo e incubados a 30°C. Nos tempos determinados, mediu-se o crescimento do fungo e o teor de fosfato solubilizado.

TABELA 2. Solubilização de fluorapatita por *A. niger* empregando-se vinhaça mista com 35% de melão como substrato. O fungo foi cultivado por 9 dias a 30°C, em cultura estacionária. Após o tempo de cultivo, foram medidas as características químicas do meio isento de micélio.

Fluorapatita (g/l)	pH final	Acidez titulável (µE/ml)	Micélio (mg/ml)	Sólidos totais (mg/ml)	Sólidos solúveis (mg/ml)	Açúcares totais (mg/ml)	Açúcares redutores (mg/ml)	Fosfato solúvel	
								(mg/ml)	% do total ⁺
5,0	3,8	17,70	4,52	17,72	8,44	2,24	0,61	0,72	44,1
7,5	3,7	19,75	4,18	19,42	7,56	2,26	0,57	0,74	29,9
10,0	3,9	15,95	4,90	20,18	6,88	2,18	0,58	0,73	22,2
F	8,72*	4,52*	2,08NS	6,90*	1,48NS	1,15NS	17,50*	0,08NS	
CV	2,47	10,07	11,04	4,96	15,09	3,49	1,48	7,50	
DMS	0,18	3,53	-	1,87	-	-	0,02	-	

(+) Fluorapatita = 32,8% PO₄³⁻; NS = não significativo; (*) significativo ao nível de 5% de probabilidade; F = teste F; CV = coeficiente de variação em %; DMS = diferença mínima significativa pelo teste Tukey (P = 0,05).

Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram uma resposta semelhante à observada na Tabela 2, porém, os teores de acidez titulável e de fosfato aumentaram, aproximando-se de 23 µE/ml e 1,1 mg/ml, respectivamente.

Fosfatos de rochas de diferentes origens e conteúdos em fósforo foram adicionados à vinhaça mista inoculada com *A. niger* (Tabela 4). Os resultados obtidos mostraram que a variação do fosfato de rocha acarretou diferenças significativas nos teores de fosfato solúvel, acidez titulável e peso seco de micélio, não se constatando diferenças nos valores de pH entre os tratamentos. Quando o concentrado apatítico grosso foi adicionado à vinhaça obteve-se o maior acúmulo de fosfato solúvel, de 1,08 mg/ml, seguindo-se a apatita-padrão, 0,70 mg/ml, e o bitolado Mitsui, 0,67 mg/ml. Contudo, quando se relacionou o teor de fosfato solubilizado com o total existente no fosfato de rocha (Tabela 4), verificou-se que maior acúmulo de fosfato solúvel ocorreu com o bitolado Patos de Minas, de 72% (p/p), seguido do concentrado apatítico grosso, 45% (p/p), e do minério fosfático Patos de Minas, 44% (p/p). O crescimento do fungo em vinhaça acrescida de fosfato de alumínio foi comparável ao obtido com os outros fosfatos de ro-

cha, porém, a sua capacidade solubilizadora foi bem inferior (Tabela 4).

Os resultados obtidos neste trabalho mostram o efeito da composição da vinhaça sobre a capacidade de solubilização de fluorapatita pelo fungo *A. niger*. Além do mais, foi demonstrado que o efeito do fungo sobre o acúmulo de fosfato solúvel está na dependência do tipo de fosfato de rocha acrescido à vinhaça.

A possibilidade do crescimento de bactérias contaminantes da vinhaça, que poderiam causar prejuízo no rendimento, como foi constatado em *A. oryzae* que teve alterada a parede celular (Instituto Nacional de Tecnologia 1978), mostrou a necessidade da comparação do crescimento de *A. niger* em vinhaça esterilizada ou não. Como resultado, comprovou-se que o crescimento do fungo e a solubilização da fluorapatita foi independente da esterilização ou não da vinhaça. É possível que fatores como a temperatura de 90°C quando a vinhaça sai na usina, a realização dos ensaios logo após o resfriamento, e a predominância da espécie inoculada devam ter contribuído para não haver comprometimento dos resultados obtidos na vinhaça não esterilizada quando comparados com a vinhaça esterilizada.

TABELA 3. Solubilização de fluorapatita por *A. niger* empregando-se vinhaça mista com 9% de mel como substrato. O fungo foi cultivado por 9 dias a 30°C, em cultura estacionária. Após o tempo de cultivo, foram medidas as características químicas do meio isento de micélio.

Fluorapatita (g/l)	pH final	Acidez titulável (µE/ml)	Micélio (mg/ml)	Sólidos totais (mg/ml)	Sólidos solúveis (mg/ml)	Açúcares totais (mg/ml)	Açúcares redutores (mg/ml)	Fosfato solúvel	
								(mg/ml)	% do total ⁺
5,0	3,6	22,65	3,23	15,00	5,89	3,52	0,46	1,05	64,2
7,5	3,6	22,95	3,69	16,16	5,60	3,17	0,46	1,08	43,8
10,0	3,6	23,95	3,33	18,42	5,68	3,30	0,44	1,15	35,2
F	0,06NS	0,27NS	2,82NS	20,75*	0,48NS	1,90NS	7,30*	3,30NS	
CV	3,62	11,30	8,48	4,62	10,25	5,45	2,02	5,32	
DMS	-	-	-	1,51	-	-	0,01	-	

(+) Fluorapatita = 32,8% PO₄³⁻; NS = não significativo; (*) significativo ao nível de 5% de probabilidade; F = teste F; CV = coeficiente de variação em %; DMS = diferença mínima significativa pelo teste Tukey (P = 0,05).

TABELA 4. Solubilização de diferentes fosfatos de rocha, empregados na concentração de 5 g/l de vinhaça mista como substrato, por *A. niger*.

Fosfato ^Δ	Micélio p. seco (mg/ml)	pH final	Acidez titulável (µE/ml)	Fosfato solúvel	
				(mg/ml)	% do total ⁺
Apatita de Araxá (25%)	5,37	3,7	15,19	0,49	29,9
Concentrado Catalão (36%)	5,10	4,1	11,10	0,53	22,1
Fosfino (33%)	4,19	3,7	16,85	0,57	25,8
Apatita-padrão (35%)	5,24	3,8	14,65	0,70	30,1
Concentrado apatítico grosso (36%)	4,57	3,7	15,45	1,08	44,7
Concentrado apatítico fino (33%)	4,48	3,8	16,20	0,64	29,0
Concentrado apatítico replotado (32%)	4,34	3,8	14,65	0,54	25,1
Minério fosfático Catalão (16%)	4,31	3,7	13,85	0,34	31,4
Minério fosfático Araxá (15%)	3,87	3,8	12,70	0,22	21,8
Minério fosfático Patos de Minas (15%)	4,68	3,8	13,55	0,44	43,7
Bitolado Camig (24%)	4,46	3,7	16,05	0,62	38,8
Bitolado Mitsui (28%)	4,91	3,7	17,10	0,67	36,0
Bitolado Araxá (30%)	4,89	3,7	17,15	0,60	30,1
Bitolado Patos de Minas (11%)	4,29	3,7	15,15	0,53	72,0
Fosfato de alumínio Piracava (16%)	4,57	3,6	14,40	0,08	7,7
F	2,73*	1,43NS	13,94*	42,15*	
CV	9,44	6,11	5,27	8,97	
DMS	1,31	-	2,37	0,16	

(+) Fluorapatita = 32,8% PO₄³⁻; NS = não significativo ao nível de 5% de probabilidade; F = teste F; CV = coeficiente de variação em %; DMS = diferença mínima significativa pelo teste de Tukey (P = 0,05).

^Δ Entre parênteses, tem-se a concentração de P₂O₅ (p/p) dada pelo fabricante.

Em conformidade com resultados prévios (Nahas et al. 1990) e de outros laboratórios (Instituto Nacional de Tecnologia 1978 e Srur & Aquarone 1983), constatou-se uma redução substancial nos teores de açúcares e de sólidos após o crescimento do fungo. A solubilização da fluorapatita deve ter sido decorrente, principalmente, da secreção de ácidos orgânicos pelo fungo - que apresentaram ação quelante, liberando fosfato solúvel (Hayman 1975) -, e não do abaixamento do pH porquanto em uma das vinhaças não se obteve variação desse parâmetro após crescimento do fungo (Tabelas 1 e 3). Contudo, os teores de acidez titulável nas vinhaças (Tabela 1), diminuíram após a incubação do fungo, demonstrando que a vinhaça por si só não tem efeito solubilizador (Nahas et al. 1990) e que a qualidade do ácido secretado pelo fungo teria maior efeito na solubilização que a sua quantidade (Agnihotri 1970). Não foi possível identificar as variáveis que permitiram a solubilização de quantidades diferentes de fluorapatita quando se empregaram vinhaças apresentando composição diversa (Tabelas 2 e 3). No entanto, é possível conjecturar que o maior teor de açúcares totais encontrado na vinhaça a 9% de mel tenham conduzido à maior produção de ácidos, e, por conseguinte, à maior solubilização da fluorapatita. Em adição, é possível que o menor crescimento do fungo nessa vinhaça tenha favorecido o acúmulo de maior quantidade de fosfato solúvel.

Dentre os diferentes fosfatos de rocha utilizados como fonte de fósforo, o concentrado apatítico grosso foi o que propiciou maior acúmulo de fosfato solúvel (1,08 mg/ml). Contudo, em termos de rendimento, com o bitolado Patos de Minas obteve-se uma solubilização correspondente a 72% do total. A solubilização independeu do teor de fosfato no mineral e do valor final do pH, mas dependeu da acidez titulável, confirmando as suposições feitas neste trabalho, porquanto obteve-se uma correlação significativa entre esses dois parâmetros ($t = 4,08$).

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostram que o efeito solubilizador do fungo *A. niger* depende do tipo de vinhaça utilizado como substrato e do fosfato de rocha adicionado ao meio de cultivo como fonte de fósforo.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pela bolsa de pesquisa (Nº 301046/82) auferida pelo primeiro autor.

REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI, V.P. Solubilization of insoluble phosphates by some fungi isolated from nursery seedbeds. **Canadian Journal of Microbiology**, v.16, p.877-880, 1970.
- AMES, B.M. Assay of inorganic phosphate and phosphatases. **Methods in Enzymology**, v.8, p.115-118, 1966.
- BRADY, N.C. **The nature and properties of soils**. New York: MacMillan, 1974. 639p.
- CEREZINE, P.C.; NAHAS, E.; BANZATTO, D.A. Soluble phosphate accumulation by *Aspergillus niger* from fluorapatite. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.29, p.501-505, 1988.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, F.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-356, 1956.
- HAYMAN, D.S. Phosphorus cycling by soil microorganisms and plant roots. In: WALKER, N. **Soil Microbiology**, London: Butterworths, 1975. p.67-91.
- HOFFLAND, E.; FINDENEGG, G.R.; NELEMANS, J.A. Solubilization of rock phosphate by rape. I. Evaluation of the role of the nutrient uptake pattern. **Plant and Soil**, v.113, p.155-160, 1989.
- INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA (Rio de Janeiro, RJ). Novas perspectivas para o tratamento microbiológico do vinhoto. **Informativo do INT**, v.11, p.3-8, 1978.

- ISHISAKA, E.I.; ASSIS, L.C.; NAHAS, E. Ação do *Aspergillus niger* no acúmulo de fosfato solúvel em meio de vinhaça. **Ciência e Cultura**, v.40, p.730, 1988.
- KUCEY, R.M.N. Effect of *Penicillium bilaia* on the solubility and uptake of P and micronutrients from soil by wheat. **Canadian Journal of Soil Science**, v.68, p.261-270, 1988.
- KUCEY, R.M.N.; JANZEN, H.H.; LEGGETT, M.E. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. **Advances in Agronomy**, v.42, p.199-228, 1989.
- MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Ceres, 1980. 254p.
- NAHAS, E.; BANZATTO, D.A.; ASSIS, L.C. Fluorapatite solubilization by *Aspergillus niger* in vinasse medium. **Soil Biology and Biochemistry**, v.22, p.1097-1101, 1990.
- SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v.195, p.19-23, 1952.
- SRUR, A.U.O.S.; AQUARONE, E. Depuração de vinhaça pela produção de biomassa de *Rhodotorula gracilis*. **STAB**, v.2, p.34-37, 1983.
- THOMAZ, G.V.; SHANTARAM, M.V.; SARASWATHY, N. Occurrence and activity of phosphate-solubilizing fungi from coconut plantation soils. **Plant and Soil**, v.76, p.357-364, 1985.