

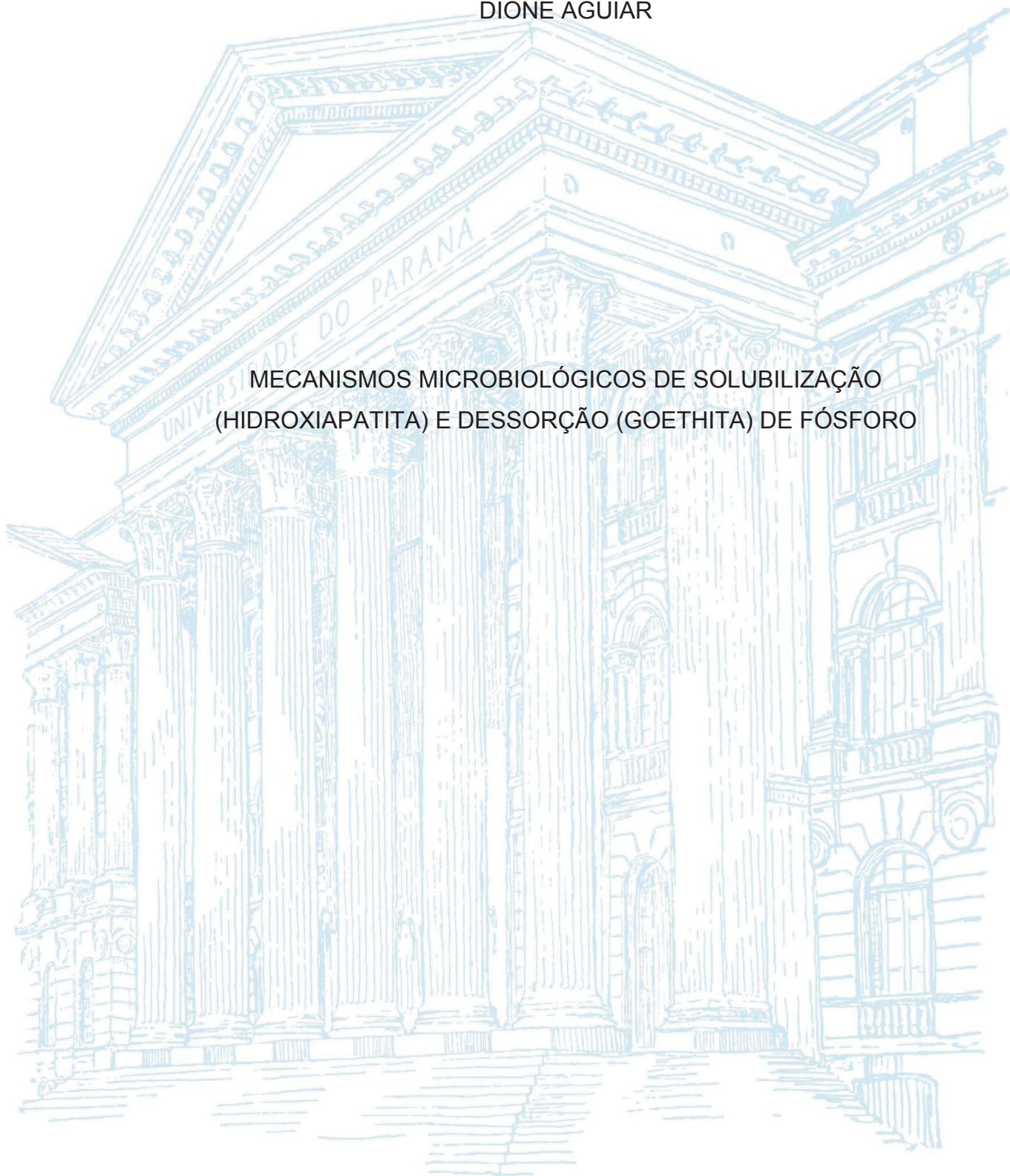
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DIONE AGUIAR

MECANISMOS MICROBIOLÓGICOS DE SOLUBILIZAÇÃO
(HIDROXIAPATITA) E DESSORÇÃO (GOETHITA) DE FÓSFORO

CURITIBA

2021



DIONE AGUIAR

MECANISMOS MICROBIOLÓGICOS DE SOLUBILIZAÇÃO
(HIDROXIAPATITA) E DESSORÇÃO (GOETHITA) DE FÓSFORO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência do Solo.

Orientador: Prof. Dr. Vander de Freitas Melo

Coorientadora: Prof. Dra. Glaciela Kaschuk

CURITIBA

2021

Aguiar, Dione

Mecanismos microbiológicos de solubilização (Hidroxiapatita) e dessorção (Goethita) de Fósforo. / Dione Aguiar. - Curitiba, 2021.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo.

Orientação: Vander de Freitas Melo

Coorientação: Glaciela Kaschuk

1. Mineralogia. 2. Ciência do solo. 3. Fósforo. I. Melo, Vander de Freitas. II. Kaschuk, Glaciela. III. Título. IV. Universidade Federal do Paraná.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA DO SOLO -
40001016014P4

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA DO SOLO da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **DIONE AGUIAR** intitulada: **MECANISMOS MICROBIOLÓGICOS DE SOLUBILIZAÇÃO (HIDROXIAPATITA) E DESSORÇÃO (GOETHITA) DE FÓSFORO**, sob orientação do Prof. Dr. VANDER DE FREITAS MELO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Janeiro de 2021.

Assinatura Eletrônica
29/01/2021 13:23:26.0
VANDER DE FREITAS MELO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
29/01/2021 13:04:52.0
MARCO ANTONIO NOGUEIRA
Avaliador Externo (EMBRAPA)

Assinatura Eletrônica
29/01/2021 13:37:54.0
ANTONIO CARLOS VARGAS MOTTA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
01/02/2021 09:45:52.0
ADRIANA PEREIRA DA SILVA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA)

Assinatura Eletrônica
29/01/2021 13:10:39.0
DIVA DE SOUZA ANDRADE
Avaliador Externo (INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ)

A minha querida mãe Almiria, ao meu pai Wilson (*in memoriam*), aos meus
irmãos Vanessa e Diego, e Eugenia, com amor

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela fé que me manteve firme nessa longa jornada, e pela oportunidade de me permitir chegar até aqui.

À minha família: minha mãe, Almiria, por nunca ter duvidado que eu poderia realizar os meus sonhos, por estar sempre ao meu lado. À Eugenia, pelo apoio, amor e pela compreensão. À minha irmã, por ter sido meu porto seguro, pelo exemplo de perseverança, pela garra e pelos ombros nos momentos tão dolorosos e difíceis! Ao meu amado irmão, a quem tenho muito orgulho, e que sempre possui um ombro para me receber!

Ao meu professor orientador, Vander de Freitas Melo, que irei levar como referência de ser humano e profissional. Por ter sido humano, presente, tolerante, e por ter acreditado que eu seria capaz de realizar esse trabalho. Pelo apoio incondicional prestado, as suas críticas construtivas, as discussões e reflexões foram fundamentais ao longo de todo o percurso.

À professora e coorientadora Glaciela Kaschuk, pela compreensão e por sempre instigar a busca do conhecimento. Pela amizade e apoio em um momento tão difícil, em que eu tinha certeza que não chegaria ao fim do doutorado.

Ao professor Henrique S.S. Duarte (PPGAV) por ter cedido o uso do laboratório de microbiologia, pelos direcionamentos e questionamentos.

À pesquisadora Krisle, da Embrapa Floresta, pelo suporte na área de microbiologia, conselhos e fundamentais apontamentos e suporte.

Ao Marlon H. Hahn, que me auxiliou nos experimentos de microbiologia, que me socorreu em várias outras etapas, e, mais que tudo isso. Foi meu amigo! Me aconselhando, ouvindo e me apoiando nos momentos mais críticos.

À querida Alecssandra dos Santos, pela amizade, pela disponibilidade em clarificar minhas dúvidas, por todo o apoio e incentivo!

Às minhas amigas queridas: Regiane e Luciane! Vocês, sem dúvida alguma, tornaram essa jornada muito mais leve! Sem nossos cafés, certamente essa jornada teria sido mais pesada!

Às minhas amadas amigas, Adriana e Héliida: Por serem meu porto seguro! Por me apoiarem, por estarem sempre ao meu lado! Por me incentivarem!

Aos professores da Pós-Graduação em Ciência do Solo: Hoje saio uma profissional totalmente diferente e melhor!

Aos amigos que fiz durante essa jornada e que, tenho certeza, terei comigo para o resto da vida, em especial: Selma Barbosa Bastos; Zie K. P. Calábria, Ana Paula Calábria; Alessandra Santos, Nivaldo Sátiro; Marcos Cremonesi; Amanda D. Reis; Ana Caroline Goedert e Isabella Cavalcante.

À Maria Aparecida de Carvalho por toda ajuda e aos amigos do Laboratório de Mineralogia do Solo, pelos momentos de descontração e incentivo.

À Denise De Conti, por toda ajuda de secretaria durante o doutorado e pelas palavras incentivadoras.

À TOTAL BIOTECNOLOGIA pelo apoio para realização do experimento microbiológico e ao IAPAR, pela cessão dos microrganismos.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo, que sem a qual, seria impossível para mim fazer o doutorado.

A todos que de alguma forma contribuíram para execução e término desse trabalho e que acreditaram em mim, minha gratidão!

“For a research worker the unforgotten moments of his/her life are those rare ones, which come after years of plodding work, when the veil over nature's secret, seems suddenly to lift, when what was dark and chaotic appears in a clear and beautiful light pattern.”

(Gerty Cori)

RESUMO

Dada importância do fósforo (P) no metabolismo microbiano, estes a fim de superar a baixa disponibilidade deste elemento na solução do solo, em virtude da adsorção aos óxidos de Fe e Al, ou precipitação, desenvolveram estratégias para aquisição de P. O objetivo do presente trabalho foi inicialmente através de revisão (1) descrever os processos de dissolução da hidroxiapatita e dessorção do P a partir dos óxidos de ferro através dos mecanismos microbiológicos, uma vez que os presentes estudos explicam de modo muito simplificado, ou pouco exploram o papel dos mecanismos microbiológicos sobre a superfície dos minerais; (2) estudar os mecanismos biológicos de dissolução da hidroxiapatita (HPA), em decorrência da atividade dos microrganismos; (3) verificar a eficiência de microrganismos em liberação das formas fixadas (esfera interna) de P nos óxidos de Fe (goethita). Os experimentos para a hidroxiapatita e Goethita foram realizados utilizando-se os microrganismos: por *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.*, *Pseudozyma crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli*, sendo avaliada a eficiência dos mesmos em relação a produção de sideróforos, dessorção do P dos óxidos e dissolução da HPA em meio líquido e sólido. A ação dos ácidos orgânicos (tartárico, láctico, oxálico, málico, malônico, succínico, cítrico, fumárico, e um MIX com todos eles) sobre as diferentes fontes minerais, foi avaliada para os tempos de 0, 5, 7, 10, 20, 40 e 60 minutos, para as seguintes concentrações de cada ácido: 0, 5, 10, 20, 50, 100 e 150 µM. Para a fonte goethita, a eficiência na dessorção de P está relacionada com o crescimento dos microrganismos em meio líquido. A dessorção do P adsorvido foi dependente do tempo de contato com a goethita e da acidificação do meio, promovida pela atividade dos microrganismos. Para a HPA o tempo de incubação dos microrganismos foi importante para aumentar a dissolução da HPA. O principal mecanismo associado à dissolução da HPA foi a acidificação do meio pelos microrganismos. A eficiência dos ácidos orgânicos na solubilização da HPA reduz com o tempo de incubação. Em relação à goethita, definiu-se uma hipótese combinada da ação dos ácidos orgânicos na dessorção do P: efeito de protonação da superfície do mineral e troca de ligantes entre o ácido orgânico dissociado e o fosfato adsorvido por esfera interna.

Palavras chave: Mineralogia 1. Ciência do Solo 2. Mecanismos Microbiológicos 3. Fósforo 4.

ABSTRACT

Given the importance of phosphorus (P) to microbial metabolism, soil microorganisms developed strategies for the P-acquisition, in order to overcome the unavailability of this element in the soil solution, due to its adsorption to Fe and Al oxides, or precipitation. The present work aimed, initially, (1) (based on a literature review) to describe the process of hydroxyapatite dissolution and P desorption from iron oxides due to microbiological mechanisms role; (2) study the biological mechanisms for dissolving hydroxyapatite (HPA), (3) verify the efficiency of microorganisms in releasing the fixed forms (inner sphere) of P from iron oxides (goethite). The experiments with hydroxyapatite and Goethite were carried out using the microorganisms: *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.*, *Pseudozyma crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*, where were evaluated their efficiency in promoting P desorption and solubilization through siderophore production, acidification in solid and liquid medium. The role of organic acids (tartaric, lactic, oxalic, malic, malonic, succinic, citric, fumaric, and a MIX with all of them) on the different mineral sources, were evaluated for the times of 0, 5, 7,10, 20, 40 and 60 minutes, for the following concentrations of each acid: 0, 5, 10, 20, 50, 100 and 150 μM . For Goethite, the efficiency in the P-desorption was related to the growth of microorganisms in liquid medium. P-desorption on the time of contact with goethite and the acidification of the medium was promoted by the activity of the microorganisms. For HPA, the time of incubation increased the dissolution. The main mechanism associated with the dissolution of HPA was the acidification of the medium by microorganisms. The efficiency of organic acids in solubilizing HPA decreases with incubation time. Regarding to goethite, a combined hypothesis was defined for the action of organic acids in P-desorption of P: protonation effect in the mineral surface and ligand exchange between dissociated organic acid and phosphate adsorbed by the inner complex.

Keywords: Mineralogy, Soil Science 1. Microbiological Mechanisms 2. Phosphorous

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- FIGURA 1- ESTRUTURA CRISTALINA DA GOETHITA33
- FIGURA 2- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE ADSORÇÃO DO $H_2PO_4^-$ POR ESFERA EXTERNA NA DUPLA CAMADA DIFUSA E NA CAMADA STERN E ADSORÇÃO DE ESFERA INTERNA NA SUPERFÍCIE DO ÓXIDO DE FE (MODELO DE GOUY-CHAPMAN-STERN).35
- FIGURA 3- ESTRUTURA CRISTALINA DA HIDROXIAPATITA.....37
- FIGURA 4- EFEITO DO PH SOBRE A DISSOCIAÇÃO DO ÁCIDO ACÉTICO.....40
- FIGURA 5- EXEMPLOS DE DESPROTONAÇÕES E FORMAÇÃO DE CARGAS NEGATIVAS EM ÁCIDOS ORGÂNICOS MONO, DI E TRICARBOXÍLICOS.....41
- FIGURA 6- MODELO CONCEITUAL DA AÇÃO DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS LIBERADOS PELA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO SOLO SOBRE A DESSORÇÃO DE P DOS ÓXIDOS DE FE. OS RETÂNGULOS NA COR LARANJA COM LINHAS CONTÍNUAS REPRESENTAM AS FRAÇÕES DE P NO SOLO. AS SETAS INDICAM OS FLUXOS DO P42
- FIGURA 7- FORMAÇÃO DE COMPLEXO DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS NA SUPERFÍCIE DOS ÓXIDOS DE FE.....45
- FIGURA 8- MODELO CONCEITUAL DA AÇÃO DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS LIBERADOS PELA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO SOLO SOBRE A DISSOLUÇÃO DE P A PARTIR DOS MINERAIS À BASE DE CA. OS RETÂNGULOS EM COR ROSA COM LINHAS CONTÍNUAS REPRESENTAM AS FRAÇÕES DE P NO SOLO.47
- FIGURA 9- PRINCIPAIS GRUPOS FUNCIONAIS PRESENTES NOS SIDERÓFOROS: A) ÁCIDO A-HIDROXICARBOXÍLICO; B) CATECÓIS; C) ÁCIDO HIDROXÂMICO. A PARTIR DOS GRUPOS FUNCIONAIS, DA SUA CONFORMAÇÃO E ÍONS QUE O COMPÕE, OS SIDERÓFOROS SÃO COLOCADOS EM CLASSES QUÍMICAS. DENTRE AS PRINCIPAIS ESTÃO: D) RHIZOFERRINA (COM GRUPOS FUNCIONAIS HIDROXICARBOXILADOS); E) ANGUIBACTINA (GRUPOS FUNCIONAIS CATECOL-HIDROXÂMICO); F) AEROBACTINA (GRUPOS FUNCIONAIS A-

HIDROXICARBOXILADOS; G) FERRICROMO, FORMANDO COMPLEXO COM FE (GRUPOS FUNCIONAIS HIDROXAMATO); H) ENTEROBACTINA (COM GRUPOS FUNCIONAIS CATECOLADOS)	50
FIGURA 10- DOBRAMENTO DA ENTEROBACTINA AO FORMAR O COMPLEXO FE(III)-ENTEROBACTINA.....	51
FIGURA 11- MECANISMO DE DESSORÇÃO DO P DA SUPERFÍCIE DOS ÓXIDOS DE Fe ATRAVÉS DA PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS PELOS MICRORGANISMOS	53

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 -ESTRUTURA DA HIDROXIAPATITA.....	75
FIGURA 2 -ESQUEMA DA DILUIÇÃO SERIADA REALIZADA NO EXPERIMENTO	80
FIGURA 3 -DIFRATOGRAMA DA HIDROXIAPATITA SINTÉTICA	92
FIGURA 4 -DIFRATOGRAMA DE HIDROXIAPATITA SINTETIZADA. AS POSIÇÕES DE BRAGG ENCONTRADAS PELOS AUTORES SÃO DEMONSTRADAS COM LINHAS VERDES NA VERTICAL.....	93
FIGURA 5 -MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA EVIDENCIANDO A MORFOLOGIA DA HIDROXIAPATITA. (APROXIMAÇÃO DE 40.000X)	94
FIGURA 6 -(A) ÁREAS AMOSTRADAS PARA A COMPOSIÇÃO QUÍMICA QUALITATIVA DA HIDROXIAPATITA, REALIZADA POR EDS; (B) DISTRIBUIÇÃO DE CA, (C) DISTRIBUIÇÃO DE P E (D) DISTRIBUIÇÃO DE O.	94
FIGURA 7- ANÁLISE DE INFRAVERMELHO DA HIDROXIAPATITA SINTÉTICA ..	96
FIGURA 8 -CONCENTRAÇÃO DE P-DISPONÍVEL NOS DIFERENTES TRATAMENTOS, SOB AÇÃO DOS MICRORGANISMOS.	97
FIGURA 9 -EFEITO DO PH SOBRE AS DIFERENTES FONTES DE P.	98
FIGURA 10 -CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS SUBMETIDOS À DIFERENTES FONTES DE P: A: <i>Bacillus sp.</i> B: <i>Bacillus subtilis</i> ; C: <i>P. crassa</i> ; D: <i>S. cerevisiae</i> ; E: <i>E. coli</i>	101

FIGURA 11 - DISSOCIAÇÃO DO ÁCIDO OXÁLICO E FORMAÇÃO DE CARGA NOS GRUPOS FUNCIONAIS.....	102
FIGURA 12 - CURVA DE CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS. CADA PONTO REPRESENTA A MÉDIA DAS CINCO DETERMINAÇÕES REALIZADAS DURANTE O CRESCIMENTO NO MEIO CAS-BLUE ..	104
FIGURA 13 - SCREENING DA PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS PELOS MICRORGANISMOS AVALIADAS EM MEIO COM PRIVAÇÃO DE Fe.	106
FIGURA 14 - PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS PELOS MICRORGANISMOS EM MEIO CONTENDO HIDROXIAPATITA.....	107
FIGURA 15 - AÇÃO DO MIX DE ÁCIDOS ORGÂNICOS SOBRE A DISSOLUÇÃO DA HIDROXIAPATITA E LIBERAÇÃO DO P PARA A SOLUÇÃO	108
FIGURA 16 - EFICIÊNCIA NA DISSOLUÇÃO DA HIDROXIAPATITA PARA SOLUBILIZAÇÃO DO P, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO SUCCÍNICO.....	110
FIGURA 17 - EFICIÊNCIA NA DISSOLUÇÃO DA HIDROXIAPATITA PARA SOLUBILIZAÇÃO DO P, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO LÁTICO.....	111
FIGURA 18 - EFICIÊNCIA NA DISSOLUÇÃO DA HIDROXIAPATITA PARA SOLUBILIZAÇÃO DO P, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO MÁLICO.....	113
FIGURA 19 - EFICIÊNCIA NA DISSOLUÇÃO DA HIDROXIAPATITA PARA SOLUBILIZAÇÃO DO P, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO MALÔNICO.....	113
FIGURA 20 - EFICIÊNCIA NA DISSOLUÇÃO DA HIDROXIAPATITA PARA SOLUBILIZAÇÃO DO P, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO OXÁLICO.....	114
FIGURA 21- EFICIÊNCIA NA DISSOLUÇÃO DA HIDROXIAPATITA PARA SOLUBILIZAÇÃO DO P, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO FUMÁRICO	115
FIGURA 22 - EFICIÊNCIA NA DISSOLUÇÃO DA HIDROXIAPATITA PARA SOLUBILIZAÇÃO DO P, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO CÍTRICO.....	116

FIGURA 23 - COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS ÁCIDOS QUE APRESENTARAM MELHOR EFICIÊNCIA EM PROMOVER A DISSOLUÇÃO DA HIDROXIAPATITA E SOLUBILIZAÇÃO DO P.....	117
FIGURA 24 - ESTRUTURA DOS ÁCIDOS FUMÁRICO, SUCCÍNICO, MÁLICO, TARTÁRICO E CÍTRICO.....	118

CAPÍTULO 3

FIGURA 1- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE ADSORÇÃO DO H ₂ PO ₄ ⁻ POR ESFERA EXTERNA NA DUPLA CAMADA DIFUSA E NA CAMADA STERN E ADSORÇÃO DE ESFERA INTERNA NA SUPERFÍCIE DO ÓXIDO DE Fe (MODELO DE GOUY-CHAPMAN-STERN).....	133
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD2-GOETHITA SINTETIZADA, SECA E MACERADA.....	135
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD3 - DIÁLISE EM BANDEJAS DAS AMOSTRAS DE GOETHITA SATURADAS COM P.....	137
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD4 - FUNCIONALIZAÇÃO DA RESINA TROCADORA DE ÂNIONS.....	137
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD5 - AMOSTRAS PREPARADAS COM MOLIBDATO – ÁCIDO ASCÓRBICO, APÓS EXTRAÇÃO COM RESINA.....	139
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD6 - DIFRATOGRAMA DE RAIOS X (DRX) DA GOETHITA SINTETIZADA ANTES DO TRATAMENTO COM OXALATO DE AMÔNIO.....	145
FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD7 - MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA EVIDENCIANDO A MORFOLOGIA ACICULAR DA GOETHITA SINTETIZADA.....	146
FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD8 - PARTÍCULAS DE GOETHITA ESCOLHIDAS PARA ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MICROQUÍMICA POR EDS (RESULTADOS NA TABELA 3) (A); MAPA DE DISTRIBUIÇÃO QUÍMICA DE FE (B), O (C) E C (C).....	146
FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD9 - PARTÍCULAS DE GOETHITA SELECIONADAS PARA ANÁLISE MICROQUÍMICA COM EDS (RESULTADOS NA TABELA 3).....	148

FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD10 - ESPECTRO DA GOETHITA SINTETIZADA ANTES DO TRATAMENTO COM OXALATO DE AMÔNIO.....	149
FIGURA 11 - ESPECTRO DA GOETHITA SINTETIZADA APÓS O TRATAMENTO COM OXALATO DE AMONÔNIO	150
FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD12- ESPECTRO DA GOETHITA SINTETIZADA APÓS O TRATAMENTO COM OXALATO DE AMÔNIO E COM H ₂ PO ₄ - ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA.	151
FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD13-CONCENTRAÇÃO DE P SOLÚVEL NOS DIFERENTES TRATAMENTOS, SOB AÇÃO DOS MICRORGANISMOS.	152
FIGURA 14 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD14-EFEITO DAS DIFERENTES FONTES DE P SOBRE OS VALORES DE PH.	153
FIGURA 15 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD15 - CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS SUBMETIDOS À DIFERENTES FONTES DE P: A: <i>Bacillus sp.</i> ; B: <i>Bacillus subtilis</i> ; C: <i>P. crassa</i> ; D: <i>S. cerevisiae</i> ; E: <i>E. coli</i>	156
FIGURA 16 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD16 – PROTONAÇÃO DA SUPERÍCIE DOS ÓXIDOS DE FE PELA ACIFIFICAÇÃO MICROBIANA DO MEIO.....	157
FIGURA 17 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD17 - CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS NO EXPERIMENTO DE PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS NA PRESENÇA DE GOETHITA. CADA PONTO REPRESENTA A MÉDIA DAS CINCO DETERMINAÇÕES REALIZADAS DURANTE O CRESCIMENTO NO MEIO CAS-BLUE	159
FIGURA 18 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD18 - PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS E CONCENTRAÇÃO DE P DESSORVIDO DA GOETHITA PELOS MICRORGANISMOS AVALIADAS EM MEIO COM PRIVAÇÃO DE Fe.....	160
FIGURA 19 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD19 - DESSORÇÃO DO P ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA À GOETHITA, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO MALÔNICO.	164

FIGURA 20 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD20 - DESSORÇÃO DO P ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA À GOETHITA, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO OXÁLICO.	164
FIGURA 21 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD21 - DESSORÇÃO DO P ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA À GOETHITA, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO LÁCTICO	165
FIGURA 22 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD22 - DESSORÇÃO DO P ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA À GOETHITA, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO MÁLICO.....	165
FIGURA 23 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD23 - DESSORÇÃO DO P ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA À GOETHITA, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO SUCCÍNICO	166
FIGURA 24 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD24 - DESSORÇÃO DO P ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA À GOETHITA, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO CÍTRICO.....	167
FIGURA 25 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD25 - DESSORÇÃO DO P ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA À GOETHITA, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO FUMÁRICO	167
FIGURA 26 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD26- DESSORÇÃO DO P ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA À GOETHITA, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO MIX DE ÁCIDOS.....	169
FIGURA 27 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD27 - COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DAS SITUAÇÕES EM QUE OS ÁCIDOS APRESENTARAM MELHOR EFICIÊNCIA EM PROMOVER A DESSORÇÃO DO P DA GOETHITA	170
FIGURA 28 -REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD28 - AÇÃO DO ÁCIDO ORGÂNICO NA TROCA DE LIGANTE E DESSORÇÃO DO P ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA NA GOETHITA.....	170

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 1 - UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFCS) PARA CADA MICROORGANISMO OBTIDOS ATRAVÉS DA DILUIÇÃO SERIADA....	81
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DO MEIO LÍQUIDO UTILIZADO NOS TRATAMENTOS	84
TABELA 3 - SOLUÇÃO DE MICRONUTRIENTES	85
TABELA 4 - SOLUÇÃO DE MACRONUTRIENTES.....	85
TABELA 5 - CARACTERÍSTICA DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS AVALIADOS.....	90
TABELA 6- COMPOSIÇÃO QUÍMICA (EDS) E TAMANHO DE PARTÍCULAS ESFÉRICAS SELECIONADAS NA FIGURA 6 DE HIDROXIAPATITA .	95
TABELA 7 -ÍNDICE DE SOLUBILIZAÇÃO (IS) DOS MICROORGANISMOS PARA DIFERENTES FONTES DE P.....	103

CAPÍTULO 3

TABELA 1 - TEOR TOTAL DE P ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA NA GOETHITA.....	144
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ESPECTROS DA GOETHITA SINTETIZADA ANALISADOS POR EDS	147
TABELA 3 - MICROCOMPOSIÇÃO QUÍMICA (SEMIQUANTITATIVA) DOS ESPECTROS DA GOETHITA SINTETIZADA APÓS SATURAÇÃO E REMOÇÃO DO P-LÁBIL	148
TABELA 4 - ÍNDICE DE SOLUBILIZAÇÃO (IS) DOS MICROORGANISMOS PARA DIFERENTES FONTES DE P.....	158

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

Al	- Alumínio
-Al-OH	- Aluminol
A.O	- Ácido Orgânico
ASE	- Área superficial específica
ATR-FTIR	- Attenuated Total Reflectance Fourier Transformed Infrared
B.D.A	- Batata Ágar Dextrose
B.O.D	- Biochemical Oxygen Demand
B.E.T	- Brunauer-Emmett-Teller
C	- Carbono
Ca ²⁺	- Cálcio
CaCl ₂	- Cloreto de Cálcio
CaH ₂ PO ₄ ⁺	- Monofosfato de Cálcio
Ca(NO ₃) ₂	- Nitrato de cálcio
Ca ₅ (PO ₄) ₃ OH	- Hidroxiapatita
CTA	- Capacidade de troca de ânions
CTC	- Capacidade de troca de cátions
CuSO ₄ .5H ₂ O	- Sulfato de Cobre
Dh	- Distância de halo
Dc	- Distância da Colônia
DRX	- Difractometria de raios X
USEPA	- United States Environmental Protection Agency
EDTA	- Ácido Etilenodiaminotetracético
Eh	- Potencial redox
EPA	- Environmental Protection Agency
Fe	- Ferro
FeCl ₃ .6H ₂ O	- Cloreto de ferro hexahidratado
α-FeO(OH) (s)	- Óxidohidróxido de Ferro
-Fe-OH	- Ferrol
Goe	- Goethita
H ⁺	- Hidrogênio
HDTMA	- Hexadeciltrimetilamonônio
H ₂ O	- Água
H ₃ BO ₃	- Ácido Bórico
H ₂ PO ₄	- Ortofosfato
HCl	- Ácido Clorídrico
HPA	- Hidroxiapatita

HNO ₃	- Ácido Nítrico
I.S.	- Índice de Solubilização
I.C.C.D	- International Centre for Diffraction Data
ICP-OES	- Espectrofotômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado
K	- Potássio
KH ₂ PO ₄	- Fosfato de potássio
KOH	- Hidróxido de potássio
K ₂ SO ₄	- Sulfato de potássio
Li	- Ligante
MEV-EDS	- Microscopia Eletrônica de Varredura Acoplada com Espectroscopia por Energia Dispersiva
Mg ²⁺	- Magnésio
MgCl ₂	- Cloreto de Magnésio
MgSO ₄	- Sulfato de Magnésio
N	- Nitrogênio
NaOH	- Hidróxido de sódio
NaHCO ₃	- Bicarbonato de sódio
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	- Molibdato de Sódio
(NH ₄) ₂ SO ₄	- Sulfato de Amônio
NBRIP	- National Botanical Research Institute's Phosphate Growth Medium
O	- Oxigênio
OA	- Oxalato de amônio
O.D	- Densidade Óptica
-OH	- Hidroxila
P	- Fósforo
Pe	- Potencial Elétrico
Pi	- Fósforo Inorgânico
Po	- Fósforo Orgânico
pH	- Potencial Hidrogeniônico
pH _{PCZ}	- pH de ponto de carga zero
pKa	- Constante de dissociação
R	- Reflectância
RI	- Reação de Dissolução
RTA	- Resina Trocadora de Ânions
RPM	- Rotação por minuto
S	- Enxofre

Si	- Sílicio
SID	- Sideróforo
Si-OH	- Silanol
SO ₄ ²⁻	- Sulfato
SO ₄ Mn.H ₂ O	- Sulfato de Manganês
Sv	- Silvita
TCP	-Trifosfato de Cálcio
UFC	- Unidade Formadora de Colônia
ZnSo ₄ .7H ₂ O	- Sulfato de Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	25
2	CAPÍTULO 1: MECANISMOS MICROBIOLÓGICOS DE SOLUBILIZAÇÃO (HIDROXIAPATITA) E DESSORÇÃO (GOETHITA) DE P: UMA REVISÃO.....	29
2.3	INTRODUÇÃO.....	31
2.4	IMPORTÂNCIA DA GOETHITA E APATITA PARA A DISPONIBILIDADE DE P NO SOLO.....	32
2.4.1	Goethita	32
2.4.2	Hidroxiapatita.....	37
2.5	MECANISMOS DE SOLUBILIZAÇÃO DE $H_2PO_4^-$ POR MICRORGANISMOS	39
2.5.1	Produção de ácidos orgânicos e acidificação do meio	39
2.5.2	Sideróforos	48
2.5.3	Potencial de próton (pH) e potencial redox (Eh).....	53
2.6	FOSFATASES E MINERALIZAÇÃO DE P A PARTIR DE OUTRAS FRAÇÕES DO SOLO	56
2.6	CONCLUSÕES.....	58
	REFERÊNCIAS	59
3	CAPÍTULO 2: DISSOLUÇÃO DA HIDROXIAPATITA E LIBERAÇÃO DE P ESTRUTURAL POR MECANISMOS MICROBIOLÓGICOS	73
3.1	INTRODUÇÃO.....	75
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	78
3.2.1	Caracterização da amostra de hidroxiapatita (hpa).....	78
3.2.1.1	Difração por raios X (DRX)	78
3.2.1.2	Determinação do teor total de P	78
3.2.1.3	Microscopia eletrônica de varredura acoplada com espectroscopia por energia dispersiva (MEV-EDS)	79
3.2.1.4	Espectroscopia de Infravermelho	79
3.3	Experimentos microbiológicos para solubilização do P	79
3.3.1	Inóculos	79
3.3.2	Análise da eficiência dos microrganismos para solubilização e dissolução de diferentes fontes de P em meio líquido	82

3.3.3	Eficiência dos microrganismos para solubilização e dissolução de diferentes fontes de P em meio sólido	85
3.3.4	Análise da produção de sideróforos	87
3.3.4.1	Preparo do Chromo-Azurol	87
3.3.4.2	Validação da metodologia para detecção de sideróforos	88
3.3.4.3	Eficiência em dissolução da HPA pelos sideróforos	88
3.3.5	Dissolução da hidroxiapatita pela ação de ácidos orgânicos	89
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	90
3.7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
3.7.1	Caracterização da Hidroxiapatita	92
3.7.1.1	Difração por raios x (DRX)	92
3.7.1.2	Microscopia eletrônica de varredura acoplada com espectroscopia por energia dispersiva (MEV-EDS)	93
3.7.1.3	Espectroscopia de Infravermelho – IFRIV	95
3.7.2	Experimentos microbiológicos para solubilização do P	96
3.7.2.1	Análise da eficiência dos microrganismos para solubilização e dissolução de diferentes fontes de P em meio líquido	96
3.2.2	Eficiência dos microrganismos para solubilização e dissolução de diferentes fontes de P em meio sólido	102
3.2.3	Análise da produção de sideróforos	103
3.2.3.1	Validação da metodologia	103
3.2.3.2	Eficiência na dissolução da HPA pelos sideróforos	106
3.2.4	Dissolução da hidroxiapatita pelos ácidos orgânicos	107
3.3	CONCLUSÕES	119
	REFERÊNCIAS	120

4	CAPÍTULO 3: DESSORÇÃO DO P ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA NA GOETHITA POR MECANISMOS MICROBIOLÓGICOS	129
4.3	INTRODUÇÃO	131
4.4	MATERIAL E MÉTODOS	135
4.4.1	Síntese da goethita	135
4.4.2	Concentração da goethita	136
4.4.3	Saturação das amostras com $H_2PO_4^-$	136
4.4.4	Remoção do p solúvel residual e do p adsorvido por esfera externa	137

4.4.4.1	Funcionalização da resina trocadora de ânions (RTA).....	137
4.4.4.2	Extração com a resina funcionalizada	138
4.4.4.3	Extração com Mehlich 1	138
4.5	DETERMINAÇÃO DO P ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA DAS AMOSTRAS SUBMETIDAS AOS CICLOS DE EXTRAÇÕES COM RESINA E MELHLICH 1.....	139
4.5.1	EPA 3052 (HNO ₃ /HF) - Teores totais de P (USEPA, 1998).....	139
4.6	CARACTERIZAÇÃO DA GOETHITA SINTETIZADA	140
4.6.1	Área superficial específica.....	140
4.6.2	Difração de raios x (DRX).....	140
4.6.3	Microscopia eletrônica de varredura acoplada a espectroscopia por energia dispersiva (MEV-EDS)	140
4.6.4	Espectroscopia de Infravermelho	140
4.7	EXPERIMENTOS MICROBIOLÓGICOS PARA DESSORÇÃO DO P ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA À GOETHITA	141
4.7.1	Preparação dos inóculos	141
4.7.2	Análise da eficiência dos microrganismos para dessorção do P em meio líquido	141
4.7.3	Análise da eficiência dos microrganismos para dessorção do P em meio sólido	142
4.7.4	Análise da produção de sideróforos	142
4.7.4.1	Preparo do Chromo-Azurol.....	142
4.7.4.2	Validação da metodologia para detecção dos sideróforos	143
4.7.4.3	Eficiência em dessorção do P pelos sideróforos	143
4.7.5	Eficiência em dessorção do P pelos ácidos orgânicos	143
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	143
4.9	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	144
4.9.1	Caracterização da goethita sintetizada.....	144
4.9.1.1	Teor total de P da goethita após uso da membrana de diálise e extrações sucessivas com resina e Mehlich 1	144
4.9.1.2	Área Superficial Específica (ASE)	144
4.9.1.3	Difração de Raios X (DRX).....	144
4.9.1.4	Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada Espectroscopia por energia dispersiva (MEV-EDS)	145

4.9.1.5	Espectroscopia de Infravermelho (IF-IV)	148
4.9.1.6	Goethita antes do tratamento com oxalato de amônio	148
4.9.1.7	Goethita após o tratamento com oxalato de amônio	149
4.9.2	Experimentos microbiológicos para dessorção do p adsorvidos por esfera interna da goethita.....	152
4.9.2.1	Eficiência na dessorção do P por microrganismos em meio líquido	152
4.9.2.2	Eficiência na dessorção do P por microrganismos em meio sólido	157
4.9.2.3	Eficiência na dessorção do P da goethita por sideróforos	159
4.9.2.4	Eficiência na dessorção do P da goethita por ácidos orgânicos	161
5	CONCLUSÕES	171
	REFERÊNCIAS.....	172
	REFERÊNCIAS.....	179

1 INTRODUÇÃO GERAL

O fósforo é um importante nutriente para o crescimento e desenvolvimento das plantas e dos microrganismos no solo, uma vez que participa de diversos processos metabólicos como, síntese de biomoléculas, fotossíntese, divisão celular, regulação da atividade enzimática, composição do material genético (BERTRAND; DOZOIS, 2011; RAGHOTHAMA; KARTHIKEYAN, 2005; SAEID et al., 2018).

Contudo, por ser altamente reativo, em decorrência de suas características químicas (eletronegativo) (LOPEZ-ARREDONDO et al., 2014; POSNER, 1979; SRINIVASAMURTHY, DAYAMANI, 2014; WENG et al., 2012), em solos altamente intemperizados estes ânions tendem a reagir com os sítios de carga presentes na superfície dos óxidos de Fe, como a Goethita, sendo portanto, adsorvidos, podendo formar complexos de esfera externa, ou interna na superfície dos óxi-hidróxidos de Fe (BELELLI et al., 2014; CELI, L.; BARBERIS, MARSAN, 2000; CHITRAKAR et al., 2006; PARFITT, 2019; ZHONG et al., 2007). O P ligado por complexo de esfera externa (lábil), pode retornar a solução do solo, a fim de que as condições de equilíbrio sejam refeitas. Contudo, as formas adsorvidas formando complexos de esfera interna, dificilmente voltam para a solução, em decorrência da característica da ligação química (covalente) ((BLEAM, 2017; KRUMINA et al., 2016; PARFITT, 1989; SCHWERTMANN; TAYLOR, 1989).

Em solos com características alcalinas, o P pode precipitar com cátions divalentes, principalmente o Ca^{2+} , podendo, voltar a formar minerais secundários Ca-P de baixa solubilidade em pH mais elevados, tornando este elemento, também escasso na solução do solo (DOROZHKIN, 1997; GUIDRY, 2002; WELCH; TAUNTON; BANFIELD, 2002), principalmente em solos de regiões subtropicais e tropicais (KUMAR, 2016; RICHARDSON, 2001).

Os microrganismos desenvolveram diversos mecanismos a fim de superar a deficiência de P na solução do solo dada as interações com a mineralogia do solo (KHAN et al., 2014; KRISHNA, 2011; PANHWAR et al, 2009; SRIDEVI; MALLAIAH, 2009; SRINIVASAMURTHY, DAYAMANI, 2014; WANG et al., 2020; XIAO et al., 2008). Contudo, poucos estudos explicam claramente, os mecanismos microbiológicos utilizados para mediar a dessorção do P ligado aos óxidos de Fe e Al por complexo de esfera interna, ou em minerais Ca-P.

Por isso, no capítulo 1 do presente trabalho objetivou descrever os processos de dessorção do P fixado (esfera interna) ao oxidohidróxido de Fe (goethita) e de dissolução dos fosfatos de Ca (i.e. hidroxiapatita) por mecanismos microbiológicos.

No capítulo 2 a fim de elucidar os mecanismos biológicos de dissolução da hidroxiapatita, o presente trabalho objetivou verificar o efeito da atividade dos microrganismos sobre a liberação do P da estrutura da hidroxiapatita, principalmente avaliando a acidificação do meio e a produção de sideróforos durante o crescimento microbiano.

No capítulo 3 o trabalho possui objetivo de verificar a eficiência de microrganismos em liberação das formas fixadas (esfera interna) de P nos óxidos de Fe (goethita) por meio de acidificação e produção de sideróforos.

REFERÊNCIAS

BELELLI, P. G.; FUENTE, S. A.; CASTELLANI, N. J. Phosphate adsorption on goethite and Al-rich goethite. **Computational Materials Science**, v. 85, p. 59–66, 2014.

BERTRAND, N.; DOZOIS, C. M. The Pho regulon and the pathogenesis of *Escherichia coli*. v. 153, p. 82–88, 2011.

BLEAM, W. Surface Chemistry and Adsorption. In: **Soil and Environmental Chemistry**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. p. 385–443.

CELI, L.; BARBERIS, E.; MARSAN, F. A. Sorption of Phosphate on Goethite At High Concentrations. **Soil Science**, v. 165, n. 8, p. 657–664, 2000.

CHITRAKAR, R. *et al.* Phosphate adsorption on synthetic goethite and akaganeite. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 298, n. 2, p. 602–608, 2006.

DOROZHUKIN, S. V. Surface reactions of apatite dissolution. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 191, n. 2, p. 489–497, 1997.

GUIDRY, M. W. Apatite Dissolution Kinetics and the Long-Term Phosphorus Cycle. n. December 2002, 2002.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; MUSARRAT, J. **Phosphate Solubilizing Microorganisms**. 1ª ed. New York: Springer, 2014.

KRISHNA, M. Phosphate Solubilizers. p. 103–111, 2011a.

KRUMINA, L. *et al.* Desorption mechanisms of phosphate from ferrihydrite and goethite surfaces. **Chemical Geology**, v. 427, p. 54–64, 2016.

LOPEZ-ARREDONDO, A.E.; LEYVA-GONZALEZ, M.A.; GONZALEZ-MORALES, S.I.; LOPEZ-BUCIO, J. Phosphate Nutrition : Improving Low-Phosphate Tolerance in Crops. **Ann Rev Plant Biol**, v. 65, p. 95–123, 2014.

PANHWAR, Q. A.; OTHMAN, R.; MEON, S. Solubilization of Different Phosphate Forms by Solubilizing Bacteria Isolated from Aerobic Rice. **International Journal of Agriculture and Biology**, n. May 2014, 2009.

PARFITT, R. L. Infrared study of phosphate adsorption on goethite. **Journal of the Chemical Society Faraday Transactions 1** , v. 70, n. January, 2019.

POSNER, A. M.; NUTRITION, P. Desorption of phosphate from goethite. n. 1977, p. 697–707, 1979.

RAGHOTHAMA, K. G.; KARTHIKEYAN, A. S. Phosphate acquisition. **Plant and soil**, v. 274, p. 37–49, 2005.

SAEID, A.; PROCHOWNIK, E.; DOBROWOLSKA-IWANIEK, Phosphorus Solubilization by Bacillus Species. *J. molecules*, v.23, n11, p2897-2915, 2018

SCHWERTMANN, U.; TAYLOR, R. M. Chapter 8: : Minerals in Soil Environments In **The Iron Oxides: Structure, Reaction, Occurrence and Uses**. 2^a ed. Verlag: Wiley-VCH GmbH &Co. KGaA, 2003.

SRIDEVI, M.; MALLAIAH, K. V. Phosphate solubilization by Rhizobium strains. **Indian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 98–102, 2009.

SRINIVASAMURTHY, R.; DAYAMANI, K. J. Characterization of Mineral Phosphate Solubilizing. **Int Journal of Scietific And Research Pub**, v. 4, n. 8, p. 8–11, 2014.

WANG, Y. Y. *et al.* Identification of phosphate-solubilizing microorganisms and determination of their phosphate-solubilizing activity and growth-promoting capability. **BioResources**, v. 15, n. 2, p. 2560–2578, 2020.

WELCH, S. A.; TAUNTON, A. E.; BANFIELD, J. F. Effect of microorganisms and microbial metabolites on apatite dissolution. **Geomicrobiology Journal**, v. 19, n. 3, p. 343–367, 2002.

WENG, L.; VAN RIEMSDIJK, W. H.; HIEMSTRA, T. Factors Controlling Phosphate Interaction with Iron Oxides. **Journal of Environmental Quality**, v. 41, n. 3, p. 628–635, 2012.

XIAO, C. Q. *et al.* Optimization for rock phosphate solubilization by phosphate-solubilizing fungi isolated from phosphate mines. **Ecological Engineering**, v. 33, n. 2, p. 187–193, 3 jun. 2008.

ZHONG, B. *et al.* Proton interaction in phosphate adsorption onto goethite. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 308, n. 1, p. 40–48, 2007a.

2. CAPÍTULO 1: MECANISMOS MICROBIOLÓGICOS DE SOLUBILIZAÇÃO (HIDROXIAPATITA) E DESSORÇÃO (GOETHITA) DE P: UMA REVISÃO

2.1 RESUMO

O P é considerado um elemento essencial na biosfera e um dos mais importantes para o crescimento das plantas. Sua disponibilidade pode ser influenciada por fatores como pH, matéria orgânica, solos carbonáticos, potencial redox (Eh) e comunidade microbiana. O presente trabalho objetivou descrever os processos de dissolução da hidroxiapatita e dessorção do P a partir dos óxidos de ferro através de mecanismos microbiológicos, uma vez que os presentes estudos explicam de modo muito simplificado, ou pouco exploram o papel dos mecanismos microbiológicos sobre a superfície dos minerais. Isto ocorre provavelmente em decorrência da falta de interdisciplinaridade, especialmente entre microbiologia e mineralogia. Concluiu-se que os mecanismos microbiológicos de dessorção do P dos óxidos, não atuam independentemente, mas de forma sinérgica, dependendo das características mineralógicas da fração argila. As espécies de PO_4^{3-} liberadas dos minerais são, primeiramente, as fisiosorvidas, e que são, portanto, chamadas de lábeis, devido as características de ligação (eletrostática), seguida das formas de complexo de esfera interna. Nos minerais Ca-P, os ácidos orgânicos possuem papel chave na dissolução do mineral. Os mecanismos microbianos desempenham diferentes papéis de acordo com as características do solo, e os experimentos para avaliar a eficiência microbiana deveriam ser elaborados considerando as características mineralógicas do solo, evitando assim, conclusões tendenciosas.

Palavras-chave: Mineralogia do solo 1. Fosfato do solo 2. Mecanismos Microbiológicos 3. Ciência do Solo 4.

2.2 ABSTRACT

P is considered an essential element in biosphere and one of the most important elements to plant growth. Its availability may be influenced by factors like pH, organic matter, carbonatic soils, redox potential (Eh) and microbial community. The present work aimed to describe the process of hydroxyapatite dissolution and P desorption from iron oxides through microbial mechanisms, given that current studies poorly explain how the microbial mechanisms play role at mineral surface, possibly due to the lack of interdisciplinarity, specially, between microbiology and soil mineralogy. We concluded that microbiological mechanisms of P desorption do not act independently, but synergistically, depending on the mineralogical characteristics of the clay fraction. PO_4^{3-} species released from minerals are initially the physiosorbed, which are called labile, due to the bond characteristic (electrostatic), followed by the inner sphere complex forms. For Ca-P minerals, organic acids have a key role in its dissolution and P release. Microbial mechanisms play different roles according to the soil characteristics, and the experiments to evaluate microbial efficiency should be designed considering soil mineralogy characteristics, to avoid biased conclusions.

Keywords: Soil mineralogy 1. Soil Phosphate 2. Microbial Mechanisms 3. Soil Science
4.

2.3 INTRODUÇÃO

O fósforo (P) é um macronutriente importante aos organismos vivos, pois atua nos processos metabólicos de produção e consumo de energia, reprodução, codificação e expressão genética, estruturação e funcionamento celular (MADINGAN et al., 2016; RATHINASABAPATHI et al., 2018; ZHANG et al., 2019). A deficiência de P aplicado ao solo é um dos principais fatores que limitam o incremento de biomassa nos agroecossistemas em mais de 70% das áreas cultivadas em todo o mundo (LOPEZ-ARREDONDO et al., 2014; MCLAUCHLAN, 2006; RASUL et al., 2019). Por isso, a compreensão dos processos que regulam a disponibilidade de P no solo pode contribuir para o delineamento de novas formas de melhorar a fertilidade do solo e mitigar os efeitos da limitação de P nas áreas cultivadas.

O comportamento do P no solo é considerada uma das mais complexas no sistema solo-planta. Primeiramente, o conteúdo de P total nos solos é relativamente baixo. Solos jovens desenvolvidos de sedimentos e rochas ácidas podem conter 1200 mg kg⁻¹ de P total, enquanto solos muito intemperizados tropicais e subtropicais podem conter menos que 10 mg kg⁻¹ de P total (OBERSON, JONE, 2005; CORDELL et al., 2009; TURNER, LALIBERTE, 2015). O P total apresenta distribuição bastante heterogênea no solo, podendo estar concentrado em algumas zonas e rarefeito em outras (FAN et al, 2017; PERET et al., 2014). Terceiro, o P é encontrado em diferentes formas orgânicas e inorgânicas, e, tem diferentes níveis de solubilidade, sendo que até 90 % do P total do solo pode estar ocluso (TURNER et al., 2007). É senso comum que plantas e microrganismos absorvem apenas sua fração solúvel (i.e. H₂PO₄⁻, HPO₄²⁻). Quarto, o P possui baixa mobilidade, haja vista que seu coeficiente de difusão varia entre 10⁻¹² a 10⁻¹⁵ m² s⁻¹ (ABEL, 2017; KANNO et al., 2016), o que resulta num movimento muito lento do nutriente na solução do solo. Esse comportamento leva à formação de uma zona de depleção próxima da superfície de absorção (e.g. raiz ou biofilme microbiano). Quinto, a faixa de pH ideal para a disponibilidade de P na solução do solo é muito restrita, podendo variar ainda em função das características mineralógicas do solo (PRIYADHARSINI, MUTHUKUMAR, 2017). Em solos muito intemperizados tropicais ácidos, o P tende a formar precipitados insolúveis com Fe³⁺ e Al³⁺ ou oclusos nos óxidos/oxi-hidróxidos e hidróxidos de Fe (e.g. hematita, goethita) e Al (e.g. gibsitita) (BLEAM, 2017). Na presente revisão será usado a goethita para exemplificar os mecanismos microbiológicos de dessorção de P nos óxidos de Fe. Em solos jovens alcalinos (normalmente derivados de rochas carbonáticas), o P tende a

se precipitar com o Ca^{2+} , formando fosfato de cálcio, que é a base do mineral apatita (FANG et al. (2017; GÉRARD, 2016; HEUER et al., 2017).

Em torno de 11,8 milhões km^2 dos solos tropicais e subtropicais são altamente intemperizados, com altos teores de hematita, goethita e gibbsita na fração argila (TABOR et al., 2017). Esses minerais apresentam alta capacidade de adsorção de P por esfera interna, o que reduz fortemente a eficiência das adubações fosfatadas (BLEAM et al, 2017). Em solos mais carbonáticos, pode haver dominância de apatitas (ANZOLIN et al 2019). A maior parte dos fertilizantes utilizados como fosfatos naturais são produzidos utilizando apatitas como matéria prima (ANZOLIN et al, 2019, NEZAT et al, 2008), por isso esse mineral foi escolhido para exemplificar os mecanismos microbiológicos de dissolução para liberação de formas estruturais de P. Em decorrência da limitada oferta de P na solução do solo, os organismos do solo utilizam estratégias de solubilização de P, que são pouco compreendidas na literatura, provavelmente por falta de interdisciplinaridade da mineralogia e microbiologia. O consórcio de culturas para utilizar os mecanismos próprios de absorção de P de cada cultura e a utilização de microrganismos solubilizadores de P estão entre as principais ações para melhorar a fertilidade dos solos (GAXIOLA et al., 2011; HEUER et al., 2017; GU et al., 2017; LATATI et al., 2017; PRIYADHARSINI, MUTHUKUMAR, 2017).

Nesse sentido, o presente trabalho objetiva descrever os processos de dessorção do P fixado (esfera interna) aos óxidos de Fe (i.e. goethita) e de dissolução dos fosfatos de Ca (i.e. hidroxiapatita) por mecanismos microbiológicos.

As hipóteses que norteiam esse estudo:

(1) os mecanismos microbiológicos que levam os processos de dessorção de P da goethita e dissolução de apatita são diversos e ocorrem simultaneamente na superfície dos minerais devido à pluralidade da atividade microbiológica;

(2) os mecanismos microbiológicos possuem papéis diferentes nos processos de dessorção de P da goethita e de solubilização de P da hidroxiapatita.

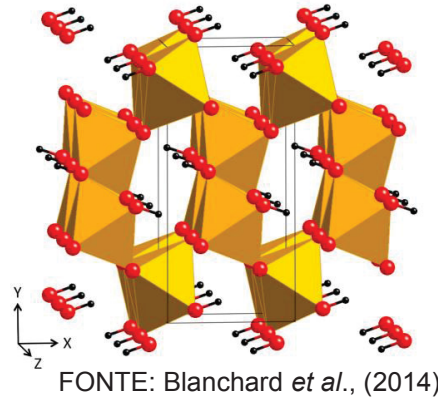
2.4 IMPORTÂNCIA DA GOETHITA E APATITA PARA A DISPONIBILIDADE DE P NO SOLO

2.4.1 Goethita

A goethita ($\alpha\text{-FeO(OH)}_{(s)}$) é um oxihidróxido de Fe, cuja estrutura cristalina é formada pelo compartilhamento de duas cadeias octaédricas de Fe coordenado com

oxigênio, que podem ser protonadas ($\equiv\text{Fe}_3\text{OH}$) ou não protonadas ($\equiv\text{Fe}_3\text{O}$) (CHEAH et al., 2003; CORNELL; EICK, 2002; LIU; CHEN; FROST, 2014; SCHWERTMANN, 2003; SCHWERTMANN, 1991; TADANIER;). É o óxido de Fe mais comum e ocorre em quase todos ambientes pedogênicos. A estrutura apresenta filas duplas de octaedros preenchidos e vazios alternados ao longo do eixo *c*, com os octaedros compartilhando aresta dentro da corrente dupla e vértice entre elas (Figura 1). Portanto, diferentemente da estrutura da hematita, não há compartilhamento de faces entre octaedros vizinhos na goethita. A goethita pertence ao sistema cristalino ortorrômbico e tem dimensões da cela unitária em que $a_0 = 0,4608$; $b_0 = 0,9956$ e $c_0 = 0,30215$ nm (SCHWERTMANN; TAYLOR, 1989).

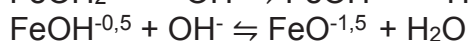
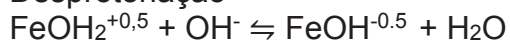
FIGURA 1- ESTRUTURA CRISTALINA DA GOETHITA



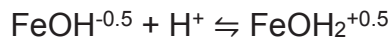
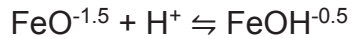
A goethita crescimento cristalino principalmente na direção dos planos (110), o qual corresponde a 80-95% de sua área superficial total, e nas terminações das cadeias octaédricas o plano (021) (CORNELL, SCHWERTANN, 2003). Dependendo das condições de gênese, a área superficial específica da goethita pode variar de 30 até 100 m² g⁻¹ (VILLACÍS-GARCÍA et al., 2015; JAISWAL et al., 2013; VILLALOBOS et al, 2003; VARANDA et al., 2002).

Os grupos ferróis de adsorção da goethita podem ser protonados ou desprotonados (Reações 1 - 4), dependendo do pH do meio (CHEAH et al., 2003; LIU, CHEN, FROST, 2014). Logo, a superfície do mineral apresentará maior capacidade de troca catiônica (predomínio de cargas negativas) ou aniônica (predomínio de cargas positivas) em função do pH do solo.

Desprotonação



Protonação



Em ambientes com pH acima ponto de carga zero (pHPCZ) da goethita (em torno de 8,5), a superfície do mineral tende à desprotonação e à formação preferencial de cargas negativas (CTC>CTA) (reações de desprotonação 1 e 2) (REICHARD; KRETZSCHMAR; KRAEMER, 2007; ZHONG et al., 2007). Nessa situação, o mineral tem menor capacidade de adsorver nutrientes aniônicos, como o H_2PO_4^- (ZHONG et al., 2007). Por isso, sob condições alcalinas, a adsorção de P por esfera externa e interna serão reduzidas (ZHAO et al., 2020).

Inversamente, em ambientes com pH abaixo do pHPCZ, a superfície da goethita tende à protonação (Reações 3 e 4), ficando mais positivamente carregada, com maior capacidade de troca aniônica (CTA>CTC) (DUCKWORTH; MARTIN, 2001; SADEGHALVAD et al., 2021; SCHWERTMANN; MURAD, 1983).

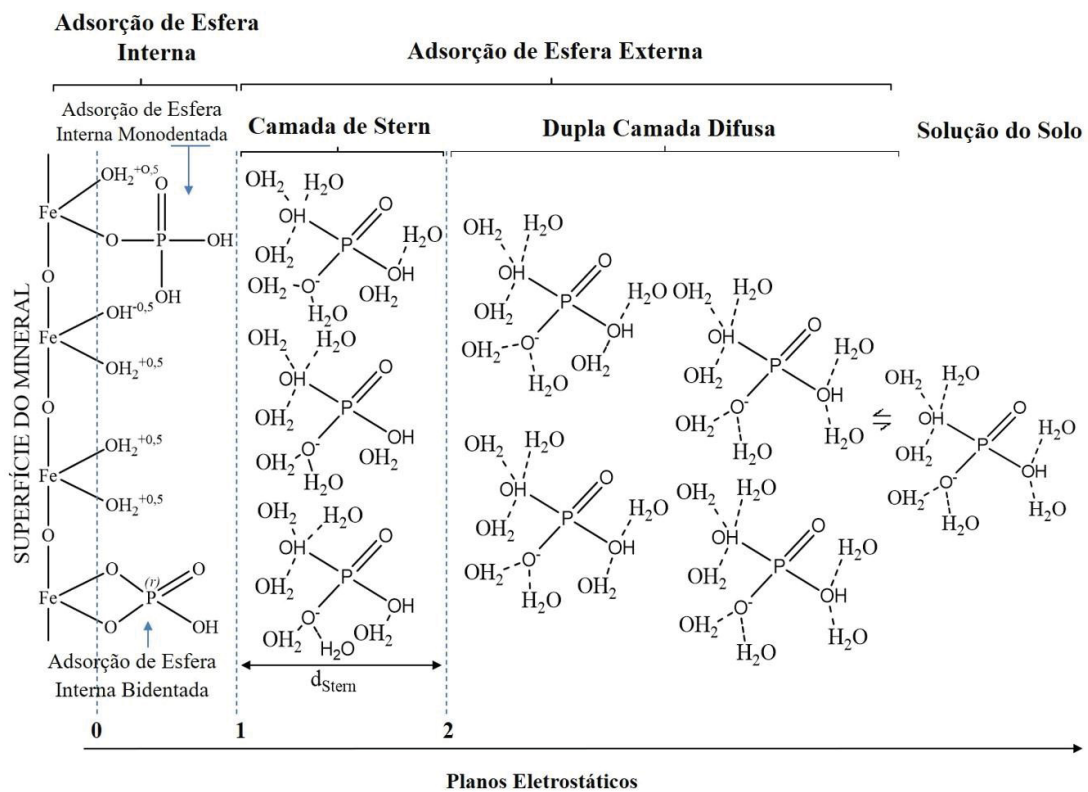
Como o pH dos solos em condições naturais e cultivados possuem pH abaixo de 8,5, sempre a superfície dos óxidos de ferro (goethita) apresentará predomínio de cargas positivas, com intensa capacidade de adsorção de H_2PO_4^- por esfera interna e externa (BELELLI; FUENTE; CASTELLANI, 2014; JEMAL, 2017; POSNER, 1979) (Figura 1). Quando a atividade do P na solução do solo é reduzida por lixiviação ou absorção pelos organismos (JEMAL, et al., 2017), ocorre a dessorção das formas adsorvidas na dupla camada difusa e camada de Stern (Posner, 1979) (Figura 1). Portanto, as formas solúveis e adsorvidas por esfera externa estão prontamente disponíveis para os organismos (ZHONG et al., 2007).

Contudo, a disponibilidade de P reduz drasticamente com a adsorção de esfera interna (Figura 1). Nessa ligação, o H_2PO_4^- perde sua água de hidratação, ocorre a troca de ligante com o grupo $-\text{OH}^{-0.5}$ ou OH^{2+} e o íon fosfato forma ligação com forte caráter covalente com a superfície do óxido de Fe (CHITRAKAR et al., 2006; ZHONG et al., 2007)

Os complexos de esfera interna podem formar ligantes mononuclear ou binuclear (Figura 1) (ASOMANING, 2020), sendo que a segunda forma é menos solúvel. Essas formas ligantes são influenciadas principalmente pelo pH do meio (ZHONG et al., 2007). Por exemplo, pH entre 3,5 e 8,0 favorece a formas binucleares, e à medida que o pH aumenta, a goethita apresenta mais ligações mononucleares (ZHONG et al. 2007).

Portanto, os mecanismos microbiológicos são importantes para a quebra das ligações do P adsorvido por esfera interna para aumentar a disponibilidade do nutriente no solo, pois a solubilidade do P da dupla camada difusa e camada Stern é elevada. A superfície da goethita pode ser atacada por ácidos orgânicos, que podem competir pelos sítios reativos ocupados por H_2PO_4^- e causar a retirada desse oxianion e formar complexos com o H_2PO_4^- desorvido, evitando sua readsorção por esfera interna (ANTELO et al., 2005; ASOMANING, 2020; ZHANG et al., 2020).

FIGURA 2- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE ADSORÇÃO DO H_2PO_4^- POR ESFERA EXTERNA NA DUPLA CAMADA DIFUSA E NA CAMADA STERN E ADSORÇÃO DE ESFERA INTERNA NA SUPERFÍCIE DO ÓXIDO DE FE (MODELO DE GOUY-CHAPMAN-STERN).



Fonte: A autora (2021)

A ação isolada dos ácidos orgânicos poderia ser comparada com a ação dos extratores para determinação do P de labilidade alta e intermediária (Mehlich-1 e Bray 1 e 2) e não lábil (esfera interna), mas de uma forma muito mais branda, em virtude das baixas concentrações que são secretadas pelos microrganismos. O extrator Mehlich 1 (M1) é uma solução duplo ácido preparada com H_2SO_4 $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ e HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Este extrator promove a protonação do meio pela dissociação do H^+ , solubilizando formas precipitadas de P, principalmente P-Ca. Já o oxianion SO_4^{2-}

promove a extração total do H_2PO_4^- adsorvido por esfera externa (dupla camada difusa e camada Stern, Figura 1). A preferência de extração pelo M1 é do P ligado ao $\text{Ca} < \text{P}$ ligado ao $\text{Al} < \text{P}$ ligado ao Fe (REIS et al., 2020; GATIBONI et al., 2005; CUNHA et al., 2007).

A solução ácida com íon complexante mais empregada para extração de P no solo é a mistura de soluções diluídas de HCl e NH_4F . O íon fluoreto forma forte complexo com íons Al^{3+} (KAMPRATH, WATSON, 1980), liberando, assim, o P ligado ao metal. O P presente no solo como fosfato de cálcio, também é extraído, com a precipitação de fluoreto de cálcio. As concentrações utilizadas têm sido de 0,025 ou 0,1 mol L^{-1} para o HCl com 0,03 mol L^{-1} de NH_4F (Bray, Kurtz, 1945), resultando, respectivamente, nas soluções conhecidas como Bray 1 e Bray 2.

Nos métodos para se estimar as concentrações das formas lábeis e não lábeis de P, em situação controlada de laboratório, os solos são submetidos a diversos ciclos de extração com os ácidos inorgânicos até que a concentração das formas alvo de estudo sejam esgotadas da solução (CULMAN et al., 2020; GATIBONI et al., 2002; GATIBONI; KAMINSKI, 2005). Esse papel também pode ser desempenhado pelos ácidos orgânicos, simulando a secreções desses compostos de forma constante pelas comunidades microbianas estabelecidas e funcionais nos solos. Os fosfatos liberados na solução do solo podem ser imobilizados pelos microrganismos, complexados pela matéria orgânica precipitados com cátions de maior valência, ou absorvidos pelas raízes das plantas.

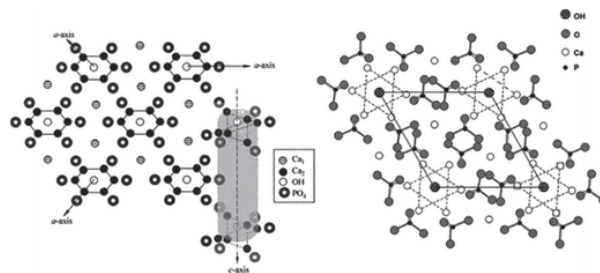
Esse mecanismo de extração por ação dos ácidos, baseia-se no equilíbrio químico entre as formas de P no solo, de acordo com a redução da atividade do nutriente das formas mais solúveis e tamponamento a partir das formas menos solúveis: P na solução tamponado pelo P adsorvido por esfera externa e este tamponado pelo P adsorvido por esfera interna.

Assim, é possível presumir que os ácidos orgânicos agem como soluções extratoras sequenciais no solo, uma vez que são secretados pelos microrganismos do solo (LI et al., 2018; PII et al., 2015). Além disso, a presença de ácidos orgânicos pode aumentar a carga negativa e reduzir os grupos reativos $-\text{FeOH}_2^{+0,5}$ na superfície da goethita pela interação organo-mineral e limitar as adsorções de esfera externa e interna de P (ANTELO et al., 2005, OTERO-FARIÑA et al., 2017).

2.4.2 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) é um mineral de ocorrência natural, formado pelo arranjo de células unitárias que se ordenam em um sistema hexagonal, com os seguintes parâmetros da cela unitária: $a = 0,9422 \text{ nm}$ e $c = 0,688 \text{ nm}$. As células unitárias da hidroxiapatita são compostas por um arranjo tetraédrico de 44 átomos dos grupos iônicos Ca^{2+} , PO_4^{3-} e OH^- coordenados juntos no formato hexagonal (Figura 3) (BONFIELD, 1999; BOUDIA et al., 2018; FIHRI et al., 2017; HING; BEST; KIM et al., 2002; NAYAK, 2010; REHMAN; BONFIELD, 1997). Portanto, diferente da goethita (reações de superfície para dessorção do P), na hidroxiapatita o P faz parte da sua estrutura e sua completa liberação envolve reações de dissolução total do mineral.

FIGURA 3- ESTRUTURA CRISTALINA DA HIDROXIAPATITA

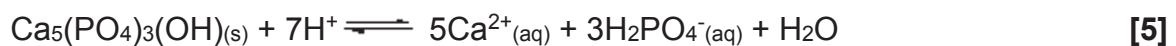


FONTE: Haider et al., (2017).

As reações químicas que ocorrem na superfície da hidroxiapatita podem ser previstas por modelos de dissolução por difusão ou modelos cineticamente controlados (BOUDIA et al., 2018; DOROZHKIN, 2012; WANG et al., 2016). Ambos os modelos operam com a chamada “força motriz”, que se forma em virtude do gradiente de concentração na camada de difusão de Nernst, ou através da formação de um gradiente iônico entre a superfície do mineral e a solução.

O processo de dissolução é composto de dois estágios: no primeiro, a dissolução ocorre tanto por difusão quanto por superfície; no segundo, ocorre apenas por meio de difusão controlada (BOUDIA et al., 2018; DOROZHKIN, 2012; WANG et al., 2016). Por isso, a dissolução da hidroxiapatita pode não ser total, mas parar num estado metaestável no qual o processo é efetivamente terminado mesmo que a hidroxiapatita esteja em contato com solução não saturada.

A dissolução da hidroxiapatita é controlada pelo pH (DOROZHKIN, 1997, 2012). Sob $\text{pH} < 5.0$ as reações de dissolução poderão ocorrer muito rapidamente (2-5 min para partículas do tamanho argila). A liberação do Ca^{2+} por troca com H^+ (reação de hidrólise – equação 5) tende a enfraquecer a força de atração entre os íons remanescentes na estrutura, e a dissolução se iniciará pela interação dos prótons com ortofosfatos fracamente ligados. Além dos mecanismos de hidrólise em quebrar e enfraquecer as ligações da estrutura cristalina, o H^+ promove a neutralização do OH^- do mineral formando uma molécula de água, o que acelera a reação de dissolução da hidroxiapatita (deslocamento do equilíbrio em direção aos produtos na equação 5).



Considerando a saída preferencial do Ca^{2+} , os grupos ortofosfatos (H_2PO_4^- , $\text{CaH}_2\text{PO}_4^+$ ou H_3PO_4) são por fim liberados da estrutura do mineral (DOROZHKIN, 1997, 2012; LI; YAN, 2001; VALSAMI-JONES et al., 1998; ZHANG;). O Ca^{2+} liberado tende a ser readsorvido, formando uma camada semi-permeável na superfície do mineral que torna mais lenta a dissolução e a liberação de P para a solução do solo (DOROZHKIN, 2012). Outro ponto é a interação que pode ocorrer entre o Ca^{2+} e o P livres na solução do solo. Dependendo do pH, que define a espécie predominante de P solúvel (H_3PO_4 (<2,1), H_2PO_4^- (2,1 a 7,2), HPO_4^{2-} (7,2 a 12,3) e PO_4^{3-} (>12,3) e da atividade de Ca^{2+} na solução, a interação entre estes íons podem formar produtos com diferentes estabilidades (PHAM MINH et al., 2012). A solubilidade dos fosfatos de Ca geralmente decresce na seguinte ordem (LINDSAY, 1979): $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Fosfato dicálcio diidratado-DCPD) > CaHPO_4 (Fosfato dicálcio - DCP) > $\text{Ca}_4\text{H}(\text{PO}_4)_3$ (Fosfato octacálcico-OCP) > $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Fosfato β -Tricálcico- β -TCP) > $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ (hidroxiapatita).

Então, pelas condições de equilíbrios químicos dos fosfatos de Ca (LINDSAY, 1979), após a dissolução completa da hidroxiapatita, o P e o Ca tenderam a formar o β -TCP, composto mais solúvel que a hidroxiapatita. Com a redução das atividades de P e Ca da solução do solo, o β -TCP torna-se instável e a precipitação mais provável será o OCP. Esses processos de dissolução e precipitação irão ocorrer sucessivamente até que as atividades de Ca e P na solução do solo reduzam ao ponto que mesmo o DCPD se torne solúvel.

Como a solubilidade da hidroxiapatita de tamanho superior à argila (>0,002mm) é mais lenta (parâmetro de cinética), as atividades de P e Ca na solução

do solo não serão totais em relação à composição química do mineral, o que permitirá a coexistência da hidroxiapatita alterada e alguns dos demais fosfatos de Ca listados acima. Considerando a atividade de Ca de $10^{-2,5}$ mol L⁻¹, nos pH 4,0; 5,0; e 6,0 a hidrólise da hidroxiapatita mantém a atividade de H₂PO₄⁻ igual a $10^{-0,4}$, $10^{-2,7}$ e $10^{-5,0}$ mol L⁻¹, na solução do solo respectivamente, sob condições de equilíbrio químico (Equação 5 – LINDSAY, 1979).

Esses valores de atividade de H₂PO₄⁻ reforçam o efeito positivo da acidez na hidrólise da hidroxiapatita ($10^{-0,4}/10^{-5,0} = 39810$ vezes, ou seja, a solubilidade da hidroxiapatita no pH 4 é quase 40.000 vezes maior que no pH 6). Esse processo de coexistência de fosfatos de Ca irá favorecer a dissolução da hidroxiapatita, pois a reprecipitação do Ca e P liberados pela hidroxiapatita em outros fosfatos de Ca irá reduzir a atividade desses elementos na solução do solo (deslocamento do equilíbrio químico em direção da formação dos produtos na equação 5).

2.5 MECANISMOS DE SOLUBILIZAÇÃO DE H₂PO₄⁻ POR MICRORGANISMOS

No presente trabalho o termo solubilização de H₂PO₄⁻ foi empregado tanto para as reações de superfície na goethita (dessorção) quanto as reações de dissolução da hidroxiapatita.

2.5.1 Produção de ácidos orgânicos e acidificação do meio

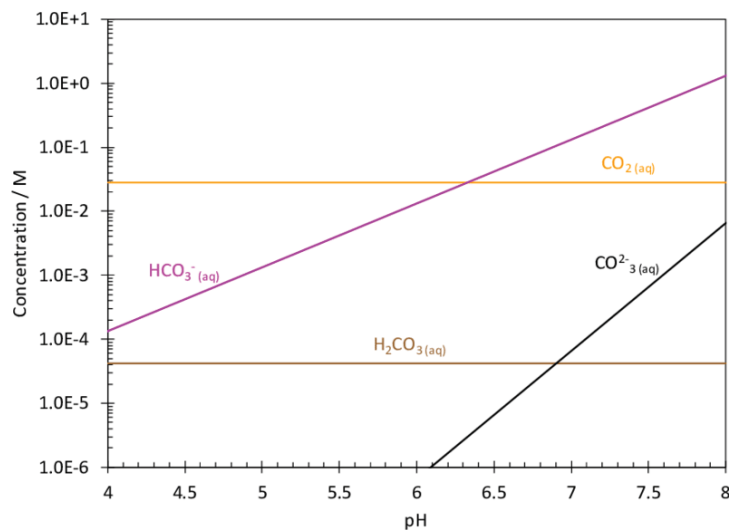
Os ácidos orgânicos provenientes do metabolismo microbiano podem interagir com a matéria orgânica do solo, através de reação de complexação ou por ligação com os cátions (p. ex. Ca²⁺ e Mg²⁺). Outra possibilidade é a adsorção por esfera externa ou interna aos grupos reativos de superfície dos óxidos de Fe e Al (SCHMITT et al., 2018; RENELLA et al., 2004; HERNANDEZ, 2006; JONES et al., 2003).

Dentre os principais metabólitos secretados pelos microrganismos estão os sideróforos e ácidos orgânicos (AOs) (Figura 2). Os AOs apresentam elevada densidade de carga negativa nos grupos carboxílicos de superfície acima de pH 4,0 (normalmente esse é o valor do pKa dos ácidos orgânicos) (ASH et al., 2016; SCHMITT et al., 2018;). Quanto menor o valor de pKa, mais forte será o ácido. Existe diferenças na capacidade de cada ácido de acidificar o meio, ou de formar complexos em decorrência dos valores do seus pKas, ou ainda devido a posição dos grupos carboxílicos. Dependendo do pH do meio, pode favorecer ou não, a dissociação de alguns ácidos (pH=pKa; pH<pKa; pH>pKa).

Logo, a formação de complexos pode não ocorrer de forma linear para ácidos mono, di ou tricarbóxico (Schmitt et al., 2018). A faixa normal de pH dos solos desenvolvidos sob condições tropicais e subtropicais está entre 4 e 6,5 (CAMACHO et al., 2021; ESWARAN, REICH, BEINROTH, 1997; FAGERIA, NASCENTE, 2014;). Estas condições de pH tendem a favorecer a geração de carga positiva na superfície dos óxidos de Fe, fazendo com que estes adsorvam ânions, como por exemplo o P, requerendo portanto, maior input de adubação fosfatada no solo.

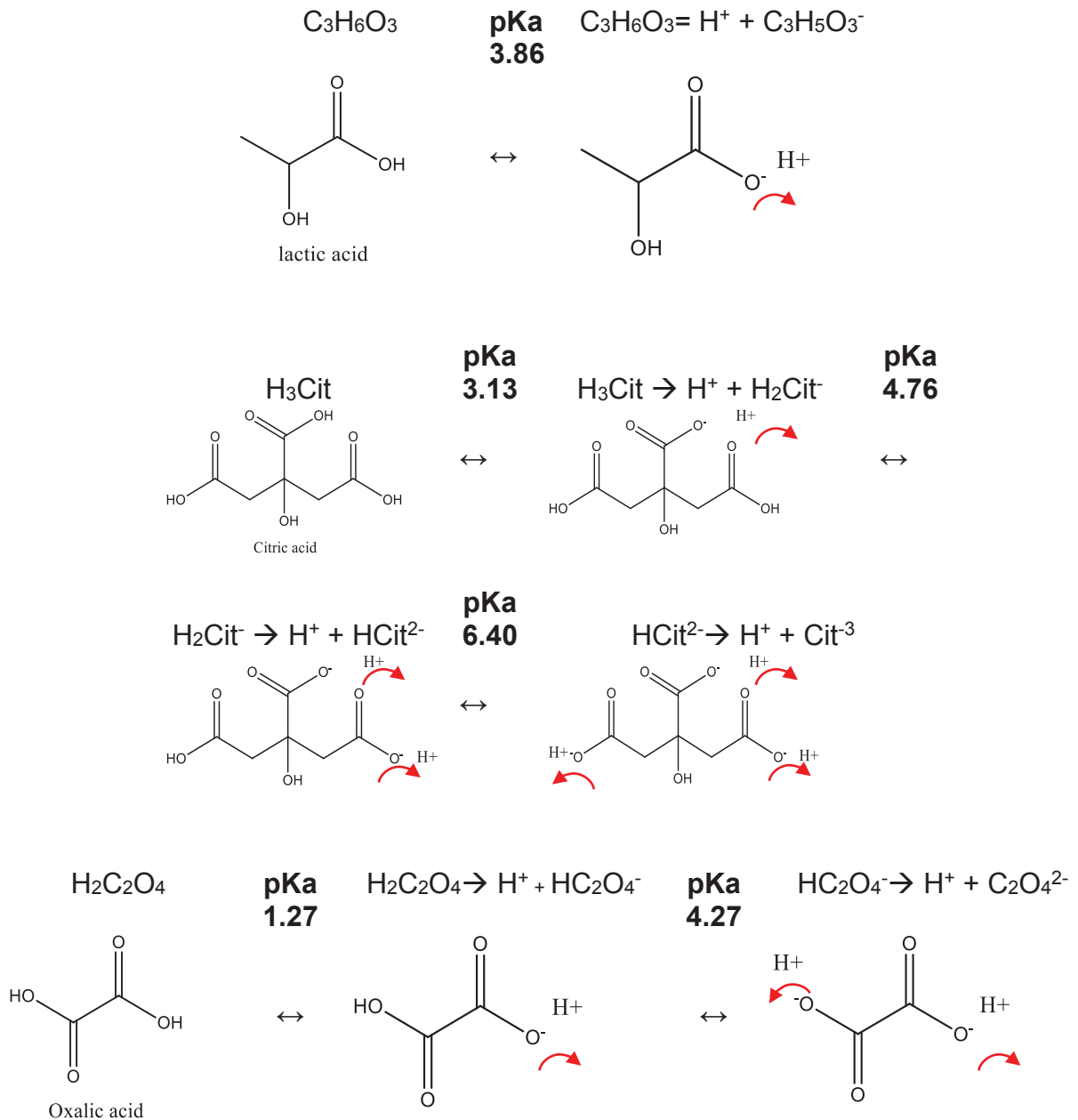
Se o pH do meio mudar em 1 próximo ao valor de pKa, o estado de dissociação do ácido pode ser muito afetado, o que reflete na geração de espécies ionizadas ou não do ácido, como é possível ver através do ácido acético (Figura 04). Condições de pH que favoreçam a dissociação dos ácidos, podem contribuir com a sua capacidade de liberar prótons, acidificando o meio e assim contribuindo para a solubilização de apatitas, ou protonação da superfície dos óxidos. Além disso, quanto mais próximo estiver o pH da solução do pKa do ácido maior será sua capacidade de tamponamento (NESIC et al., 2019).

FIGURA 4- EFEITO DO PH SOBRE A DISSOCIAÇÃO DO ÁCIDO ACÉTICO



FONTE: NESIC et al., (2019)

FIGURA 5- EXEMPLOS DE DESPROTONAÇÕES E FORMAÇÃO DE CARGAS NEGATIVAS EM ÁCIDOS ORGÂNICOS MONO, DI E TRICARBOXÍLICOS.



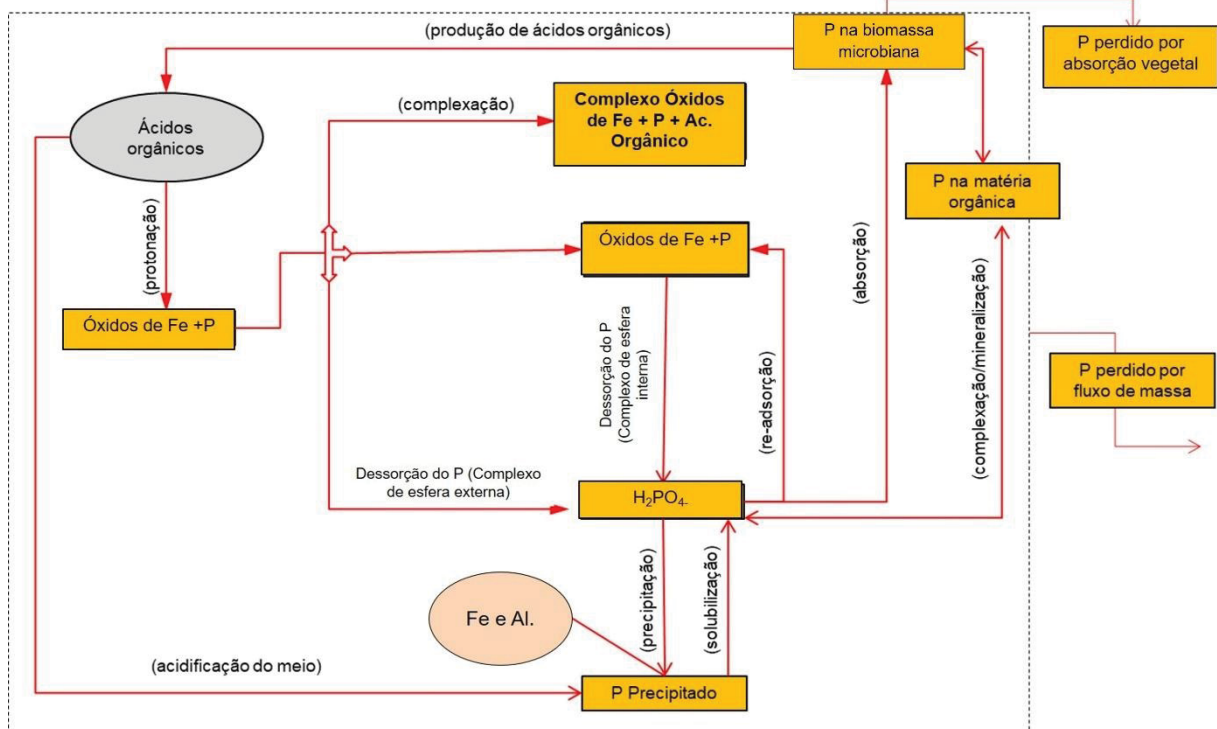
Fonte: A autora (2021)

No caso dos óxidos de Fe, como a goethita, os ácidos orgânicos podem reduzir a adsorção eletrostática (esfera externa) do $H_2PO_4^-$, por efeito de competição às cargas positivas dos grupos ferrol protonados (equações 1 e 2) (BÜNEMANN, 2015; LI et al., 2016 COHEN-OFRI et al., 2006; CHEN et al. 2015; KHAN et al., 2014). Assim, de maneira simplificada, é possível comparar a ação dos ácidos orgânicos sobre a dessorção de P adsorvido por esfera externa com a ação dos extratores para determinação do P de labilidade alta e intermediária, como por exemplo, o Mehlich 1, Bray 1 e 2.

Contudo, os ácidos orgânicos exsudados das células microbianas têm uma vida útil muito curta, (Shen et al. 1996), e, portanto, as reações precisam acontecer imediatamente após a sua exsudação. Se o P desorvido não for rapidamente absorvido pelas plantas, com a degradação dos exsudados, o P pode ser reabsorvido na dupla camada difusa (FINK et al., 2016; SCHLESINGER, BERNHARDT, 2013).

O modelo conceitual da Figura 3 mostra os processos do ciclo biogeoquímico do P a partir de óxidos de Fe em contato com ácidos orgânicos, provenientes da atividade biológica do solo. Quando o pKa dos ácidos orgânicos for menor que o pH do solo, estes reduzem o pH do solo e causam a protonação da superfície do mineral (CHEN et al., 2015; COHEN-OFRI et al., 2006; KHAN et al., 2009; JOHNSON, LOEPERT, 2006SCHMITT et al., 2018; RAMOS et al., 2011). Mesmo aumentado as cargas positivas de superfície e a capacidade de adsorção do H_2PO_4^- , os ácidos orgânicos apresentam elevada densidade de cargas negativas pela desprotonação dos grupos carboxílicos (Figura 2), o que amplia a troca e desorção do H_2PO_4^- da dupla camada difusa (BÜNEMANN, 2015; LI et al., 2016 COHEN-OFRI et al., 2006; JOHNSON et al., 2006; KHAN et al., 2014; KHAN et al., 2009).

FIGURA 6- MODELO CONCEITUAL DA AÇÃO DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS LIBERADOS PELA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO SOLO SOBRE A DESSORÇÃO DE P DOS ÓXIDOS DE FE. OS RETÂNGULOS NA COR LARANJA COM LINHAS CONTÍNUAS REPRESENTAM AS FRAÇÕES DE P NO SOLO. AS SETAS INDICAM OS FLUXOS DO P



Fonte: A autora (2021)

Outra possibilidade é a formação de complexos organo-minerais com o próprio P liberado (BROWNING et al., 2017; XU et al., 2019; IVANOVA et al., 2006; KHAN et al., 2014; JORDAN, 1997; WEI et al., 2018) (Figura 2). O H_2PO_4^- dessorvido na solução do solo pode ser mobilizado por microrganismos ou plantas, ou ser re-adsorvido aos óxidos de Fe no solo (JOHNSON et al. 2006), ou ser complexado na matéria orgânica do solo, ou ser precipitado com outros constituintes do solo (Figura 2).

Todas as frações de P do solo podem, ainda, serem removidas do ambiente por fluxo de massa (escoamento superficial ou lixiviação) e ainda por absorção vegetal (KHAN et al., 2014). Espera-se efeito direto limitado dos ácidos orgânicos secretados na solubilização do P por esfera interna em razão da limitada vida útil desses compostos no solo. Para a dessorção dessa forma de P é necessário intensa depleção do nutriente nos compartimentos solução e esfera externa (Figura 1). Com a degradação dos exsudados, o P pode voltar a ocupar as posições de esfera externa e assim não haverá redução suficiente da atividade de P para forçar o tamponamento do nutriente a partir de formas de esfera interna. Talvez o efeito direto mais importante dos AO na liberação do P adsorvido por esfera interna seja a redução do pH do solo, o que tende a aumentar as reações de hidrólise da ligação -Fe-O-P. O efeito indireto positivo dos ácidos orgânicos na solubilização do P adsorvido por esfera interna é sua saída do sistema solo pela absorção pelas plantas e microrganismos e lixiviação (WEI et al., 2020), o que reduz a re-adsorção do nutriente.

O ciclo biogeoquímico do P envolvendo óxidos de Fe (Figura 3) é influenciado tanto por atributos dos minerais quanto dos ácidos orgânicos. Sobre esse ciclo, influenciam o grau de cristalinidade e a área superficial do mineral, bem como, a concentração, o número de grupos carboxílicos e a vida útil dos ácidos orgânicos (ASH et al., 2016).

As concentrações de ácidos orgânicos no solo podem variar em função do crescimento e da respiração da biomassa microbiana do solo, a qual sofre interferência de vários aspectos ambientais, como as propriedades físico-química dos solos, vegetação e sazonalidade (ADELEKE et al., 2017; JONES et al., 2003; VAN-HEES et al., 2003).

As concentrações dos ácidos orgânicos no solo podem variar em decorrência das condições de soerguimento dos lençóis freáticos e tempo de alagamento (ZAPATA-HERNÁNDEZ, 2002). Por exemplo, em solos inundados, as concentrações

de ácidos fórmico, acético e propiônico podem chegar a 40 mmol L⁻¹, mas podem ser reduzidas a 1 mmol L⁻¹ poucas semanas depois do alagamento em decorrência da formação de metano (Zapata-Hernandez et al., 2002). A concentração dos ácidos presentes na solução de Latossolos pode variar de 0-50 µmol L⁻¹ para os ácidos di/tricarboxílico (oxálico, malônico, málico, succínico, tartárico e cítrico) (ADELEKE et al., 2017).

Quanto maior a concentração de ácidos orgânicos, maior a taxa de dessorção de H₂PO₄⁻ dos óxidos de Fe, o que tem sido evidenciado em vários experimentos utilizando culturas puras (GYANESHWAR et al., 2002; JACOBY et al., 2017; PARIKH et al., 2014; WANG et al., 2016) e comunidades de microrganismos (BRUCKER et al., 2019; PASTORE et al., 2020; WANG et al., 2009).

Entretanto, nem sempre existe uma correlação direta entre a concentração de ácidos orgânicos exsudados no solo e a dessorção de H₂PO₄⁻ dos minerais (ILLMER, SCHINNER, 1995), provavelmente porque os ácidos orgânicos têm diferentes eficiências no processo de promover a dessorção do H₂PO₄⁻ (IVANOVA et al., 2006; SHEN et al., 2011). No estudo de Johnson et al. (2006), a liberação de P de óxido de Fe ocorreu principalmente sob pH 4,0, e, decresceu na seguinte ordem: ácido cítrico > ácido málico > ácido tartárico > ácido oxálico = ácido malônico = ácido succínico.

Por outro lado, considerando o mesmo pH 4,0, a liberação de Fe foi maior com os ácidos oxálico e cítrico, e depois, sucessivamente, com ácido malônico, ácido málico, ácido tartárico e ácido succínico (JOHNSON et al., 2006). O P liberado do óxido de Fe com os ácidos cítrico e oxálico sofreu rápida readsorção. Já no estudo de Khan et al. (2009), a dessorção do P ligado aos óxidos de Al e Fe foi maior com os grupos carboxílicos o citrato, depois com oxalato, ácido málico, tartarato, lactato, gluconato, acetato e formiato. A readsorção do P da goethita e ferrihidrita sob variadas condições de pH e força iônica, é substancialmente reduzida na presença de ácidos orgânicos de baixo peso molecular (AFIF et al. 1995; CHEN et al, 2015).

Em todos esses estudos, não conseguiram identificar se as formas de H₂PO₄⁻ dessorvidas são de ligação por esfera externa ou interna. A dessorção (troca) do P por esfera externa é instantânea pelos compostos orgânicos, mas o grande desafio é dessorver o P adsorvido por esfera interna para a solução do solo, a fim de aumentar a eficiência das adubações fosfatadas.

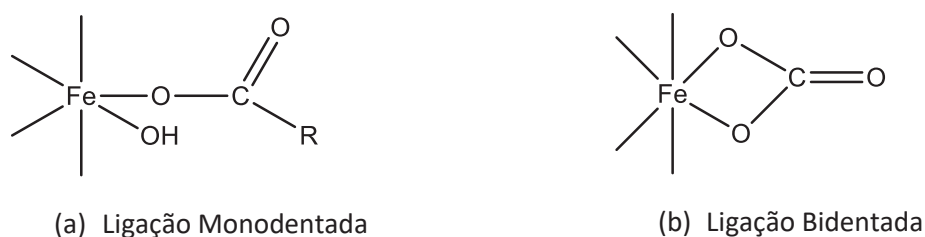
Da mesma forma descrita para o H₂PO₄⁻ (Figura 1), os compostos orgânicos podem ser adsorvidos por esfera interna por troca de ligantes na superfície dos óxidos

de Fe (Figura 4). Com esse tipo de adsorção, os grupos hidroxílicos e carboxílicos livres dos ácidos orgânicos criam uma superfície carregada negativamente, o que reduz a CTA do mineral e a adsorção por esfera externa do P (COHEN-OFRI et al., 2006).

Os estudos supracitados têm em comum o fato de que a ação dos ácidos orgânicos sobre os óxidos de Fe tem força de dessorção proporcional ao número dos grupos hidroxílicos, carboxílicos e fenólicos que compõem os ácidos. Por consequência, ácidos que possuem apenas um grupo carboxílico (e.g. láctico, propiônico, fumárico e acético) têm menor eficiência de dessorção do P do que ácidos que possuem dois (málico, oxálico, tartárico, succínico) ou três (cítrico e isocítrico) grupamentos carregados negativamente (KHAN et al., 2009).

Os grupos funcionais dos ácidos orgânicos podem formar complexos mononuclear ou binuclear com a superfície dos óxidos de Fe (Figura 4), reduzindo a adsorção por esfera interna do P. Essa ligação dos compostos orgânicos por esfera interna, enfraquece as ligações Fe – O, o que aumenta a dissolução redutiva do mineral (SCHWERTMANN, 1991) uma vez que ao se ligarem à superfície do mineral ocorre uma rápida transferência de elétrons aos centros da superfície do metal, acelerando a ruptura das ligações entre o metal e oxigênio (M-O), liberando, portanto o P para a solução.

FIGURA 7- FORMAÇÃO DE COMPLEXO DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS NA SUPERFÍCIE DOS ÓXIDOS DE FE.



FONTE: A autora (2021)

A habilidade do ácido orgânico em formar complexos mono ou multidentados na superfície do mineral (Figura 4) dependerá principalmente dos seus grupos funcionais e da sua polaridade (PHAM MINH et al., 2012; WANG et al., 2016; WEI et al., 2011).

A goethita possui alto grau de estabilidade, fazendo com que sua dissolução seja dificultada, mesmo sob condições redutoras e/ou muito ácidas (INDA-JUNIOR et

al., 2005). Entretanto, os ácidos orgânicos podem, em alguns casos, além de atuarem sobre as reações de dessorção, atuar na dissolução dos óxidos de ferro (STUMM, FURRER, 2000).

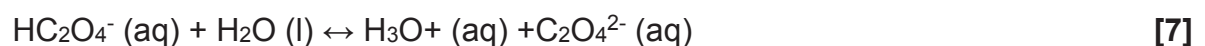
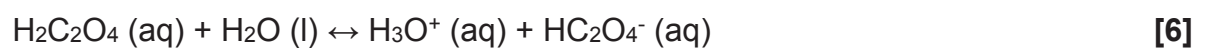
Por sua vez os minerais que contem Ca apresentam um mecanismo um pouco diferente de solubilização de H_2PO_4^- , porque a hidroxiapatita pode ser totalmente dissolvida na solução do solo (equação 5).

Com a entrada de ácidos orgânicos secretados pela atividade biológica do solo, os ânions solubilizados da hidroxiapatita poderão reagir e provocar o deslocamento do equilíbrio químico do mineral para a direita (princípio de Châtelier) (PENN, CAMBERATO, 2019) (equação 5). Além do deslocamento do equilíbrio químico por acidificação, a complexação pelos complexos orgânicos do P acelera e mantém a dissolução da hidroxiapatita (equação 5).

A Figura 5 mostra um modelo conceitual de como os ácidos orgânicos contribuem para a solubilização do H_2PO_4^- a partir de minerais de Ca (hidroxiapatita) no ciclo biogeoquímico do P. Inicialmente, os ácidos orgânicos produzidos pela atividade biológica no solo acidificam o meio e promovem a hidrólise da hidroxiapatita, ou ainda, atuam sobre as formas de ortofosfatos de Ca, ou na quelação dos íons liberados na solução do solo (Figura 4).

A dissolução da hidroxiapatita pode ocorrer de modo direto ou indireto (ADELEKE, NWANGBURUKA; OBOIRIEN, 2017). No modo direto, os ligantes orgânicos podem formar complexos com os íons metálicos e assim enfraquecerem a ligação Metal-O na superfície do mineral, catalizando a liberação do Ca para a solução. No modo indireto, os ácidos orgânicos podem aumentar a dissolução do mineral (quando o pKa do ácido for menor que o pH do solo) pela acidificação do meio durante a dissociação do ácido, como exemplificado com o ácido oxálico (DOROZHKIN, 1997) (equações 6 e 7).

Dissolução por ácido oxálico:

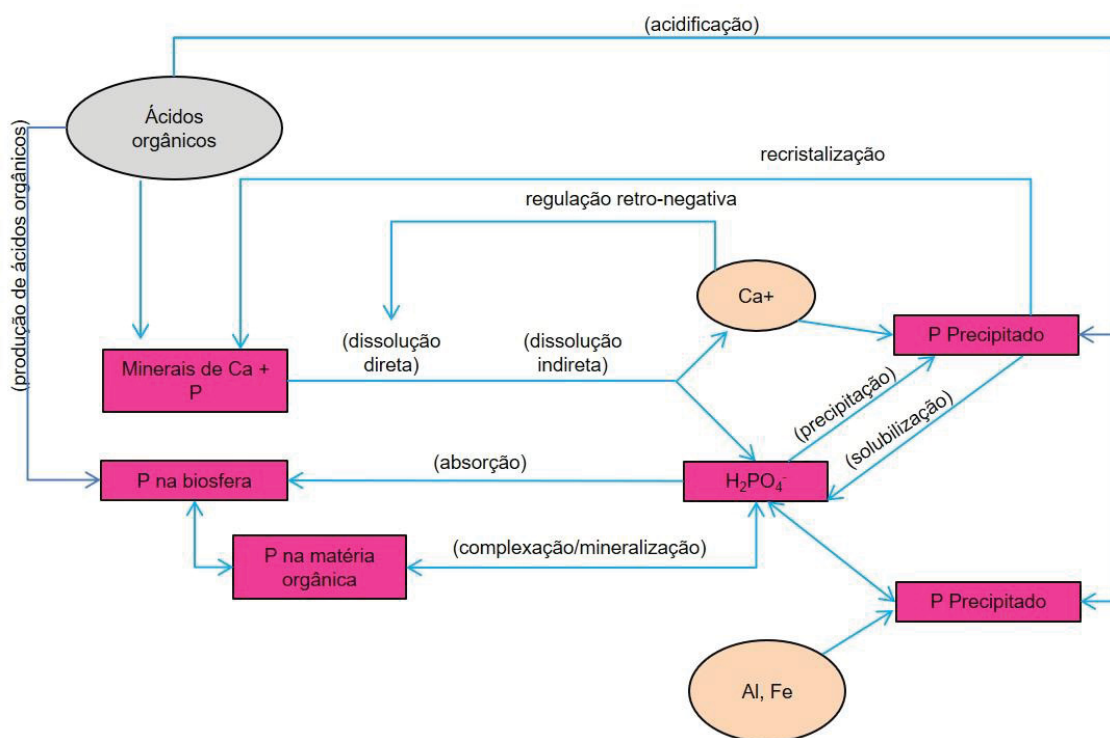


A dissolução indireta pode ser iniciada, em um primeiro estágio, a partir da acidificação, removendo primeiro íons Ca^{2+} fracamente ligados, e continuada à medida que ocorra a protonação da superfície do mineral, por remoção dos grupos de

ortofosfatos. A taxa de dissolução do mineral sofrerá influência da temperatura e da concentração de ácidos orgânicos na solução (DOROZHKIN, 2012).

Estudos de WANG et al., (2016) demonstraram a maior taxa e eficiência de dissolução da hidroxiapatita por ácidos orgânicos de baixo peso molecular no tempo 0 no pH entre 3,60 e 4,79, em decorrência do aporte de prótons provenientes da dissociação dos ácidos. Minutos mais tarde, a dissolução foi representada por um platô, devido à depleção de H^+ e neutralização da solução (WANG et al., 2006). Os resultados desses estudos sugerem que concentrações maiores de ácidos podem prolongar o efeito de dissolução da hidroxiapatita ao longo do tempo, ou até que o equilíbrio seja novamente reestabelecido.

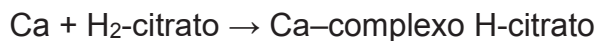
FIGURA 8-MODELO CONCEITUAL DA AÇÃO DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS LIBERADOS PELA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO SOLO SOBRE A DISSOLUÇÃO DE P A PARTIR DOS MINERAIS À BASE DE CA. OS RETÂNGULOS EM COR ROSA COM LINHAS CONTÍNUAS REPRESENTAM AS FRAÇÕES DE P NO SOLO.



As setas indicam os fluxos do P do solo em função dos processos biológicos ou químicos, que são apresentados entre parêntesis. O modelo não considera as saídas de P no sistema solo, que podem ocorrer pela extração vegetal, imobilização na biomassa microbiana, escoamento superficial ou lixiviação.

Fonte: A autora (2021)

Os ácidos orgânicos podem formar complexos com os íons protonados na superfície do mineral (equação 8), ou ainda quelarem os íons liberados, impedindo a saturação dos mesmos na solução do solo e sua reabsorção (WANG et al., 2016). Essas reações retroregulam a dissolução da hidroxiapatita (Figura 4).



[8]

Estudos realizados por ZAPATA-HERNÁNDEZ (2002) demonstraram que a taxa de dissolução da hidroxiapatita foi maior com ácido acético, depois com ácido oxálico e finalmente com ácido cítrico. Já os estudos de WEI et al., (2011), a habilidade dos ácidos orgânicos em liberar o P foi maior com ácido cítrico, depois com ácido oxálico e finalmente com ácido málico.

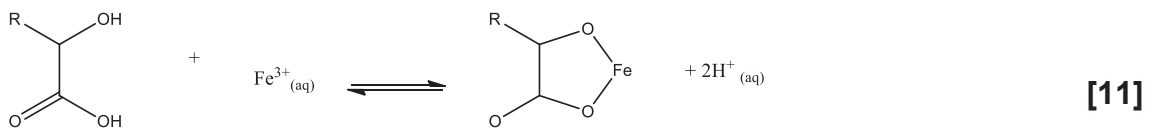
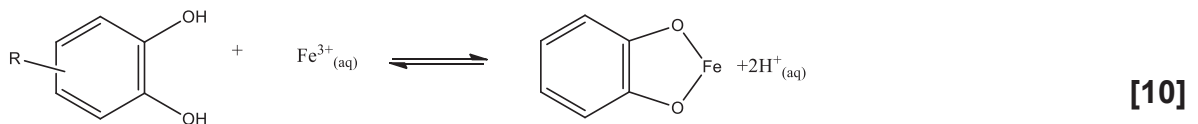
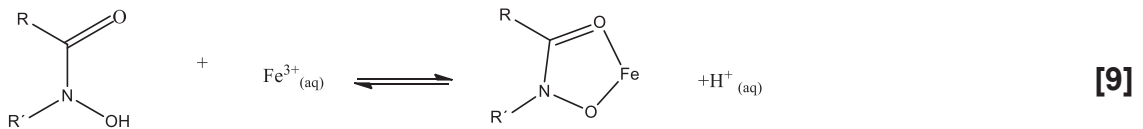
Estes estudos de dissolução são importantes para compreender os mecanismos utilizados pelos microrganismos para promover de forma direta a dissolução do P de fosfatos de Ca. A acidificação do meio promovida pela liberação de ácidos orgânicos pode contribuir de modo direto e significativo para a dissolução do mineral e liberação de formas de ortofosfato para a solução (DREVER; STILLINGS, 1997; JOHNSON; LOEPPERT, 2006). Entretanto, os estudos feitos até o momento ainda não estabeleceram a correlação entre as fontes de carbono e de nitrogênio e o estímulo da produção de ácidos orgânicos com potencial de dissolução de minerais, principalmente, em condições de campo. A compreensão da fisiologia e bioquímica microbiana pode ser fundamental para projetar a capacidade de promover a solubilização do P sob condições específicas, permitindo o desenvolvimento de bioinsumos muito mais eficazes, o que poderia diminuir a demanda por fertilizantes fosfatados.

2.5.2 Sideróforos

Sideróforos são compostos orgânicos de baixo peso molecular. Muitos são hexadentados e possuem alta afinidade e especificidade de ligação com o Fe. Esses compostos são utilizados pelos microrganismos para aumentar a disponibilidade de Fe em condições de privação do nutriente no meio de crescimento (RODRIGUEZ, 2000; RICHARDSON, SIMPSON, 2011; ALORI et al., 2017). Os sideróforos são amplamente produzidos por bactérias, leveduras e fungos (BENITE, MACHADO, 2002), como *Escherichia coli*, *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pantoea allii*, *Rhizobium radiobacter*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aerobacter aerogens*, *Paenibacillus illinoisensis*, *Bacillus sp*, *Aspergillus nidulans*, *A. versicolor*, *Penicillium chrysogenum*, *P. citrinum*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Trametes versicolor*, *Ustilago sphaerogina*, *Saccharomyces cerevisiae*,

Rhodotorula minuta e *Debaromyces* (FERREIRA et al., 2019; KANNAHI, SENBAGAM, 2014, KREWULAK, VOGEL, 2008; LIU et al, 2017; SABATÉ et al., 2017;)

O complexo sideróforo-Fe formado é de coordenação pseudo-octaédrica, ou seja, que possuem um arranjo molecular que formam um octaedro distorcido e não regular, e termodinamicamente estável, que permite que este seja transportado para o interior da célula (RODRIGUEZ, 2000; RICHARDSON, SIMPSON, 2011; ALORI et al., 2017). Os sideróforos são amplamente produzidos por bactérias aeróbias. BENITE et al. (2002) demonstram através de equações, que a ligação entre os sítios de complexação dos sideróforos e o Fe^{3+} tendem a formar ligações muito estáveis (equações 9-11):



A geometria do ligante do sideróforo, as quais incluem estruturas acíclicas lineares (exemplo: Desferrioxamina B, exocíclicas (exemplo ferricromo) e endocíclicas (exemplo: Desferrioxamina) (BENITE; MACHADO, 2002), determinará o grau de estabilidade do complexo formado com o Fe^{3+} . Por ser um íon metálico duro (íon metálico do tipo a, pequenas e pouco polarizáveis), o Fe^{3+} preferencialmente se coordena com outros íons duros, como o oxigênio, através de uma ligação hexadentada, formando um arranjo octaedral. A disposição dos grupos funcionais presentes no arranjo geométrico do sideróforo podem, por exemplo, dificultar a formação desse arranjo octaedral, ou as ligações hexadentadas, influenciando, portanto, na estabilidade do complexo sideróforo-Fe (Figura 6).

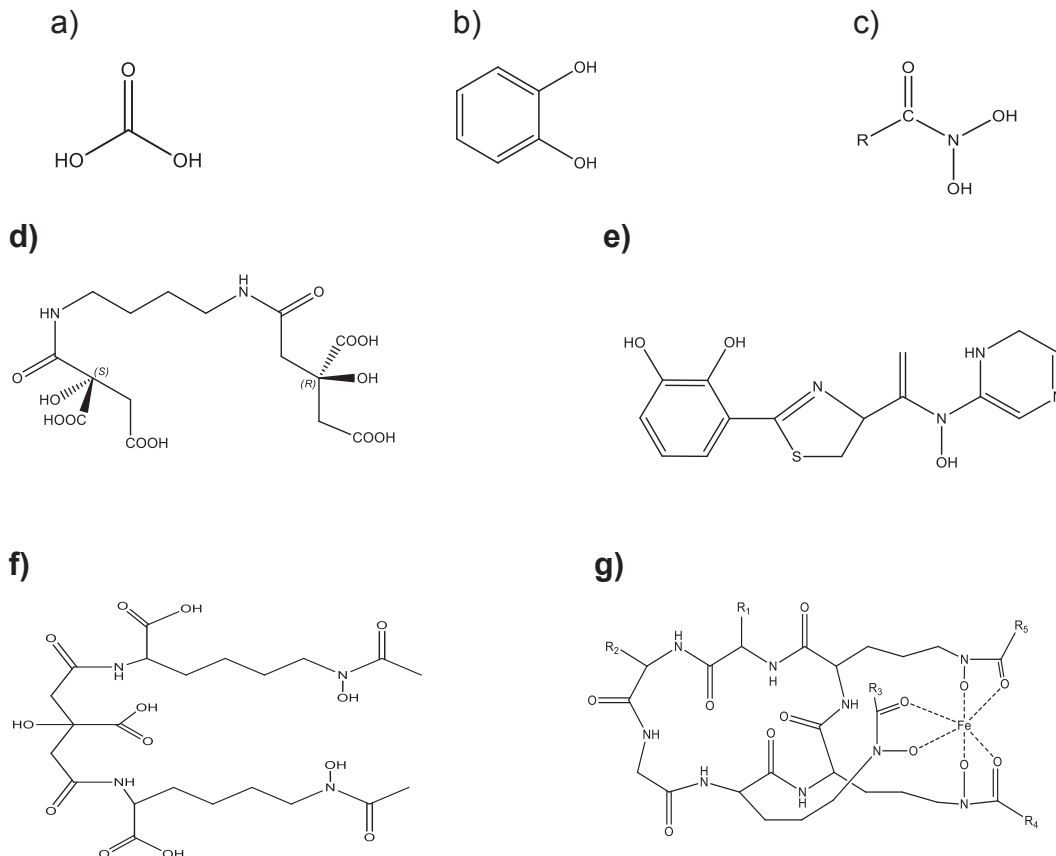
Dependendo de onde estejam estes grupos funcionais, ao formar o complexo com o Fe, o sideróforo pode sofrer uma mudança de conformação, o que pode influenciar sua eficiência em assumir um arranjo favorável à permeação celular e

assim comprometer o fornecimento de Fe ao microrganismo para suas atividades metabólicas (BENITE; MACHADO, 2002).

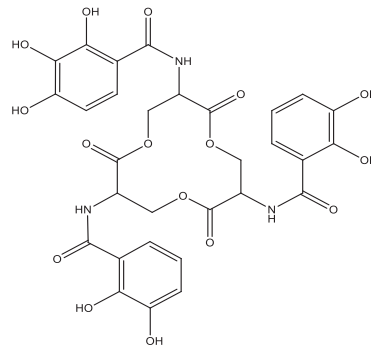
Os principais grupos funcionais presentes nos sideróforos incluem os catecóis, ácidos hidroxâmicos e os ácidos α -hidroxicarboxílicos, e dentre as principais classes químicas estão o ferrocromo, enterobactina, rizoferrina e aerobactina (ANDRADE et al., 2000; LIERMANN et al., 2000; MILTON et al., 2008) (Figura 7).

No solo, as maiores concentrações de sideróforos são encontradas na solução do solo rizosférico na magnitude de 1 mmol L^{-1} . A rizosfera propicia um ambiente favorável para a proliferação de microrganismos, já que as plantas liberam muitos compostos orgânicos para o solo durante o seu desenvolvimento e crescimento (KRAEMER, 2004).

FIGURA 9-PRINCIPAIS GRUPOS FUNCIONAIS PRESENTES NOS SIDERÓFOROS: A) ÁCIDO α -HIDROXICARBOXÍLICO; B) CATECÓIS; C) ÁCIDO HIDROXÂMICO. A PARTIR DOS GRUPOS FUNCIONAIS, DA SUA CONFORMAÇÃO E ÍONS QUE O COMPÕE, OS SIDERÓFOROS SÃO COLOCADOS EM CLASSES QUÍMICAS. DENTRE AS PRINCIPAIS ESTÃO: D) RHIZOFERRINA (COM GRUPOS FUNCIONAIS HIDROXICARBOXILADOS); E) ANGUIBACTINA (GRUPOS FUNCIONAIS CATECOL-HIDROXÂMICO); F) AEROBACTINA (GRUPOS FUNCIONAIS α -HIDROXICARBOXILADOS); G) FERRICROMO, FORMANDO COMPLEXO COM FE (GRUPOS FUNCIONAIS HIDROXAMATO); H) ENTEROBACTINA (COM GRUPOS FUNCIONAIS CATECOLADOS)

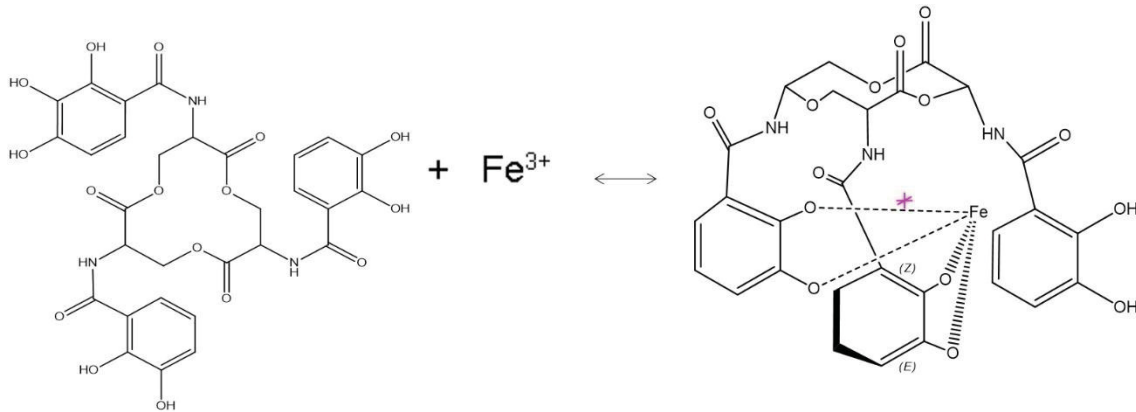


h)



(ADAPTADO DE: BUTLER, THEISSEN, 2010; KREWULAK; VOGEL, 2008; RAYMOND, DERTZ, 2004).

FIGURA 10-DOBRAMENTO DA ENTEROBACTINA AO FORMAR O COMPLEXO FE(III)-ENTEROBACTINA.



(ADAPTADO DE KREWULAK; VOGEL, 2008; LESLIE ET AL., 2007).

A produção de sideróforos pelos microrganismos é fortemente influenciada pelo pH e a densidade de células microbianas. Por outro lado, a anaerobiose é um fator limitante à produção microbiana de sideróforos, uma vez que esta condição tende a favorecer a solubilidade dos óxidos de Fe e aumentar a concentração deste nutriente na solução do solo (KRAEMER et al., 2020; LIERMANN et al., 2000). As plantas também contribuem para a produção de sideróforos, contudo, estes tendem a possuírem uma baixa afinidade com o Fe³⁺ quando comparado ao produzido pelos microrganismos (LIERMANN et al., 2000).

Os sideróforos atuam em sinergismo com os ácidos orgânicos (especialmente, o ácido oxálico) que são secretados pelos microrganismos (REICHARD et al., 2007). Nesse caso, os ácidos orgânicos secretados reduzem o pH do meio e protonam a superfície dos óxidos de Fe (Figura 3), gerando carga para que os grupos funcionais do sideróforo se liguem ao mineral. Ao se ligarem ao sítio de carga do Fe, os sideróforos promovem a redução do Fe³⁺ a Fe²⁺. A formação de

complexo Sid-Fe, reduz atividade desse produto da reação e desloca o equilíbrio químico em favor da dissolução do mineral (Figura 3).

Ainda, as forças de ligação entre o sideróforo e a superfície do mineral elevam o potencial elétrico que pode ser suficiente para promover a dissolução do mineral e, conseqüentemente, a dessorção do P (Figura 5) (COBAN, 2019; NEILANDS, 1995; FARHAT et al., 2015, KOSMAN, 2013). A constante de estabilidade, formada independentemente da ação do próton, Sideróforo – Fe(III), por exemplo para a Enterobactina é de 10^{49} mol L⁻¹, para a bacilobactina, é de $10^{47,6}$ mol L⁻¹ podendo chegar até $10^{11,5}$ mol L⁻¹ para outros grupos de sideróforos (BUTLER, THEISSEN, 2010; KAIPANCHERY, et al., 2020;).

Alguns estudos também sugerem que a dissolução dos óxidos de Fe é mais influenciada pela natureza do ligante em relação ao efeito de protonação da superfície do mineral (MIKUTTA; KRETZSCHMAR, 2008; REICHARD, KRETZSCHMAR, KRAEMMER, 2007). De acordo com esses estudos, a dissolução dos óxidos de Fe por efeito de complexação dos sideróforos é função das taxas das reações de dissolução controlada pelo ligante, coeficiente de dissolução promovido pelo ligante, da concentração do ligante adsorvido, bem como, da natureza dos complexos *Fe-L* na superfície do mineral:

$$RL = k_{Li} [Li]_{ads}^n (\Delta G) \quad [11]$$

Onde *RL* [nmol m⁻² h⁻¹] refere-se às taxas das reações de dissolução controlada pelo ligante *Li*. *K_{Li}* [h⁻¹] é a taxa do coeficiente da dissolução promovido pelo ligante *Li*. *[Li]_{ads}* [nmol m⁻²] é a concentração do ligante adsorvido e *n* é ordem da taxa (REICHARD; KRETZSCHMAR; KRAEMER, 2007).

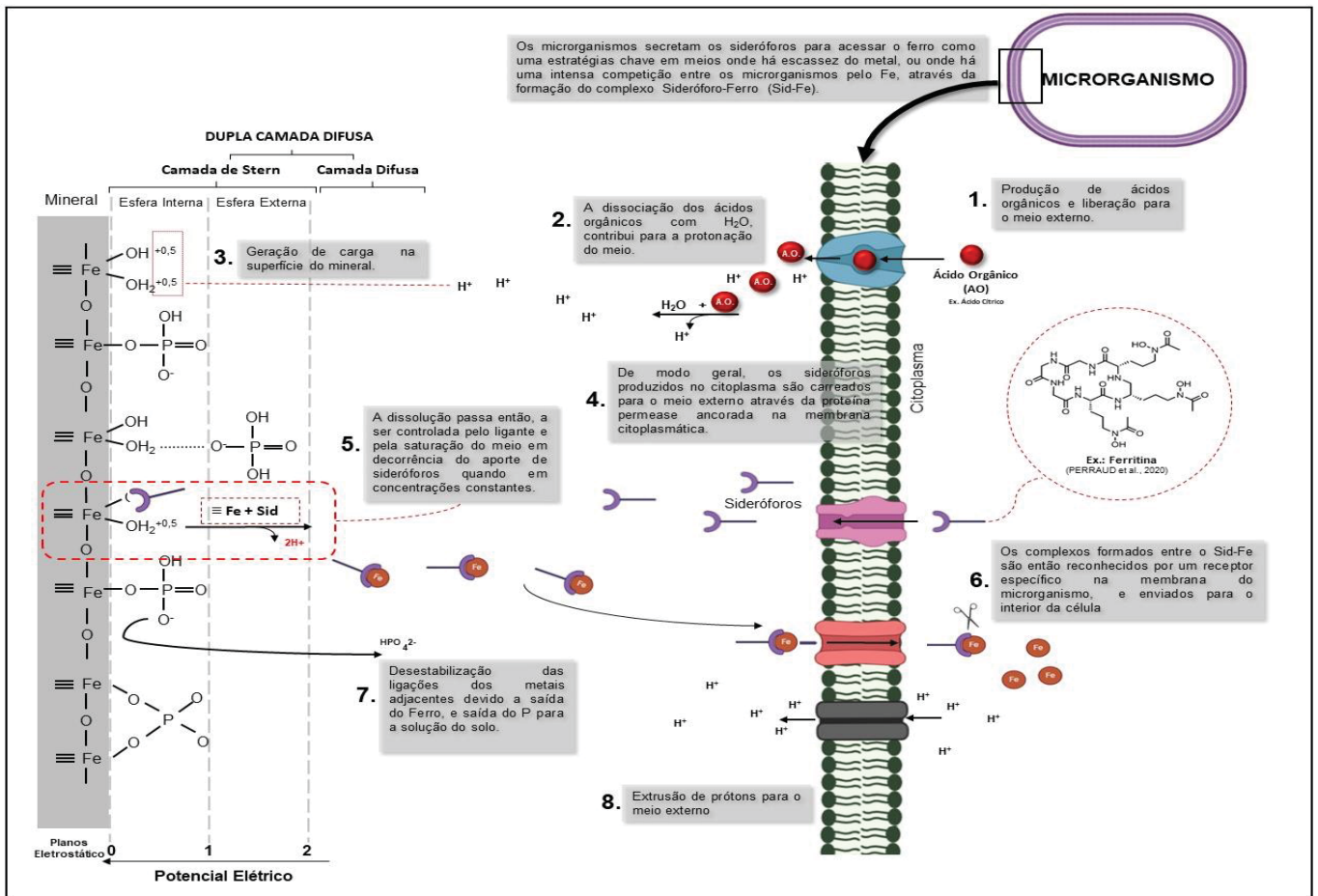
Nesse sentido, a formação do complexo precursor por adsorção do ligante polariza as ligações entre os íons Fe e O da estrutura cristalina, promovendo a reação de dissolução do mineral (Figura 5) (CHEAH et al., 2003; DUCKWORTH; MARTIN, 2001; SCHWERTMANN, 1991; WANG et al., 2017).

Porém, o processo de dissolução do óxido de Fe (goethita) depende dos dois processos: protonação e troca de ligante (Figura 3) (HOLMEN, CASEY, 1996; CHEA et al., 2003).

A capacidade de saturação do meio pelos aporte de sideróforos, e em concentrações constantes e longe das condições de equilíbrio, tenderá a controlar a

taxa geral de dissolução (MIKUTTA; KRETZSCHMAR, 2008; REICHARD; KRETZSCHMAR; KRAEMER, 2007). Isso acarretará uma lenta formação de espécies cineticamente lábeis de Fe, as quais se desprenderão do mineral e passarão para a solução do solo, na forma de complexo sideróforo-Fe (Figura 8).

FIGURA 11- MECANISMO DE DESSORÇÃO DO P DA SUPERFÍCIE DOS ÓXIDOS DE Fe ATRAVÉS DA PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS PELOS MICRORGANISMOS

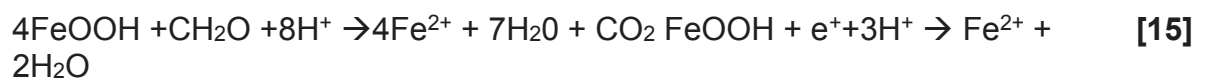
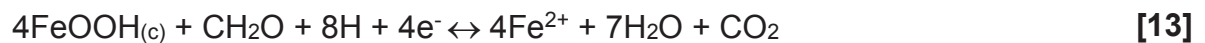
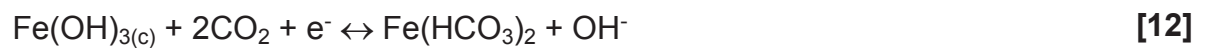


Fonte: A autora (2021)

2.5.3. Potencial de próton (pH) e potencial redox (Eh)

Os estudos realizados sobre mecanismos microbiológicos de solubilização do P raramente associam a possível interação entre o Eh e pH. As variações no Eh na zona de interação da superfície do óxido de Fe e o envoltório celular do microrganismo podem ser mais um mecanismo importante na dissolução dos minerais: solos com óxidos de Fe - os valores críticos de Eh para a redução do Fe^{3+} são de 300 mV em pH 5, entre 300 e 100 mV em pH 6 e 7, e -100 mV em pH 8 (ANN et al., 1999); Eh ao redor do microrganismo do solo pode variar de 150 a -300 mV. Os seguintes mecanismos microbiológicos resultam na redução do Eh: respiração celular,

condições de estresse onde há a diminuição das condições de O₂ e depleção da concentração de P ou outros nutrientes (OKTYABRSKII, SMIRNOVA, 2011, SØNDERGAARD, 2009; WANG et al., 2019). Dessa forma, a solubilidade do fósforo, adsorvido à superfície do óxido de Fe estará diretamente relacionada com a capacidade do meio em reduzir o Fe³⁺ (equações redox no solo 12 a 15), promovendo a dissolução do mineral (SCHWERTMANN, 1991):



De forma consolidada, a dissolução dos óxidos de Fe é facilitada pela protonação, complexação e redução (Figuras 3 e 8) (CORNELL; SCHWERTMANN, 2003; KRAEMER, 2004; JAKOBSEN, 2006; LARSEN; POSTMA; Schwertmann, 1991). Conforme ilustrado nas Fig. 3 e 6 e de acordo com diversos estudos sobre taxa de dissolução utilizando diferentes óxidos de Fe evidenciam que as características intrínsecas aos óxidos, como tamanho do cristalito e grau de substituição do Fe pelo Al, influenciam as taxas do processo de dissolução do mineral (DEGUILLAUME et al., 2010; HUSSON, 2013; INDA JUNIOR et al., 2005; PIASECKI, SZYMANEK, CHARMAS, 2019; SCHWERTMANN, 1991; ZHANG et al., 2019;).

Nos ambientes aeróbicos, à medida que a atividade metabólica dos microrganismos consome a maior parte do oxigênio disponível, os elétrons tenderão a serem transferidos para os aceptores que estiverem disponíveis. Então, o Fe³⁺ poderá ser rapidamente reduzido, aumentando assim as formas solúveis de Fe²⁺ (equações 12 a 15) (SCHAETZL; ANDERSON, 2005; SCHWERTMANN, 1991).

Somado a isso, ainda os ácidos orgânicos secretados pelos microrganismos também agem como agentes redutores, uma vez que os grupos carboxílicos dos ácidos se decompõem e formam CO₂, com liberação de elétrons para o meio. Os ácidos orgânicos podem ainda interagir com outros compostos formando reações redox de pseudo-primeira ordem com o Fe. Ainda, características dos ácidos, como grupos funcionais, pK_as, grau de oxidação do ácido orgânico influenciam no seu

potencial redox (IBRAHIM et al., 2019; KIM et al., 2010; LAZO et al., 2017; SHAFIGH et al., 2019).

O contato direto da membrana bacteriana acelera a redução do óxido de Fe, o que pode ser compreendido através de análise sobre o efeito redox na solubilidade do Fe (LINDSAY, 1979). A atividade dos elétrons no solo controla a razão de Fe³⁺ para Fe²⁺ em solução de acordo com a reação (equação 16).



$$\log\left[\frac{\text{Fe}^{2+}}{\text{Fe}^{3+}}\right] = 13,04 - \text{pe}$$

- Se $\text{pe} = 13,04$ (atividade de $(\text{e}^{-}) = 10^{-13,04} \text{ mol L}^{-1}$), $\log\left[\frac{\text{Fe}^{2+}}{\text{Fe}^{3+}}\right] = 0$, como $\log 1 = 0$, nessas condições, as atividades de Fe²⁺ e Fe³⁺ na solução do solo se igualam.
- Se $\text{pe} = 12,04$ (condição mais reduzida, pois atividade de $(\text{e}^{-}) = 10^{-12,04} \text{ mol L}^{-1}$), $\log\left[\frac{\text{Fe}^{2+}}{\text{Fe}^{3+}}\right] = 1$, como $\log 10 = 1$, a redução de uma unidade no pe (aumento de 10 vezes na atividade de e⁻), aumenta a atividade do Fe²⁺ em relação ao Fe³⁺ em 10 vezes.
- Relação entre pe e Eh (Souza et al. 1999): $\text{pe} = 16,95 \text{ Eh}$. Na condição de equilíbrio ($\text{pe} = 13,04$), $\text{Eh} = 0,769 \text{ V}$. Em condição extrema de atividade microbiana ($\text{Eh} \sim -300 \text{ mV}$), $\text{pe} = 16,95 \times -0,3 = -5,085$, aplicando na equação original, vem $\log\left[\frac{\text{Fe}^{2+}}{\text{Fe}^{3+}}\right] = 13,04 - (-5,085) \sim 18$, ou seja a relação de atividade será $[\text{Fe}^{2+}] = 10^{18} \text{ vezes } [\text{Fe}^{3+}]$.

Os processos redox mediados por microrganismos podem diminuir o potencial redox para até -300 mV. Em um potencial redox tão baixo, o Fe³⁺ é praticamente todo reduzido a Fe²⁺ (relação de atividade $[\text{Fe}^{2+}] = 10^{18} \text{ vezes } [\text{Fe}^{3+}]$ – equação 16), dissolvendo o óxido de Fe e liberando o P adsorvido por esfera interna ao mineral (SØNDERGAARD, 2009).

A extrusão de ácidos ou outros compostos capazes de acidificar o meio se somam ao efeito de redução, uma vez que a atividade do Fe²⁺ também é controlada pelo pH. Logo o parâmetro para a função redox é $\text{pe} + \text{pH}$. Isto ocorre porque parte do processo está relacionado à entrada de elétrons no sistema e parte à dependência do pH das espécies reduzidas.

A combinação do efeito do pH (acidificação) e do pe (redução) na solubilização da fase sólida Fe(OH)₃(s) pode ser descrita pela equação 16 e 17 (LINDSAY, 1979). De maneira geral, a redução do pe (aumento da atividade de

elétrons) está associada ao aumento de pH (SOUZA et al. 1999), pois as reações de redução envolvem o consumo de prótons. Aplicando as condições de máxima redução do Fe^{3+} medidas por ANN, REDDY, DELFINO (1999) ($E_h = -100$ mV para $\text{pH} = 8$) na equação 16 de dissolução da fase sólida $\text{Fe}(\text{OH})_3$ tem-se:

$$\text{Log}[\text{Fe}^{2+}] = 15,74 - (\text{pe} + \text{pH}) - 2 \text{ pH} \quad [17]$$

- Como $\text{pe} = 16,95 E_h$ (Souza et al., 1999), $\text{pe} = 16,95 \times -0,1 = 1,695$ (atividade de elétrons = $10^{-1,695}$ mol L⁻¹).

$\text{Log}[\text{Fe}^{2+}] = 15,74 - (1,695 + 8) - 2 \times 8 = -9,955$, ou seja a atividade de (Fe^{2+}) na solução do solo mantida pela dissolução da espécie sólida $\text{Fe}(\text{OH})_3$ nas condições acima será $[\text{Fe}^{2+}] \sim 10^{-10}$ mol L⁻¹.

Procurando uma condição de equilíbrio químico de dissolução da espécie sólida $\text{Fe}(\text{OH})_3$ (relação entre pe e pH), pode-se definir um ambiente muito mais oxidado ($\text{pe} = 13,04$, ou atividade de elétrons = $10^{-13,04}$ mol L⁻¹) e pH um pouco mais alcalino ($\text{pH} = 7,57$). Nessa condição de equilíbrio, a atividade de $[\text{Fe}^{2+}]$ na solução do solo é de apenas 10^{-20} mol L⁻¹.

Embora as ligações de complexo de esfera interna formadas entre o Fe e o P (mononuclear e binuclear, Figura 1) tornam difíceis a dessorção e a disponibilização de H_2PO_4^- na solução, por outro lado, a dissolução do mineral promovidas pelas condições redox e acidificação poderiam liberar as formas de P inicialmente fixados pelos óxidos de Fe (ANN, REDDY, DELFINO, 1999; RAHUTOMO et al., 2018;)

2.6 FOSFATASES E MINERALIZAÇÃO DE P A PARTIR DE OUTRAS FRAÇÕES DO SOLO

Os mecanismos por enzimas fosfatases são esperados ocorrerem sobre a forma orgânica do P, não sendo deste modo, considerados nos modelos conceituais propostos neste trabalho. Ainda, existem evidências que as enzimas fosfatases, alcalinas e ácidas, não demonstraram uma correlação positiva com a liberação das formas inorgânicas de P adsorvidas aos minerais da fração argila (LEMANOWICZ, 2018). Além disso as enzimas fosfatases estão relacionadas ao mecanismo de mineralização do P no solo. A mineralização é compreendida como o processo pelo qual os compostos químicos presentes na matéria orgânica são decompostos ou oxidados para as formas disponíveis para as plantas. A transformação das moléculas

orgânicas no solo é realizada principalmente por sua microbiota como bactérias e fungos e pela liberação de exsudatos com enzimas, ácidos orgânicos ou outros compostos (SHARMA, GARG, 2018; HAM et al., 2018).

Para TURNER et al., (2005); SHEN et al., (2011) o fósforo orgânico pode ser degradado/mineralizado pelos processos abióticos e bióticos. Em relação aos processos abióticos existem duas vias bem documentadas que mostram como isso ocorre: (1) reações hidrolíticas (2) reações fotolíticas. A importância de cada mecanismo ou quais mecanismos irão imperar dependerá principalmente da natureza dos compostos presentes no solo (BHAT et al., 2017; BROWN et al., 2013; SHARMA et al., 2014; SHEN et al., 2011).

Em relação aos fatores bióticos, a mineralização pode ser dividida em dois processos: 1) Mineralização bioquímica através de exoenzimas fosfatase e fitase, as quais são reguladas pela demanda por P, e pela disponibilidade de N; 2) Mineralização biológica: liberação de Pi de materiais orgânicos, durante a oxidação do carbono (C), pelos organismos do solo, regulada pela demanda de energia (HAM et al., 2018; LEMANOWICZ, 2018, RICHARDSON, SIMPSON, 2011; RITA et al., 2013; SHEN et al., 2011; SPOHN, KUZYAKOV, 2013).

2.6 CONCLUSÕES

Os mecanismos microbiológicos de dessorção do P não atuam de forma independente, mas de forma sinérgica.

Os microrganismos possuem papel fundamental na cinética de dissolução dos minerais Ca-P, aumentando a taxa de dissolução do mineral através da produção de metabólitos secundários como os ácidos mono, di ou tricarbóxicos. As características dos ácidos, como capacidade de formar complexos na superfície do mineral (quantidade e qualidade dos grupos funcionais) e suas capacidades de se dissociar, promovem a dissolução direta ou indireta do mineral. As concentrações dos ácidos possui papel relevante no processo de dissociação, controlando diretamente a velocidade da reação de dissolução.

A atividade metabólica dos microrganismos desempenha papel relevante e distinto na promoção do aporte de H_2PO_4^- para a solução do solo, a partir de fontes minerais, como os óxidos de Fe. A respiração celular microbiana cria condições redox da comunidade bacteriana, fazendo com que aumente a solubilidade do Fe. Somado a isso, a liberação de ácidos orgânicos promove a protonação da superfície do mineral. Assumindo-se que a atividade do ligante, promovida pelo sideróforo, ocorre em paralelo com a dissolução através da protonação, espera-se que a taxa geral da dissolução seja aumentada, promovendo a dessorção das formas de P adsorvidas pelo complexo de esfera interna e aumento a sua concentração na solução do solo.

Compreendendo-se as características dos metabólitos liberados pelos microrganismos, a atividade metabólica das espécies e as características mineralógicas dos solos, é possível verificar que estes desempenham papéis específicos na dissolução mineral ou dessorção de minerais, como os óxidos de Fe.

REFERÊNCIAS

ADELEKE, R.; NWANGBURUKA, C.; OBOIRIEN, B. Origins, roles and fate of organic acids in soils:

AFIF, E.; BARRON, V.; TORRENT J. Organic matter delays but does not prevent phosphate sorption by Cerrado soils from Brazil. **Soil Science**. 159:207–211, 1995
A review. **South African Journal of Botany**, v. 108, p. 393–406, 2017.

AGNELLO AC. Potential of alfalfa for use in chemically and biologically assisted phytoremediation of soil co-contaminated with petroleum hydrocarbons and metals ;249, 2014

ANDRADE, A. et al. The iron uptake mechanisms of enteroinvasive Escherichia coli. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 200–205, 2000.

ANN, Y.; REDDY, K. R.; DELFINO, J. J. Influence of redox potential on phosphorus solubility in chemically amended wetland organic soils. **Ecological Engineering**, v. 14, n. 1–2, p. 169–180, 1999.

ANTELO, J. et al. Effects of pH and ionic strength on the adsorption of phosphate and arsenate at the goethite-water interface. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 285, n. 2, p. 476–486, 2005.

ASH, C. et al. Different low-molecular-mass organic acids specifically control leaching of arsenic and lead from contaminated soil. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 187, p. 18–30, 2016.

ASOMANING, S. K. Processes and Factors Affecting Phosphorus Sorption in Soils. In: RUANO, P. et al. (Eds.). . **Sorption in 2020s**. 1. ed. United Kingdom: Intechopen, 2020. p. 13.

ASOMANING, S. K. Processes and Factors Affecting Phosphorus Sorption in Soils. In: RUANO, P. et al. (Eds.). . **Sorption in 2020s**. 1. ed. United Kingdom: Intechopen, 2020. p. 13.

BELELLI, P. G.; FUENTE, S. A.; CASTELLANI, N. J. Phosphate adsorption on goethite and Al-rich goethite. **Computational Materials Science**, v. 85, p. 59–66, 2014.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. DE P.; MACHADO, B. DA C. Sideróforos: uma resposta dos microorganismos. **Química Nova**, v. 25, n. 6b, p. 1155–1164, 2002.

BHAT, N. A. et al. Soil biological activity contributing to phosphorus availability in vertisols under long-term organic and conventional agricultural management. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. September, p. 1–11, 2017.

BLEAM, W. Surface Chemistry and Adsorption. In: **Soil and Environmental Chemistry**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. p. 385–443.

BOUDIA, S. et al. Mineralogical transformation during hydroxyapatite dissolution in simple aqueous solutions. **Chemical Geology**, v. 477, n. December 2017, p. 85–91, 2018.

BRAY, R.H. AND KURTZ, L.T. Determination of Total Organic and Available Forms of Phosphorus in Soils. **Soil Science**, 59, 39-45, 1945.

BROWN, S. et al. Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 67, p. 313–336, 2013.

BROWNING, T. J. et al. Iron limitation of microbial phosphorus acquisition in the tropical North Atlantic. **Nature Communications**, v. 8, n. May, p. 15465, 2017.

BRUCKER, E.; SPOHN, M. Formation of soil phosphorus fractions along a climate and vegetation gradient in the Coastal Cordillera of Chile. **Catena**, v. 180, n. November 2018, p. 203–211, 2019.

BÜNEMANN, E. K. Assessment of gross and net mineralization rates of soil organic phosphorus - A review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 89, p. 82–98, 2015.

BUTLER, A.; THEISEN, R. M. Iron(III)-siderophore coordination chemistry: Reactivity of marine siderophores. 2009.

CAMACHO, M. E. *et al.* Morphology and characteristics of eight Oxisols in contrasting landscapes of Costa Rica. **Catena**, v. 197, p. 104992, 1 fev. 2021.

CHEAH, S. F. *et al.* Steady-state dissolution kinetics of goethite in the presence of desferrioxamine B and oxalate ligands: Implications for the microbial acquisition of iron. **Chemical Geology**, v. 198, n. 1–2, p. 63–75, 2003.

CHITRAKAR, R. *et al.* Phosphate adsorption on synthetic goethite and akaganeite. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 298, n. 2, p. 602–608, 2006.

CHRISTOFFERSEN, J.; CHRISTOFFERSEN, M. R.; KJAERGAARD, N. The kinetics of dissolution of calcium hydroxyapatite in water at constant pH. **Journal of Crystal Growth**, v. 43, n. 4, p. 501–511, 1978.

COHEN-OFRI, I.; WEINER, L.; BOARETTO, E.; MINTS, G.; WEINER, S. ; Modern-fossil charcoal: aspects of structure and diagenesis. **Journal of Archaeological Science**, v. 33, p. 428–439, 2006.

CORDELL, D.; DRANGERT, J.O.; WHITE, S. The story of phosphorus: global food security and food for thought. **Global Environmental Changes**, v.19, p.292-305, 2009.

CORNELL, R. M.; SCHWERTMANN, U. **The Iron Oxides: Structure, Reaction, Occurrence and Uses**. 2^a ed. Verlag: Wiley-VCH GmbH &Co. KGaA, 2003.

CULMAN, S. W. *et al.* Calibration of Mehlich-3 with Bray P1 and Ammonium Acetate in the Tri-State Region of Ohio, Indiana and Michigan. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 51, n. 1, p. 86–97, 2020.

CUNHA, G.M.; GAMA-RODRIGUES, A.C.; COSTA, G.S.; VELLOSO, A. C. X. ; Fosforo orgânico em solos sob florestas montanas, pastagens e eucalipto no Norte Fluminense. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 31, p. 667–671, 2007.

DEGUILLAUME, L. *et al.* Effect of iron dissolution on cloud chemistry: From laboratory measurements to model results. **Atmospheric Pollution Research**, v. 1, n. 4, p. 220–228, 2010.

DOROZHKIN, S. V. Surface reactions of apatite dissolution. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 191, n. 2, p. 489–497, 1997.

_____. Dissolution mechanism of calcium apatites in acids: A review of literature. **World Journal of Methodology**, v. 2, n. 1, p. 1, 2012.

DOS REIS, J. V. *et al.* Interpretation of soil phosphorus availability by mehlich-3 in soils with contrasting phosphorus buffering capacity. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 44, p. 1–21, 2020.

DREVER, J. I.; STILLINGS, L. L. The role of organic acids in mineral weathering. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 120, n. 1–3, p. 167–181, 1997.

DUCKWORTH, O. W.; MARTIN, S. T. Surface complexation and dissolution of hematite by C1-C6 dicarboxylic acids at pH = 5.0. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 65, n. 23, p. 4289–4301, 2001

ESWARAN H, REICH P.; BEINROTH, F. Global distribution of soils with acidity. In *Plant -Soil Interactions at Low pH*. Ed. Moniz et al. pp. 159–164. Brazilian Soil Science Society, Belo Horizonte, 1997.

FAGERIA, N. K.; NASCENTE, A. S. **Management of soil acidity of South American soils for sustainable crop production**. [s.l.] Elsevier, 2014. v. 128

FAN, H.; Cui, Z.; He, G.; Huang, L.; Chen, M. Phosphorus adsorption onto clay minerals and iron oxide with consideration of heterogeneous particle morphology. **Science of the Total Environment**, v.605–606, p.357–367, 2017.

FERNÁNDEZ, R. I. E.; NOVAIS, R.F; NOVAIS-NUNES, F.; KER, J. C. Reversibilidade Do Fósforo Não-Lábil Em Solos Submetidos À Redução Microbiana E Química . **Rev. Bras. Ci. Solo**, v. 32, n. 1, p. 2307–2317, 2008.

FERREIRA, C. M. H. *et al.* Comparison of five bacterial strains producing siderophores with ability to chelate iron under alkaline conditions. **AMB Express**, v. 9, n. 1, 2019.

FIHRI, A. *et al.* Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 347, p. 48–76, 2017.

FINK, J. *et al.* Iron oxides and organic matter on soil phosphorus availability. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 4, p. 369–379, 2016.

FOX, J. L. *et al.* A new two-site model for hydroxyapatite dissolution in acidic media. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 67, n. 2, p. 312–330, 1978.

GATIBONI, L. C. *et al.* Quantificação do fósforo disponível por extrações sucessivas com diferentes extratores em Latossolo Vermelho distroférico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, n. 4, p. 1023–1029, 2002.

GATIBONI, L. C.; KAMINSKI, J. Solo após extrações sucessivas com mehlich-1 , mehlich-3 e resina trocadora de ânions (1). v. 29, n. 3, p. 363–371, 2005.

GAXIOLA, R.A.; EDWARDS, M.; ELSER, J.J. A transgenic approach to enhance phosphorus use efficiency in crops as part of a comprehensive strategy for sustainable agriculture. **Chemosphere**, v.84, p.840-845, 2011.

GÉRARD, F. Clay minerals, iron/aluminum oxides, and their contribution to phosphate sorption in soils — A myth revisited. **Geoderma**, v. 262, p.213–226, 2016.

GU, B. *et al.* Adsorption and Desorption of Natural Organic Matter on Iron Oxide: Mechanisms and Models. **Environmental Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 38–46, 1994.

GYANESHWAR, P., KUMAR, N. J., PAREKA, L. J., & PODLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving nutrition of plants. **Plant & Soil**, 245, 83---93, 2002.

HERNÁNDEZ, R. D. Z. **Química de los procesos pedogenéticos**. Medellín: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Escuela de Geociencias, 2006. 358 p

HAM, B. K. *et al.* Insights into plant phosphate sensing and signaling. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 1–9, 2018.

HEUER, S.; GAXIOLA, R.; SCHILLING, R.; HERRERA-ESTRELLA, L.; LÓPEZ-ARREDONDO, D.; WISSUWA, M.; DALHAIZE, E.; ROUACHED, H. Improving phosphorus use efficiency: a complex trait with emerging opportunities. **The Plant Journal**, v.90, p.868-885, 2017.

HING, K. A.; BEST, S. M.; BONFIELD, W. Characterization of porous hydroxyapatite. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 10, n. 3, p. 135–145, 1999.

HOLMEN, B. A.; CASEY, W. H. Hydroxamate ligands, surface chemistry, and the mechanism of ligand-promoted dissolution of goethite α -FeOOH(s). **Geochim. Cosmochim. Acta**, 13,1297-1307,1996.

HUSSON, O. Redox potential (Eh) and pH as drivers of soil /plant / microorganism systems: A transdisciplinary overview pointing to integrative opportunities for agronomy. **Plant and Soil**, v. 362, n. 1–2, p. 389–417, 2013.

IBRAHIM, I. *et al.* Kinetics and mechanism of the redox reaction of N,N'-phenylenebis-(salicylideneiminato)iron(III) with oxalic acid in mixed aqueous medium. **Transition Metal Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 269–273, 2019.

INDA JUNIOR, A. V. *et al.* Cinética da dissolução redutiva da goethita e hematita em solos poligenéticos. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 553–561, 2005.

IVANOVA, R.; BOJINOVA, D.; NEDIALKOVA, K. Rock Phosphate Solubilization By Soil Bacteria. **Chemical Technology**, p. 297–302, 2006.

JACOBY, R. *et al.* The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition—current knowledge and future directions. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. September, p. 1–19, 2017.

JAISWAL, A. *et al.* Synthesis, characterization, and application of goethite mineral as an adsorbent. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 1, n. 3, p. 281–289, 2013.

JEMAL, M. Thermochemistry and Kinetics of the Reactions of Apatite Phosphates with Acid Solutions (II). In: VALDEZ, ICHAEL S. W. AND B. (Ed.). . **Phosphoric Acid Industry - Problems and Solutions**. 1. ed. United Kingdom: Intechopen, 2017. v. 1p. 38.

JOHNSON, S. E.; LOEPPERT, R. H. Role of Organic Acids in Phosphate Mobilization from Iron Oxide. **Soil Science Society of America Journal**, v. 70, n. 1, p. 222–234, 2006.

JONES, D. L. *et al.* Organic acid behavior in soils - Misconceptions and knowledge gaps. **Plant and Soil**, v. 248, n. 1–2, p. 31–41, 2003.

JONES, D. L. Organic acids in the rhizosphere - a critical review. **Plant and soil**, v. 205, n. 1, p. 25–44, 2016.

KANNAHI, M.; SENBAGAM, N. Studies on siderophore production by microbial isolates obtained from rhizosphere soil and its antibacterial activity. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 4, p. 1142–1145, 2014.

KAMPRATH, E.J.; WATSON, M.E. Conventional soil and tissue tests for assessing the phosphorus status of soils. In: KHASAWNEH, F.E.; SAMPLES, E.C.;

KAMPRATH, E.J. (Coords.). **The role of phosphorus in agriculture**. Madison: American Society of Agronomy, 1980. p.433-469

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; MUSARRAT, J. **Phosphate solubilizing microorganisms: Principles and application of microphos technology**. [s.l: s.n.].

KIM, J. H. *et al.* Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 62, n. 4, p. 600–612, 2002.

KIM, K. *et al.* Effects of organic acids as reducing agents in the synthesis of LiFePO₄. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 504, n. 1, p. 166–170, 2010.

KRAEMER, S. M. Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. **Aquatic Sciences**, v. 66, n. 1, p. 3–18, 2004.

KREWULAK, K. D.; VOGEL, H. J. Structural biology of bacterial iron uptake. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1778, n. 9, p. 1781–1804, 2008.

KRUMINA, L. *et al.* Desorption mechanisms of phosphate from ferrihydrite and goethite surfaces. **Chemical Geology**, v. 427, p. 54–64, 2016.

LARSEN, O.; POSTMA, D.; JAKOBSEN, R. The reactivity of iron oxides towards reductive dissolution with ascorbic acid in a shallow sandy aquifer (Rømø, Denmark). **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 70, n. 19, p. 4827–4835, 2006.

LAZO, D. E.; DYER, L. G.; ALORRO, R. D. Silicate, phosphate and carbonate mineral dissolution behaviour in the presence of organic acids: A review. **Minerals Engineering**, v. 100, p. 115–123, 2017.

LATATI, M.; AOUICHE, A.; TELLAH, S.; LARIBI, A.; BENLAHRECH, S.; KACI, G.; OUAREM, F.; OUNANE, S.M. Intercropping maize and common bean enhances microbial carbon and nitrogen availability in low phosphorus soil under Mediterranean conditions. **European Journal of Soil Biology**, v. 80, p.9-18,2017.

LEMANOWICZ, J. Dynamics of phosphorus content and the activity of phosphatase in forest soil in the sustained nitrogen compounds emissions zone. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 33, p. 33773–33782, 2018.

LESLIE, A. D.; DANESHFAR, R.; VOLMER, D. A. Infrared Multiphoton Dissociation of the Siderophore Enterobactin and its Fe(III) Complex. Influence of Fe(III) Binding on Dissociation Kinetics and Relative Energetics. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 18, n. 4, p. 632–641, 2007.

LI, G. X. et al. Characteristics of Organic Acid Secretion Associated with the Interaction between Burkholderia multivorans WS-FJ9 and Poplar Root System. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

LIERMANN, L. J. et al. Role of bacterial siderophores in dissolution of hornblende. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 64, n. 4, p. 587–602, 2000.

LINDSAY, W.L. Phosphates and Sulfur. 168, 281. In: **Chemical Equilibria in Soils**. A Wiley-Interscience publication, 1979.

LIU, H. et al. The effect of hydroxyl groups and surface area of hematite derived from annealing goethite for phosphate removal. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 398, p. 88–94, 2013.

LIU, H.; CHEN, T.; FROST, R. L. An overview of the role of goethite surfaces in the environment. **Chemosphere**, v. 103, p. 1–11, 2014.

LOPEZ-ARREDONDO, A.E.; LEYVA-GONZALEZ, M.A.; GONZALEZ-MORALES, S.I.; LOPEZ-BUCIO, J. Phosphate Nutrition: Improving Low-Phosphate Tolerance in Crops. **Ann Rev Plant Biol**, v. 65, p. 95–123, 2014.

MCLAUCHLAN, K. The nature and longevity of agricultural impacts on soil carbon and nutrients: A review. **Ecosystems**, v. 9, n. 8, p. 1364–1382, 2006.

MIKUTTA, C.; KRETZSCHMAR, R. Synthetic coprecipitates of exopolysaccharides and ferrihydrite. Part II: Siderophore-promoted dissolution. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 72, n. 4, p. 1128–1142, 2008.

MILTON, J. A. et al. Hydroxamate Siderophores: Occurrence and Importance in the Atlantic Ocean. v. 42, n. 23, p. 8675–8680, 2008.

NAYAK, A. K. Hydroxyapatite synthesis methodologies: An overview. **International Journal of ChemTech Research**, v. 2, n. 2, p. 903–907, 2010.

NEZAT, C. A. *et al.* Mineral Sources of Calcium and Phosphorus in Soils of the Northeastern United States. **Soil Science Society of America Journal**, v. 72, n. 6, p. 1786–1794, 2008.

OBERSON, A.; JONER, E.O. Microbial Turnover of Phosphorus in Soil, Chapter 7. In: **Organic phosphorus in the environment. Organic phosphorus in the environment**. 1^a ed. Australia: CABI publishing, 2005.

OKTYABRSKII, O. N.; SMIRNOVA, G. V. Redox potential changes in bacterial cultures under stress conditions. **Microbiology**, v. 81, n. 2, p. 131–142, 2012.

OTERO-FARIÑA, A. *et al.* Effects of natural organic matter on the binding of arsenate and copper onto goethite. **Chemical Geology**, v. 459, n. February, p. 119–128, 2017.

PARIKH, S. J.; MUKOME, F. N. D.; ZHANG, X. ATR-FTIR spectroscopic evidence for biomolecular phosphorus and carboxyl groups facilitating bacterial adhesion to iron oxides. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 119, p. 38–46, 2014.

PARFITT, R. L. Infrared study of phosphate adsorption on goethite. **Journal of the Chemical Society Faraday Transactions 1**, v. 70, n. January 2019.

PASTORE, G. *et al.* Microbial release of apatite- and goethite-bound phosphate in acidic forest soils. **Geoderma**, v. 370, n. March, p. 114360, 2020.

PENN, C. J.; CAMBERATO, J. J. A critical review on soil chemical processes that control how soil pH affects phosphorus availability to plants. **Agriculture (Switzerland)**, v. 9, n. 6, p. 1–18, 2019

PERET, B.; DESNOS, T.; JOST, R.; KANNO, S.; BERKOWITZ, O.; NUSSAUME, L. Root architecture responses: in search of phosphate. **Plant Physiol.**, v.166, p.1713-1723, 2014.

PHAM MINH, D. *et al.* Synthesis of calcium hydroxyapatite from calcium carbonate and different orthophosphate sources: A comparative study. **Materials Science and**

Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology, v. 177, n. 13, p. 1080–1089, 2012.

PIASECKI, W.; SZYMANEK, K.; CHARMAS, R. Fe 2+ adsorption on iron oxide: the importance of the redox potential of the adsorption system. **Adsorption**, v. 25, n. 3, p. 613–619, 2019.

PII, Y. *et al.* Plant-microorganism-soil interactions influence the Fe availability in the rhizosphere of cucumber plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 87, n. 1, p. 45–52, 2015.

POSNER, A. M.; NUTRITION, P. Desorption of phosphate from goethite. n. 1977, p. 697–707, 1979.

PRIYADHARSINI, P.; MUTHUKUMAR, T. The root endophytic fungus *Curvularia geniculata* from *Parthenium hysterophorus* roots improves plant growth through phosphate solubilization and phytohormone production. **Fungal Ecology**, v. 27, p.69-77, 2017.

RAMOS, M. E. *et al.* Effect of lactate, glycine, and citrate on the kinetics of montmorillonite dissolution. **American Mineralogist**, v. 96, n. 5–6, p. 768–780, 2011.

RASUL, M. *et al.* Phosphate solubilizers as antagonists for bacterial leaf blight with improved rice growth in phosphorus deficit soil. **Biological Control**, v. 136, n. May, p. 103997, 2019.

REHMAN, I.; BONFIELD, W. Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1–4, 1997.

REICHARD, P. U.; KRETZSCHMAR, R.; KRAEMER, S. M. Dissolution mechanisms of goethite in the presence of siderophores and organic acids. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 71, n. 23, p. 5635–5650, 2007.

RENELLA, G.; LANDI, L.; NANNIPIERI, P. Degradation of low molecular weight organic acids complexed with heavy metals in soil. **Geoderma**, v. 122, n. 2- 4 SPEC. IIS., p. 311–315, 2004.

RITA, J. C. O. *et al.* Mineralization of organic phosphorus in soil size fractions under different vegetation covers in the north of Rio de Janeiro | Mineralização das frações

orgânicas de fósforo em classes de agregados do solo, sob diferentes coberturas vegetais do norte flum. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 37, n. 5, p. 1207–1215, 2013.

RUAN, H. D.; FROST, R. L.; KLOPROGGE, J. T.; DUONG, L. Infrared spectroscopy of goethite dehydroxylation : III . FT-IR microscopy of in situ study of the thermal transformation of goethite to hematite. **Spectrochimica Acta Par**, v. 58, p. 967–981, 2002.

SABATÉ, D. C. et al. Decrease in the incidence of charcoal root rot in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Bacillus amyloliquefaciens* B14, a strain with PGPR properties. **Biological Control**, v. 113, p. 1–8, 2017.

SADEGHALVAD, B. et al. Sorption, mechanism, and behavior of sulfate on various adsorbents: A critical review. **Chemosphere**, v. 263, 2021.

SCHAETZL, R.; ANDERSON, S. *Soils. Genesis and Geomorphology*. Cambridge University Press, New York, 818 p., 2005

SCHLESINGER, W. H.; BERNHARDT, E. S. *The Lithosphere*. **Biogeochemistry**, n. x, p. 93–133, 2013.

SCHMITT, D. E. et al. Formation of ternary organic acids-Fe-P complexes on the growth of wheat (*Triticum aestivum*). **Revista Brasileira de Engenharia Agricola e Ambiental**, v. 22, n. 10, p. 702–706, 2018.

SCHWERTMANN, U. Solubility and dissolution of iron oxides. **Plant and Soil**, v. 130, n. 1–2, p. 1–25, 1991.

SCHWERTMANN, U.; MURAD, E. Effect of pH on the formation of goethite and time. **Clay and Clay mineralogy**. v. 31, n. 4, p. 277–284, 1983.

SHAFIGH, M.; HAMIDPOUR, M.; FURRER, G. Zinc release from Zn-Mg-Fe(III)-LDH intercalated with nitrate, phosphate and carbonate: The effects of low molecular weight organic acids. **Applied Clay Science**, v. 170, n. August 2018, p. 135–142, 2019.

SHARMA, K.; GARG, V. K. **Solid-State Fermentation for Vermicomposting**. [s.l.] Elsevier B.V., 2018.

SHEN, Y. et al. Low-molecular organic acids in the rhizosphere soil solution of beech forest (*Fagus sylvatica* L.) Cambisols determined by ion chromatography using supported liquid membrane enrichment technique. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, n. 9, p. 1163–1169, 1996.

SØNDERGAARD, M. **Redox Potential**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2009. v. 12
SPOHN, M.; KUZUYAKOV, Y. Phosphorus mineralization can be driven by microbial need for carbon. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 61, p. 69–75, 2013.

STUMM, W.; FURRER, G. The dissolution of oxides and aluminum silicates, examples of surface -coordination-Controlled kinetics. In: **Aquatic Surface chemistry**. 1. ed. New York: Wiley & Sons, 2000. p. 230.

TADANIER, C. J.; EICK, M. J. Formulating the Charge-distribution Multisite Surface Complexation Model Using FITEQL. **Soil Science Society of America Journal**, v. 66, n. 5, p. 1505, 2002.

TORRENT, J; BARRON, V; SCHWERTMANN, U. Phosphate adsorption and desorption by goethites differing in crystal morphology. **Soil Science**, v. 54, p. 1007–1012, 1990.

TURNER, B.L.; CONDRON, L.M.; RICHARDSON, S.J.; PELTZER, D.A.; ALLISON, V.J. Soil organic phosphorus transformations during pedogenesis. **Ecosystems**, v.10, p.1166-118, 2007.

TURNER, B.L.; LALIBERTE, E. Soil development and nutrient availability along a 2 million-year coastal dune chronosequence in Southwestern Australia. **Ecosystems**, v.18, p.287-309, 2015.

VALSAMI-JONES, E. *et al.* The dissolution of apatite in the presence of aqueous metal cations at pH 2-7. **Chemical Geology**, v. 151, n. 1–4, p. 215–233, 1998.

VAN HEES, P. A. W. *et al.* Low molecular weight organic acid adsorption in forest soils: Effects on soil solution concentrations and biodegradation rates. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, n. 8, p. 1015–1026, 2003.

VARANDA, L. C. *et al.* Monodispersed spindle-type goethite nanoparticles from FeIII solutions Monodispersed spindle-type goethite nanoparticles from Fe III solutions. n. November, 2002.

VILLACÍS-GARCÍA, M. *et al.* Laboratory synthesis of goethite and ferrihydrite of controlled particle sizes. n. iii, 2015.

VILLALOBOS, M.; TROTZ, M. A.; LECKIE, J. O. Variability in goethite surface site density : evidence from proton and carbonate sorption. v. 268, p. 273–287, 2003.

WANG, D. *et al.* Effects of low-molecular-weight organic acids on the dissolution of hydroxyapatite nanoparticles. **Environmental Science: Nano**, v. 3, n. 4, p. 768–779, 2016a.

WANG, D. *et al.* Effects of low-molecular-weight organic acids on the dissolution of hydroxyapatite nanoparticles. **Environmental Science: Nano**, v. 3, n. 4, p. 768–779, 2016c.

WANG, Z. *et al.* Ligand-Promoted Photoreductive Dissolution of Goethite by Atmospheric Low-Molecular Dicarboxylates. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 121, n. 8, p. 1647–1656, 2017.

WEI, S. Y. *et al.* Surface properties and phosphate adsorption of binary systems containing goethite and kaolinite. **Geoderma**, v. 213, p. 478–484, 2014.

WEI, W. *et al.* Interaction between low molecular weight organic acids and hydroxyapatite with different degrees of crystallinity. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 392, n. 1, p. 67–75, 2011.

WEI, Y. *et al.* Effect of organic acids production and bacterial community on the possible mechanism of phosphorus solubilization during composting with enriched phosphate-solubilizing bacteria inoculation. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 190–199, 2018.

XU, C. *et al.* Immobilization of heavy metals in vegetable-growing soils using nano zero-valent iron modified attapulgite clay. **Science of the Total Environment**, v. 686, p. 476–483, 10 out. 2019.

YAN, L. G. *et al.* Adsorption of phosphate from aqueous solution by hydroxy-aluminum, hydroxy-iron and hydroxy-iron-aluminum pillared bentonites. **Journal of Hazardous Materials**, v. 179, n. 1–3, p. 244–250, 2010.

YAN, Z. *et al.* Effect of different *Bacillus* strains on the profile of organic acids in a liquid culture of Daqu. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 119, n. 1–2, p. 78–83, 2013.

ZAPATA-HERNÁNDEZ, R. **Química De Los Procesos Pedogeneticos**. 1. ed. Medellín: UNAL-Medellin, 2002.

ZHANG, H.; LI, S.; YAN, Y. Dissolution behavior of hydroxyapatite powder in hydrothermal solution. **Ceramics International**, v. 27, n. 4, p. 451–454, 2001.

ZHANG, X. *et al.* Goethite dispersed corn straw-derived biochar for phosphate recovery from synthetic urine and its potential as a slow-release fertilizer. **Chemosphere**, v. 262, p. 127861, 2020.

ZHANG, B. *et al.* Phosphorus mediates soil prokaryote distribution pattern along a small-scale elevation gradient in Noijin Kangsang Peak, Tibetan Plateau. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 95, n. 6, p. 1–12, 2019.

ZHAO, X. *et al.* Elucidating the sources of activity and stability of Fe-P electrocatalyst for hydrogen evolution reactions in acidic and alkaline media. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 260, n. August 2019, p. 118156, 2020.

ZHONG, B. *et al.* Proton interaction in phosphate adsorption onto goethite. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 308, n. 1, p. 40–48, 2007.

3 CAPÍTULO 2: DISSOLUÇÃO DA HIDROXIAPATITA E LIBERAÇÃO DE P ESTRUTURAL POR MECANISMOS MICROBIOLÓGICOS

3.1 RESUMO

Uma importante forma para aumentar a adubação fosfatada na agricultura compreende a aplicação de fontes menos solúveis de P, principalmente para culturas perenes. A fim de elucidar os mecanismos biológicos de dissolução da hidroxiapatita (HPA), o presente trabalho tem o objetivo geral de verificar o efeito da atividade de microrganismos sobre a liberação do P da estrutura da hidroxiapatita, principalmente por meio de acidificação do meio e a produção de sideróforos durante o crescimento microbiano. No experimento, a solubilização do P por *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.*, *Pseudozyma crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli* foram avaliados através do índice de solubilização (IS) durante o crescimento em meio sólido e cultivadas em meio líquido sob os seguintes tratamentos: controle (sem P), com KH_2PO_4 e com HPA em três doses. Também foram conduzidos experimentos isolados para estudar a ação de sideróforos e ácidos orgânicos comumente exsudados pelos microrganismos na solubilização da HPA. A matriz da amostra de hidroxiapatita (HPA) apresenta partículas com tamanho inferior à 0,002 mm (tamanho médio nas frações argila fina e média). Assim como foram identificadas partículas mais grosseiras (>0,002). O maior crescimento dos microrganismos na fonte solúvel de P (KH_2PO_4) resultou em menor concentração de P na solução, devido à imobilização na biomassa microbiana. Houve expressiva ação dos microrganismos em solubilizar a HPA e liberar o P estrutural. Esse efeito foi mais pronunciado na maior dose de HPA. O tempo de incubação foi importante para aumentar a dissolução da HPA. O principal mecanismo associado à dissolução da HPA foi a acidificação do meio líquido pelos microrganismos, no qual o *B. subtilis* apresentou maior eficiência de solubilização da HPA. Por sua vez a ação dos microrganismos foi limitada em meio sólido. Não houve relação entre a quantidade de sideróforos produzidos e a solubilização da HPA. Individualmente, o ácido fumárico foi o mais eficiente na dissolução da HPA. Por outro lado, os piores resultados foram para os ácidos oxálicos e lático. Verificou-se efeito sinérgico da mistura dos ácidos na solubilização da HPA. A eficiência dos ácidos orgânicos na solubilização da HPA reduz com o tempo de incubação.

Palavras - Chave: *Pseudozyma crassa* 1. Hidroxiapatita 2. Sideróforos 3. Mineralogia
4. *Bacillus subtilis*

3.2 ABSTRACT

An important alternative of phosphate fertilizer in agriculture is the application of less soluble sources of P, mainly for perennial crops. In order to elucidate the biological mechanisms for dissolving hydroxyapatite (HPA), the present work aimed to verify the effect of microorganisms activity on P release from hydroxyapatite structure, by the medium culture acidification and the production of siderophores during microbial growth. In the experiment, the solubilization of P by *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.*, *P. crassa*, *S. cerevisiae* and *E. coli* were evaluated using the solubilization index (IS) during their growth in solid and in liquid medium under the following treatments: Control (without any P source) KH_2PO_4 and HPA in three different doses. Were also carried out isolated experiments to study the role of siderophores and organic acids commonly released by microorganisms during HPA solubilization.

Hydroxyapatite sample matrix (HPA) usually has small particles (<0,002 mm). However, coarser particles (>0,002 mm) were also identified. The higher growth of microorganisms in the soluble source of P (KH_2PO_4) resulted in a lower P-concentration in the solution. There was a significant action of microorganisms in solubilizing HPA and releasing structural P. This effect was more pronounced at the highest dose of HPA. The incubation time of the microorganisms was important to increase the dissolution of the HPA. The main mechanism associated with the dissolution of HPA was the acidification of the medium by microorganisms, where *B. subtilis* showed higher HPA solubilization efficiency. Microorganisms role was limited in the solid medium. There was no relationship between the amount of siderophores produced and the solubilization of HPA. Individually, fumaric acid was the most efficient acid to promote HPA dissolution. However, oxalic and lactic acids showed less efficiency to promote HPA dissolution. Was possible to verify an synergic effect of organic acids mix in HPA solubilization. Organic acids efficiency on HPA decreased over the time of incubation.

Keywords: *Pseudozyma crassa* 1. Hydroxyapatite 2. Microbiological mechanisms 3. Siderophore. *Bacillus subtilis* 4.

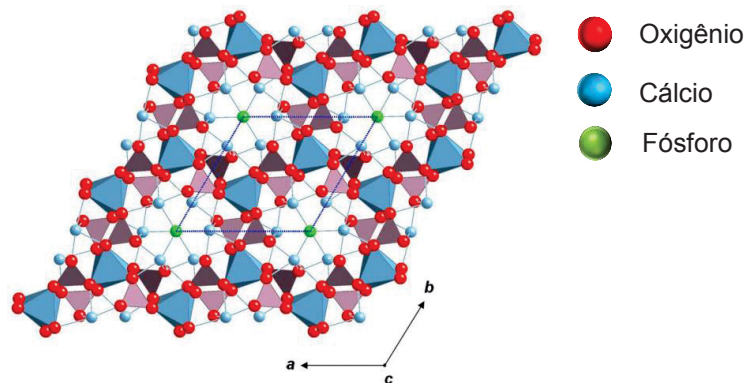
3.1 INTRODUÇÃO

A baixa disponibilidade de fósforo (P) em solos calcáreos frequentemente limita a produção agrícola, uma vez que o P, sob condições alcalinas, tende a reagir com o cálcio, formando precipitados de Ca-P (BOUDIA et al., 2018)

Além disso, condições alcalinas são menos favoráveis para a dissolução de minerais como as apatitas (BENSALAH et al., 2020; BOUDIA et al., 2018). O P obtido para a produção de fertilizantes minerais provem principalmente da mineração de rochas fosfatadas (LU; TIAN, 2017; SCHRODER et al., 2010)

Dentre os minerais fosfatados, a hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) é considerada uma das formas menos solúveis em pH neutro (ADCOCK et al., 2013; FILIPPELLI, 2002). Na superfície da hidroxiapatita (HPA) (Figura 1), a formação de carga ocorre através da protonação, desprotonação, sob condições abaixo ou acima do pH_{PCZ} 7,13-8,15, respectivamente, dos sítios de carga [Ca–OH], e quando expostos, os sítios [P–O] (BENSALAH et al., 2020; BISWAS et al., 2020; HARDING; RASHID; HING, 2005).

FIGURA 1- ESTRUTURA DA HIDROXIAPATITA



Fonte: Adaptado de Wang, 2015.

A aplicação *in natura* de apatitas ao solo para se ter liberação lenta de P para as plantas tem sido adotada para diferentes culturas. Nesses casos, essa liberação lenta de P é dependente de condições de acidez, remoção do P da solução do solo e ação de microrganismos. Microrganismos solubilizadores de apatita podem ser comumente encontrados nos solos e sedimentos, especialmente na rizosfera das plantas (SVERDRUP, 2009).

Estudos relacionados a solubilidade da HPA ainda são muito controversos (BENSALAH et al., 2020; DOROZHKIN, 2012). Alguns estudos propõe que a cinética de dissolução da hidroxiapatita pode ser controlada por reações que ocorrem a nível de superfície em sítios de carga no mineral (BENSALLA et al., 2019; BERTAZZO, BERTRAN, 2006; BERTRAN et al., 2006; BERTRAN, 2010; BISWAS et al., 2020; DOROZHKIN, 2012; GRAY et al., 1962; LA MER, 1962; MAFE et al., 1992; ROOTARE et al., 1962; THOMANN et al., 1993), sendo a taxa geral de dissolução controlada pela readsorção dos íons Ca^{2+} em sua superfície (BERTAZZO et al., 2010; CHAÏRAT et al., 2007; KAUFMAN, KLEINBERG, 1979; LARSEN, JENSEN, 1989; NEUMAN, BAREHAM, 1975).

Outros estudos apontam que a cinética de dissolução pode não apenas ser afetada pela readsorção de íons, mas também em virtude da estequiometria e a cristalinidade do mineral (BOUDIA et al., 2017; BERTAZZO et al., 2010). Pode ocorrer aumento na taxa de dissolução em decorrência da presença de aminoácidos, proteínas, enzimas e ácidos orgânicos, como ácido lático, oxálico ou glucônico no meio (MARGOLIS, MORENO, 1992; WANG et al., 2016).

A dissolução das apatitas requer uma fonte de prótons, a qual, pode ser proveniente das raízes ou da atividade dos microrganismos (MEYER et al., 2019). Contudo, ainda não há uma compreensão sobre qual dos mecanismos microbiológicos podem, especificamente, contribuir com o aporte de prótons e dissolução de minerais fosfatados, como a hidroxiapatita.

Além disso, existem diferenças na capacidade e no potencial de solubilização pelos microrganismos, quando submetidos a diferentes fontes de P (Ca-P, Al-P e Fe-P), sendo essa diferença pouco explicada pela literatura (BILLAH et al., 2019; FILHO; VIDOR, 2000).

Várias hipóteses são estudadas sobre a solubilização biológica do P no solo, dentre elas estão a produção de ácidos orgânicos, acidificação do meio, produção de sideróforos e geração de potencial elétrico, através da extrusão de prótons (ALORI; GLICK; BABALOLA, 2017; BARROSO; NAHAS, 2008; BILLAH et al., 2019; IVANOVA; BOJINOVA; NEDIALKOVA, 2006; WEI et al., 2011)

A fim de elucidar os mecanismos biológicos de dissolução da hidroxiapatita, o presente trabalho tem por objetivo geral verificar o efeito da atividade dos microrganismos solubilizadores de fosfato sobre a liberação do P da estrutura da

hidroxiapatita, principalmente avaliando a acidificação do meio e a produção de sideróforos durante o crescimento microbiano.

As seguintes hipóteses foram estudadas através do presente experimento:

- (1) A produção de ácidos orgânicos pelos microrganismos acidifica o meio e contribui para a liberação do P estrutural da hidroxiapatita;
- (2) A produção de sideróforos pelos microrganismos tem relação direta com a liberação de P para a solução em minerais Ca-P;
- (3) A dissolução do mineral possui relação direta com a concentração e tipo do ácido orgânico na solução.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Caracterização da amostra de hidroxiapatita (hpa)

3.2.1.1 Difração por raios X (DRX)

A amostra pura de HPA (Sigma-Aldrich - PA) foi peneirada em 0,2 mm de malha e analisadas por DRX pelo método do pó (amostra colocada em um *spinner*). Os difratogramas foram obtidos em aparelho da marca PAN Analytical, modelo X'pert3 Powder, dotado de Detector Xcelerator Scientific e com fonte de radiação de Cu K α numa amplitude de 4 a 70 °2 Θ , operando a 40mA e 40kV. O amostrador utilizado foi o Spinner e o software de leitura e tratamento de dados o XRD Data Collection Software e High Score Plus (PAN Analytical).

Para análise do DRX foi utilizado o padrão do ICCD (International Centre for Diffraction Data) para Hidroxiapatita nº 09-432 com presença de CaO ICCD nº 37-1497.

3.2.1.2 Determinação do teor total de P

O teor total de P foi determinada pela digestão da HPA pelo método EPA 3052 (USEPA, 1996). Pesou-se 0,3000 g de HPA em tubo de teflon com 2 mL de HF e 9 mL de HNO $_3$ concentrados. Os tubos foram selados e mantidos em forno de microondas (Mars Xpress 6, CEM) por 5,5 min para aumentar a temperatura para 180°C, atingindo uma pressão máxima de 16 atm por 4,5 min de digestão com temperatura e pressão constantes. Para comprovação da ausência de formas solúveis de P, cerca de 2,0000 g de amostra de HPA foram homogeneizadas com 20 mL de água ultrapura. Após 2 h de agitação a suspensão foi filtrada.

Os teores solúveis e totais de P foram determinados por espectrometria de emissão atômica por plasma indutivamente acoplado (ICP- OES). O teor total médio de P da HPA (206,2 g kg $^{-1}$) foi usado para definir os tratamentos do experimento de inoculação de microrganismos.

As análises químicas mostraram que a hidroxiapatita possui, em média, o teor de P total de 206,2 g kg $^{-1}$. Os teores de P solúvel em água ficaram abaixo do limite de detecção do aparelho (0,009 mg L $^{-1}$).

3.2.1.3 Microscopia eletrônica de varredura acoplada com espectroscopia por energia dispersiva (MEV-EDS)

A amostra de HPA foi estudada em microscópio eletrônico de varredura (MEV) modelo Tescan Vega 3 (Schaumburg, Illinois, USA) com detector de raios X por dispersão de energia (EDS). As análises elementares foram realizadas por equipamento Oxford X-Max50 com detector de raios X de silício com precisão de até 1%. O aparelho foi operado com energia de 15 kV e distância de trabalho de 15 mm.

3.2.1.4 Espectroscopia de Infravermelho

As análises por infravermelho foram realizadas no espectrômetro VERTEX 70 (Bremen, Alemanha). O espectro foi obtido por refletância difusa de 4000 a 400 cm^{-1} (região do infravermelho médio), com resolução de 4 cm^{-1} . Os dados espectrais foram registrados em modo de refletância (R).

3.3 Experimentos microbiológicos para solubilização do P

Foram utilizadas as estirpes *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.*, *Saccharomyces sp.*, cedida pela empresa Total Biotecnologia; *Pseudozyma crassa* -IPR 6034, , adquiridas do Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR e *Escherichia coli* -ATCC 8739, adquirida da coleção do Laboratório de Microbiologia, da UFPR, campus Jardim Botânico.

Os microrganismos foram semeados em meio sólido para manutenção das colônias, crescidas por 24 h em B.O.D a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e mantidos armazenados a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ para os experimentos. Os meios utilizados foram escolhidos de acordo com as necessidades metabólicas de cada estirpe e para manter a viabilidade das colônias.

3.3.1 Inóculos

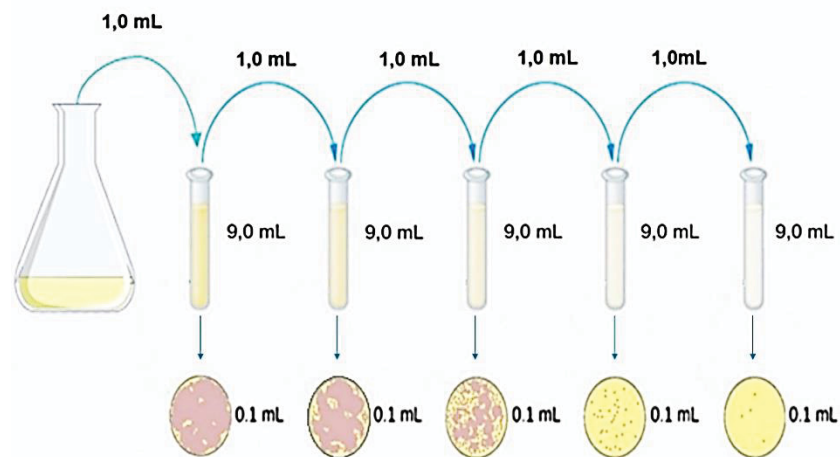
Para a inoculação dos microrganismos nos tratamentos foi preparada uma suspensão bacteriana de cada estirpe e realizada a diluição seriada para determinar a concentração dos inóculos.

Todos os microrganismos foram crescidos em meio sólido com a seguinte composição: 10 g de glicose, 15 g de ágar batata dextrose (BDA), 2 g de extrato de levedura, 2 mL de solução de micronutrientes (Tabela 3), 2 mL de solução de macronutrientes (Tabela 4), com o volume final ajustado para 1000 mL em balão volumétrico com água ultrapura (Sistema Milli-Q, $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ a 25°C). Os microrganismos foram levados a B.O.D por 24 e 48 h à $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

pós o crescimento das colônias de cada microrganismo foram dispostos 3 mL de NaCl 0,85% em cada placa, e com auxílio de uma alça de drigalski, foi realizado o espalhamento da suspensão a fim de liberar as colônias do meio sólido. O material de cada placa foi transferido com auxílio de uma micropipeta para seu respectivo frasco e homogeneizado.

Para a diluição seriada, uma alíquota de 1 mL foi retirada de cada frasco contendo a suspensão bacteriana e transferida para tubos de ensaio com 9 mL de NaCl 0,85% e diluído em série ($10^0 - 10^{10}$). De cada uma das diluições foi retirada uma alíquota de 0,1 mL e transferida para uma placa de petri contendo o meio extrato de levedura e ágar dextrose (BDA) e feito o espalhamento com auxílio de alça de drigalski para contagem das UFCs (Unidades Formadoras de Colônias) (Figura 2).

FIGURA 2- ESQUEMA DA DILUIÇÃO DECIMAL SERIADA REALIZADA NO EXPERIMENTO



Fonte: A autora (2021)

Paralelamente à diluição seriada, realizou-se a leitura de cada diluição em espectrofotômetro a 550 nm. A concentração dos inóculos de cada microrganismo foi então definida para utilização nos tratamentos (Tabela 1).

TABELA 1- UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFCs) PARA CADA MICRORGANISMO OBTIDOS ATRAVÉS DA DILUIÇÃO SERIADA

Diluição	<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Bacillus sp</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. cerevisiae</i>		<i>P. crassa</i>	
	UFC mL ⁻¹		UFC mL ⁻¹		UFC mL ⁻¹		UFC mL ⁻¹		UFC mL ⁻¹	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
0*	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10 ¹	46x10 ²	103 x 10 ²	68,9x10 ²	93,5x10 ²	48,8x10 ²	125 x 10 ²	47,8x10 ²	105 x 10 ²	39,7x10 ²	46,8 x 10 ²
10 ²	27,7x10 ³	71,9x10 ³	38,2x10 ³	48,1x10 ³	28,1x10 ³	82,5x10 ³	29,3x10 ³	73,3x10 ³	13,9x10 ³	21,2x10 ³
10 ³	13,4 x 10 ⁴	49,7x10 ⁴	10,8x10 ⁴	19,5x10 ⁴	16,8 x 10 ⁴	50,1x10 ⁴	15,7 x 10 ⁴	51,2x10 ⁴	7,2 x 10 ⁴	9,7x10 ⁴
10 ⁴	4,2 x 10 ⁵	7,6 x10 ⁵	5,2x10 ⁵	9,3x10 ⁵	6,8 x 10 ⁵	9,0 x10 ⁵	5,1 x 10 ⁵	7,8 x10 ⁵	3,1 x 10 ⁵	4,3 x10 ⁵
10 ⁵	2x10 ⁶	2,3x10 ⁶	2,8x10 ⁶	4,7x10 ⁶	3,4x10 ⁶	4,9x10 ⁶	2,4x10 ⁶	3,1x10 ⁶	1x10 ⁶	1,8x10 ⁶
10 ⁶	0,5 x 10 ⁷	0,9 x 10 ⁷	0,2x10 ⁷	1,8x10 ⁷	1,4 x 10 ⁷	1,9 x 10 ⁷	0,8 x 10 ⁷	1,3 x 10 ⁷	0,1 x 10 ⁷	0,4 x 10 ⁷
10 ⁷	0,1x10 ⁸	0,4x 10 ⁸	0	0,5x10 ⁸	0,4x10 ⁸	0,8 x 10 ⁸	0,4x10 ⁸	0,6x 10 ⁸	0	0
10 ⁸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ¹⁰	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* nd – não determinado. Para esta diluição o número de colônias foi muito expressivo > 1000 UFCs e por isso não foram contadas.
 FONTE: A autora (2021)

Determinou-se então a diluição o tempo de crescimento para todos os microrganismos a serem inoculados nos tratamentos. Para o tempo de crescimento de 24 h: *S. cerevisiae*: D.O._{0.5} = $0,4 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ e *E. coli*: D.O._{0.5} = $0,4 \times 10^8$ UFC mL⁻¹; e para o tempo de 48 h de crescimento: *P. crassa*: D.O._{0.5} $0,4 \times 10^7$ UFC mL⁻¹; *Bacillus* sp: D.O._{0.3} = $0,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ e *Bacillus subtilis* D.O._{0.3}: $0,4 \times 10^8$ UFC mL⁻¹.

3.3.2 Análise da eficiência dos microrganismos para solubilização e dissolução de diferentes fontes de P em meio líquido

A fim de definir as massas para os tratamentos, inicialmente foi estabelecida as relações de P presentes no meio de cultura proposto por Sylvester, Bradley (1982), o qual originalmente, possui como fonte solúvel de P o KH₂PO₄.

Os microrganismos foram avaliados quanto à sua eficiência em dissolver fontes minerais (hidroxiapatita) e solubilizar Ca-P de fontes mais solúveis, como o Ca(H₂PO₄)₂.H₂O), formado a partir da reação entre o KH₂PO₄ e Ca presente na solução de nutrientes do meio de cultura.

Para obtenção de células viáveis para o experimento, os microrganismos foram crescidos nos tempos de 24 h (*S. cerevisiae* e *E. coli*) e 48 h (*P. crassa*, *Bacillus* sp. e *Bacillus subtilis*) em meio líquido sem nenhuma fonte de P (Tabelas 2-4) a 30±1°C em shaker a 140 rpm. Foram realizadas mensurações por espectrofotometria (550 nm) durante o crescimento a fim de se obter as seguintes concentrações celulares: *S. cerevisiae*: D.O._{0.5} = $0,4 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ e *E. coli*: D.O._{0.5} = $0,4 \times 10^8$ UFC mL⁻¹; e para o tempo de 48 h de crescimento: *P. crassa*: D.O._{0.5} $0,4 \times 10^7$ UFC mL⁻¹; *Bacillus* sp: O.D_{0.3} = $0,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ e *Bacillus subtilis* D.O._{0.3}: $0,4 \times 10^8$ UFC mL⁻¹.

Foram realizadas diluições, com NaCl 0,85%, para os microrganismos que apresentaram D.O superiores às indicadas, até que se obtivesse a concentração celular desejada.

Após obtenção das concentrações celulares, 1 mL de cada inóculo (*Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp. *Saccharomyces* sp., *Pseudozyma crassa*, *Escherichia coli*) foi transferido para frascos esterilizados de 250 mL, contendo 50 mL do meio de cultura líquido (Tabelas 2-4), previamente autoclavado e mantido à temperatura de 35°C, com suas respectivas fontes de P para os seguintes tratamentos:

0. **Controle positivo:** Meio líquido com adição de KH_2PO_4 como fonte de P e não inoculado;
1. **Controle negativo:** Meio líquido com adição de HPA1 ($0,011 \text{ mg L}^{-1}$) como fonte de P e não inoculado;
2. **Controle negativo:** Meio líquido com adição de HPA7 ($0,077 \text{ mg L}^{-1}$) como fonte de P e não inoculado;
3. **Controle negativo:** Meio líquido com adição de HPA12 ($0,132 \text{ mg L}^{-1}$) como fonte de P e não inoculado;
4. **Controle negativo:** Meio líquido sem adição de fonte de P e inoculado.
5. **Fonte de P-solúvel (KH_2PO_4):** Meio líquido com adição de KH_2PO_4 como fonte de P e inoculado;
6. **Hidroxiapatita (HPA 1):** Meio líquido com adição de HPA 1 ($0,011 \text{ mg L}^{-1}$) como fonte de P e inoculado;
7. **Hidroxiapatita (HPA 7):** Meio líquido com adição de HPA 7 ($0,077 \text{ mg L}^{-1}$) como fonte de P e inoculado;
8. **Hidroxiapatita (HPA 12):** Meio líquido com adição de HPA 12 ($0,132 \text{ mg L}^{-1}$) como fonte de P e inoculado.

Os cálculos para definição das quantidades de HPA nos tratamentos foram os seguintes:

1) Determinação da quantidade de P da fonte solúvel KH_2PO_4

- De acordo com a Tabela 3, primeiro prepara-se solução de KH_2PO_4 a 10%, o que equivale adicionar 10 g do sal em 100 mL de água. Pela relação de peso atômico do P e massa molar do sal ($31/136 = 0,227$), chega-se à quantidade de 2,27 g de P em 100 mL.

- Para preparar a solução de macronutrientes, transferem-se 10 mL da solução anterior em balão de 200 mL (Tabela 3). Com 2,27 g de P em 100 mL (solução anterior), em 10 mL a quantidade de P será 10 vezes menor (0,227 g). Essa quantidade de P (0,227 g) será disposta em balão de 200 mL.

- Para preparar o meio de cultura final (Tabela 2), transferem-se 2 mL da solução anterior em balão de 1000 mL. Se em 200 mL tem-se 0,227 g de P, em 2 mL ter-se-á 22,7 mg de P. Essa quantidade foi transferida para um balão de 1 L.

- Então, nos tratamentos 1 e 5, a quantidade de P na forma solúvel para preparação de 1 L de meio de cultura foi de 22,7 mg.

2) Determinação da quantidade de HPA

- Para verificar a eficiência de solubilização da HPA pelos microrganismos, tomou-se o teor total de P da HPA: 206,2 g kg⁻¹. Com base nesse teor total, calculou-se a quantidade equivalente de HPA para se ter a mesma quantidade de P da fonte solúvel KH₂PO₄ (22,7 mg L⁻¹).
- Tratamento HPA 1. Esse tratamento representa a adição de HPA referente a 1 vez a quantidade de KH₂PO₄ (22,7 mg L⁻¹). Para se ter 22,7 mg P, deve-se adicionar 0,011 g de HPA em 1 L de meio de cultura.
- Como a solubilidade da HPA é inferior ao KH₂PO₄, nos tratamentos HPA 7 e HPA 12 transferiram-se quantidade de P, 7 e 12 vezes superiores à quantidade adicionada com a fonte solúvel: HPA 7 = 0,011 x 7 = 0,077 g; HPA 12 = 0,011 x 12 = 0,132 g.

Para equalizar o efeito de K, como nos tratamentos com HPA não houve a adição de K (sem adição de KH₂PO₄), a quantidade equivalente do nutriente foi adicionada na forma de KCl.

Foram transferidos para os frascos uma alíquota da suspensão bacteriana contendo 100 µg de cada microrganismo, em suas D.Os correspondentes. Os frascos contendo os meios de cultura com os respectivos tratamentos foram fechados com rolhas esterilizadas de algodão e gaze, inoculados com seus respectivos microrganismos e encubados, sob condições aeróbias, a 30± 1°C, em shaker a 220 rpm e avaliados nos tempos de 0, 7 e 15 dias. Cada tratamento teve três repetições. Para demonstrar a reprodutibilidade da técnica, o experimento foi repetido 2 vezes no tempo para cada microrganismo (r= 10). Para mensuração da concentração de P para os tempos avaliados uma alíquota de 5 mL foi retirada dos frascos, centrifugados a 12000 rpm por 10 min, filtrado em filtro Millipore (Sigma-Aldrich - 0,22 µM) a concentração de P avaliada por ICP-OES.

Para o tempo de 0 h, todos os tratamentos, para cada um dos microrganismos, foram imediatamente colocados em recipiente com gelo e submetidos às suas respectivas análises imediatamente após a inoculação.

TABELA 2- COMPOSIÇÃO DO MEIO LÍQUIDO UTILIZADO NOS TRATAMENTOS

REAGENTES	QUANTIDADE (g L ⁻¹ ou mL L ⁻¹)
Água ultra pura*	1000 mL
Glicose	10 g
Extrato de levedura	2 g
Solução de micronutrientes**	2 mL
Solução de macronutrientes**	2 mL

* Volume final ajustado para 1000 mL; **Solução estoque definidas nas Tabelas 3 e 4.

TABELA 2- SOLUÇÃO DE MICRONUTRIENTES

REAGENTES	QUANTIDADE (g 200 mL ⁻¹ ou mL 200 mL ⁻¹)
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,2 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,232 g
H ₃ BO ₃	0,28 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,008g
Fe EDTA (1,64%)	4 mL
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,024 g
H ₂ O ultra pura*	200 mL

* Volume final ajustado para 200 mL

TABELA 3- SOLUÇÃO DE MACRONUTRIENTES

REAGENTES	QUANTIDADE (g 200mL ⁻¹ ou mL 200mL ⁻¹)
MgSO ₄ (10%)	2 mL
CaCl ₂ (1%)	2 mL
KH ₂ PO ₄ solução 10 %	10 mL
NaCl (10%)	1 mL
H ₂ O ultra pura*	200 mL

* Volume final ajustado para 200 mL

Para acompanhar o crescimento microbiano durante o experimento foi recolhida uma alíquota de 100 µL de cada um dos tratamentos a cada 36 h, a qual foi inoculada em placas de petri contendo meio BDA, pelo método de espalhamento com alça de drigalski.

Para acompanhar as variações de pH durante o experimento, o eletrodo foi desinfestado em álcool 70% por 4 h, sob luz UV na câmara de fluxo. O pH foi medido diretamente nos tubos de ensaio nos mesmos tempos de coleta das alíquotas de 100 µL.

Após 15 dias, os meios com os respectivos tratamentos foram retirados do shaker e seu conteúdo centrifugado a 12000 rpm por 10 min e em seguida filtrado em membrana especial (Millipore Sigma-Aldrich - 0,22 µM) para retenção de fase sólida, debris celulares e colônias. Uma alíquota de 5 mL do filtrado foi recolhida e a concentração de P foi avaliada por ICP-OES.

3.3.3 Eficiência dos microrganismos para solubilização e dissolução de diferentes fontes de P em meio sólido

Os microrganismos *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.* *Saccharomyces sp.*, *Pseudozyma crassa*, *Escherichia coli*, também foram avaliados quanto sua eficiência em promover a solubilização de fontes de P em meio NBRIP (*National Botanical*

Research Institute`s Phosphate growth medium) (MEHTA, NAUTIYAI, 2001): 10 g de glicose, 5 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,25 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2 g de KCl, e 0,1 g de $(NH_4)_2SO_4$.

Como fonte de P foram acrescentadas para cada microrganismo, no preparo de 1 L de em seus respectivos meios: (1) 0,011 g de HPA ; (2) 5 mL de $Ca_3(PO_4)_2$ preparada da seguinte forma: 100 mL de solução contendo 5,0 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ e 50 mL contendo 0,05 g de KH_2PO_4 , as quais foram autoclavadas separadamente. O pH dos meios foram ajustados para 7,0 antes de serem autoclavados.

Pela relação de peso atômico do P e massa molar do KH_2PO_4 ($31/136 = 0,227$), chega-se à quantidade de 0,01135 g de P ($0,227 \times 0,05$ g) ou 11,35 mg de P em 50 mL. Como passou para um balão de 150 mL (mistura com 100 mL da solução de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$) houve uma diluição de 3 vezes ($11,35/3 = 3,78$ mg de P). Ao final, houve uma diluição extra de 200 vezes ($1000 \text{ mL}/5 \text{ mL}$), o que resulta em uma concentração final de P de $0,0189 \text{ mg P L}^{-1}$ ($3,78/200$). Considerando que o teor total de P da HPA é de $206,2 \text{ g kg}^{-1}$, a adição de $0,011 \text{ g HPA L}^{-1}$ equivale à concentração de $2,2682 \text{ mg P L}^{-1}$ de meio de cultura. Com isso, a relação usada do P da fonte insolúvel HPA em relação à fonte solúvel KH_2PO_4 foi de 120 vezes ($2,2682/0,0189$). Essa relação alta foi para permitir a visualização da formação de halo de crescimento no meio sólido para permitir a distinção entre os microrganismos na capacidade de solubilizar o P estrutural da HPA.

Foi preparada uma suspensão bacteriana de cada estirpe e realizada a diluição seriada para obtenção de concentrações celulares de *S. cerevisiae*: $0,4 \times 10^8$ UFC mL^{-1} , *E. coli*: $0,4 \times 10^8$ UFC mL^{-1} , *P. crassa*: $0,4 \times 10^{-7}$ UFC mL^{-1} ; *Bacillus sp.*: $0,5 \times 10^8$ UFC mL^{-1} e *Bacillus subtilis*: $0,4 \times 10^8$ UFC mL^{-1} .

Foi retirada uma alíquota de 100 μL das diluições para cada microrganismo, contendo as concentrações celulares desejadas e inoculados no meio NBRIP para cada fonte de P (1 e 2), através do método de inoculação por spot. No total cada placa recebeu 4 pontos de inoculação.

As placas foram incubadas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 dias (B.O.D) para determinação da formação de zonas de halo ao redor das colônias. Os diâmetros dos halos foram determinados com o auxílio de um paquímetro (mm) posicionado no reverso das placas para cada colônia a fim de se realizar uma estimativa da atividade de solubilização.

O Índice de Solubilização (IS) foi determinado (BERRAQUEIRO et al., 1976) considerando-se a média das 10 repetições para cada tratamento de cada microrganismo:

$$IS = \frac{Dh}{Dc}$$

Onde:

Dh: diâmetro (mm) do ϕ halo de hidrólise

Dc: diâmetro (mm) da ϕ colônia

Para cada um dos tratamentos foi designado um controle negativo (sem a presença de microrganismos). Todos os tratamentos, incluindo o controle negativo tiveram um número de 10 repetições e foram repetidos 3 vezes no tempo.

3.3.4 Análise da produção de sideróforos

3.3.4.1 Preparo do Chromo-Azurol

Para este ensaio foi preparado o meio CAS Chromo – Azurol modificado, segundo método estabelecido por SCHWYN, NEILANDS (1987).

(A) Solução 1. Dissolveram-se 60,5 mg de CAS em 50 mL de água ultra pura. Solução 2. Foi preparado uma solução estoque de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100 mmol L^{-1} . Adicionaram-se 100 μL da solução estoque de FeCl_3 em 9,9 mL de HCl 10 mmol L^{-1} . Solução 3. Foram dissolvidos 72,9 mg de HDTMA (hexadeciltrimetilamônio de brometo) em 40 mL de água ultra pura. As soluções 1 e 2 foram misturadas e homogeneizado em agitador por 2 min a 200 rpm. Após, foi vertida lentamente a solução 3 para evitar a formação de espuma. A mistura final foi autoclavada, abrigada da luz para evitar a degradação do meio CAS e conservada em temperatura de 4 °C.

(B) Prepararam-se 100 mL do meio MM9 com a seguinte composição: 1,28 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,05 g de NaCl; 100 μL de extrato de levedura a 10%. Em seguida, adicionaram-se 20 mL de glicose 40% esterilizada e filtrada (millipore 0,2 μm) no meio MM9 esterilizado previamente e o volume final foi ajustado em balão volumétrico de 100 mL. O meio MM9, originalmente contém ágar, para o ensaio em meio líquido o ágar não foi adicionado.

(C) Após a preparação de (A) e (B) prepararam-se 100 mL de meio líquido com a seguinte composição: 3,01 g de tampão Pipes dissolvidos previamente e 15 g de extrato de levedura, 10 mL da solução (A) e 10 mL da solução (B) as quais foram homogeneizadas lentamente, após serem adicionadas. O volume final foi ajustado em

balão volumétrico com água ultra pura, o pH foi ajustado para 7,0, e o meio foi então autoclavado.

3.3.4.2 Validação da metodologia para detecção de sideróforos

Após o preparo do reagente CAS Chromo Azurol, foi realizada a validação da metodologia. Para isto, foram preparados 1000 mL de meio líquido (Tabelas 2-4), acrescido de $0,3 \text{ g L}^{-1}$ de KH_2PO_4 com pH ajustado para 7,0, com $\text{HCl } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ou $\text{NaOH } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$, e autoclavados. Precisamente 1 mL de cada inóculo previamente preparado através de diluição seriada (item 2.2.1) foi colocado em frascos de 250 mL contendo 70 mL do meio líquido.

Os frascos contendo cada um dos microrganismos foram fechados com rolhas de algodão e gaze, autoclavadas previamente, e levados para agitação em um shaker a 220 rpm, 30°C e por 48 h.

A cada 4 h foi retirado 1 mL de cada meio de cultura e realizada leitura em espectrofotômetro (550 nm) para acompanhar o crescimento microbiano.

A análise de produção de sideróforo foi realizada a cada 24 h. Para isto, foram recolhidos 5 mL de cada um dos meios inoculados, filtrados e transferidos para tubos de ensaio, onde adicionou-se 0,5 mL da mistura (C) (CAS Chromo- Azurol). Os frascos foram envolvidos com alumínio para proteção da luz, agitados vagarosamente, e colocados sob repouso por 2h. Logo após, os frascos foram levados para espectrofotometria (600 nm). Uma curva padrão foi preparada com 0 a $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de EDTA.

3.3.4.3 Eficiência em dissolução da HPA pelos sideróforos

Depois de confirmada a presença de sideróforos através do ensaio com o CAS Chromo-Azurol foi realizada a avaliação quanto à eficiência dos microrganismos em promover a solubilização da HPA pelos sideróforos. Foram preparados 1000 mL de meio líquido (Tabelas 2-4), sem KH_2PO_4 e sem Ferro. Como fonte de P, foram adicionados 11 mg de HPA.

O pH foi ajustado para 7,0, com $\text{HCl } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ou $\text{NaOH } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$, e autoclavado. Uma alíquota de 1 mL de cada inóculo previamente preparado através de diluição seriada (item 2.2.1) foi colocado em frascos de 250 mL contendo 70 mL do meio líquido.

Os frascos contendo cada um dos microrganismos foram fechados com rolhas de algodão e gases, autoclavadas previamente, e levados para crescimento sob agitação em shaker a 200 rpm, 30°C e por 48 h.

A cada 4 h foi retirado 1 mL de cada meio de cultura e realizada leitura em espectrofotômetro (550 nm) para acompanhar o crescimento microbiano.

A análise de produção de sideróforo foi realizada após 48 h. Para a análise da produção de sideróforos foram recolhidos 5 mL de cada um dos meios inoculados, filtrados e transferidos para tubos de ensaio onde adicionou-se 0,5 mL da mistura (C) (CAS Chromo- Azurol). Os frascos foram vedados para proteção da luz, agitados vagarosamente, e colocados sob repouso por 2 h. Logo após, foram levados para espectrofotometria (600 nm). Uma curva padrão foi preparada com 0 a 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de EDTA.

A determinação do P solubilizado da hidroxiapatita foi feita diretamente em amostra do meio de cultura. Uma alíquota de 5 mL foi retirada de cada meio de cultura, filtrada (Millipore Sigma-Aldrich - 0,22 μm) para retenção de fase sólida, debris celulares e colônias e armazenada a -20°C. Os teores de P solúvel do filtrado foram determinados por ICP-OES. Com o processo de filtração excluiu-se o P imobilizado no interior das células dos microrganismos.

3.3.5 Dissolução da hidroxiapatita pela ação de ácidos orgânicos

As concentrações de ácidos orgânicos avaliadas foram: 0 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM , 50 μM , 100 μM e 150 μM , conforme os valores mínimos e máximos de ácidos orgânicos secretados pelos microrganismos descritos na literatura (ADELEKE; NWANGBURUKA; OBOIRIEN, 2017; WU; BISHOP; KEENER, 1999; ZÚÑIGA-SILGADO et al., 2020): As massas de cada ácido foram dissolvidas em 300 μL de álcool etílico PA, e o volume ajustado em balão volumétrico de 250 mL com água ultrapura (MiliQ).

Para avaliação da ação conjunta dos ácidos foi preparada solução com todos os ácidos orgânicos (Tabela 5), as massas pesadas foram dissolvidas previamente em 1 mL de álcool etílico PA, e o volume ajustado para 250 mL em balão volumétrico.

TABELA 4- CARACTERÍSTICAS DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS AVALIADOS

n.	Ácido	pKa			Peso molecular	
		pKa ₁	pKa ₂	pKa ₃	pH <i>k_{max}</i>	g/mol)
1	Cítrico	3,12	4,76	6,39	4,84	192,12
2	Fumárico	3,05	4,49		4,84	116,07
3	Maleico	1,91	6,33		4,84	116,1
4	Málico	3,4	5,13		4,84	134,08
5	Lático	3,86			3,85	90,08
6	Oxálico	1,25	4,26		3,90	90,03
7	Malônico	2,84	5,69		4,84	104,06
8	Succínico	4,20	5,63		4,84	118,09
9	Tartárico	3,03	4,36		4,84	150,08

** MIX composto por todos os ácidos, para cada uma das concentrações avaliadas, ajustada a molaridade para as concentrações avaliadas

A massa equivalente de cada ácido orgânico foi transferida para um balão com 100 mL de água ultrapura, os quais foram agitados por 2 minutos até sua completa dissolução. Após, os volumes foram ajustados para 250 mL e submetidos à degaseificação por 30 minutos.

Após degaseificação, 40 mL de cada concentração dos ácidos foram transferidos para um frasco estéril e vedado, para proteção de luz, acrescido de 11 mg de HPA. Os frascos foram agitados a 240 rpm a 25+/-1°C nos seguintes tempos: 0, 5, 7, 10, 20, 40, 60 min e 168 h. Após cada tempo, foi realizada a mensuração do pH e o potencial redox através de eletrodo de platina inerte.

Uma alíquota de 5 mL foi retirada de cada concentração e tempo para cada ácido avaliado, filtrado sob filtragem lenta, para retenção de fase sólida e armazenada a -4°C. Os teores de P solúvel do filtrado foram determinados por ICP- OES.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias dos experimentos de sideróforos foram submetidas à ANOVA e posteriormente comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro no pacote 'ExpDes.pt' (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2021). As médias dos experimentos com diferentes microrganismos e diferentes fonte de fósforo foram analisados em esquema fatorial triplo com delineamento inteiramente casualizado. Os fatores correspondiam ao microrganismo (7 microrganismos), a fonte de fósforo (5 fontes para Hidroxiapatita) em três momentos de avaliação (0, 7 dias e 15 dias). Os dados obtidos foram submetidos a ANOVA e posteriormente ao teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro no pacote 'ExpDes.pt' (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2021).

As médias dos experimentos com ácidos orgânicos foram analisados em esquema fatorial duplo com delineamento inteiramente casualizado. Os fatores correspondiam ao tempo de incubação (7 tempos) e a concentração (7 concentrações) do ácido. Os dados obtidos foram submetidos a ANOVA e posteriormente ao teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro no pacote 'ExpDes.pt' (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2021).

As concentrações e tempos de incubação com maiores médias de liberação de fósforo de cada ácido foram comparados por análise conjunta contendo tratamentos em comum (testemunha) utilizando os pacotes 'emmeans' (LENTH et al., 2020) e 'multicomp' (HOTHORN et al., 2020) e comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro no pacote 'agricolae' (MENDIBURU, 2020).

As análises estatísticas e gráficos foram produzidos utilizando o software R versão 4.0 (R CORE TEAM, 2021) na interface do Rstudio versão 1.3.1093 (TEAM RSTUDIO, 2021)

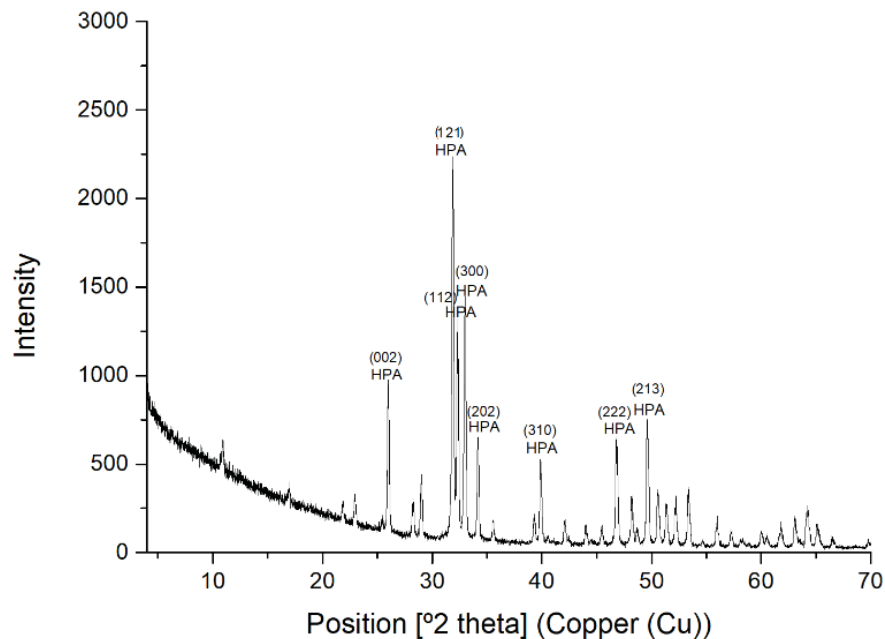
3.7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.7.1 Caracterização da Hidroxiapatita

3.7.1.1 Difração por raios x (DRX)

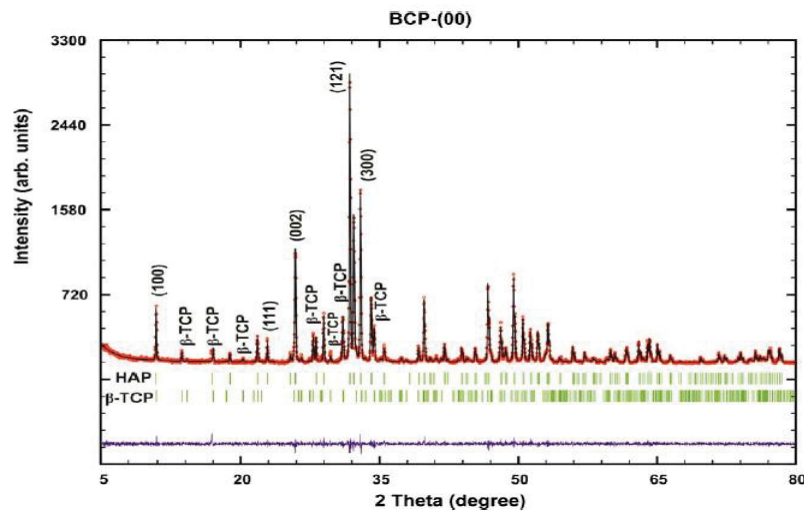
O difratograma (Figura 3) indicou que o material apresenta elevada pureza e cristalinidade. Os picos mais intensos para hidroxiapatita (Sigma-Aldrich) foram identificados nas posições $2\theta = 25,984^\circ$, $31,903^\circ$, $32,294^\circ$, $32,971^\circ$, $34,226^\circ$, $39,867^\circ$ e $49,591^\circ$. As posições estão de acordo com o padrão nº 09-432 com presença de CaO ICCD nº 37-1497. Outros autores encontraram posições similares em hidroxiapatitas sintéticas (Figura 4) (DUDEK, ADAMCZYK, 2013; KOSTOV-KYTIN et al., 2018; PATEL et al., 2015). A reduzida largura a meia altura dos picos indica elevada cristalinidade do mineral.

FIGURA 3 - DIFRATOGRAMA DE RAIOS X DA HIDROXIAPATITA SINTÉTICA NO PRESENTE ESTUDO



FONTE: A autora (2021)

FIGURA 4 - DIFRATOGRAMA DE RAIOS X DA HIDROXIAPATITA SINTÉTICA PRODUZIDA EM OUTRO ESTUDO



FONTES: Vladislav et al. (2018)

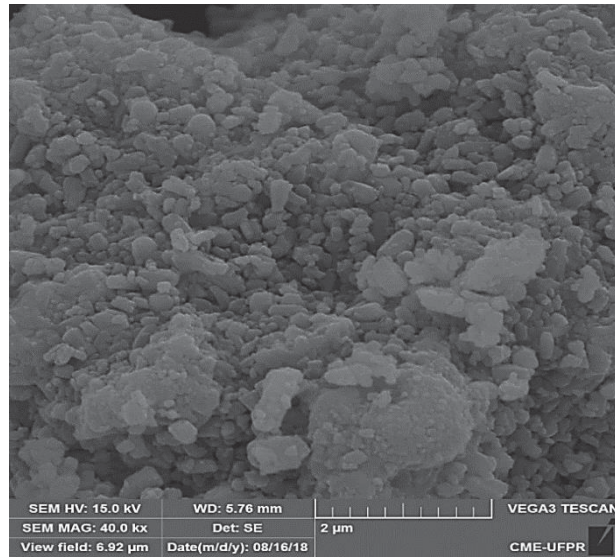
Os tamanhos dos cristallitos foram calculados através do software High Score Plus (PAN Analytical), que usa a equação de Scherrer. O crescimento do mineral nos planos (hkl) foram o seguinte: (002) - 194,4 nm, (112) - 305,6 nm, (300) - 371,2 nm, (202) - 211,3 nm, (310) - 166,8 nm, e (213) - 177,1 nm. A relação de tamanho entre os planos na direção *a* e *c* é de 1,91 (371/194), o que sugere o formato preferencial de lâmina do mineral (maior crescimento no comprimento em relação a altura).

Estudos realizados com HPA sintética mostraram cristallitos com tamanhos superiores a 53 nm, com alto grau de cristalinidade (ARAÚJO; DULCE; SOARES, 2007; DUDEK, ADAMCZYK, 2013; PATEL et al., 2015)

3.7.1.2 Microscopia eletrônica de varredura acoplada com espectroscopia por energia dispersiva (MEV-EDS)

A Figura 5 mostra as partículas de HPA aglomeradas e com morfologias granulares (alongadas nos eixos *a* e *b* em relação ao eixo *c*). Morfologia semelhante foi encontrada por SANTOS et al. (2005). O tamanho das partículas granulares, considerando a escala da Figura 5, é compatível com as estimativas médias de toda a matriz feita por DRX: 166 a 371 nm. Essas partículas pertencem ao tamanho argila média/fina, o que amplia a área superficial e a facilidade de solubilização ácida da amostra.

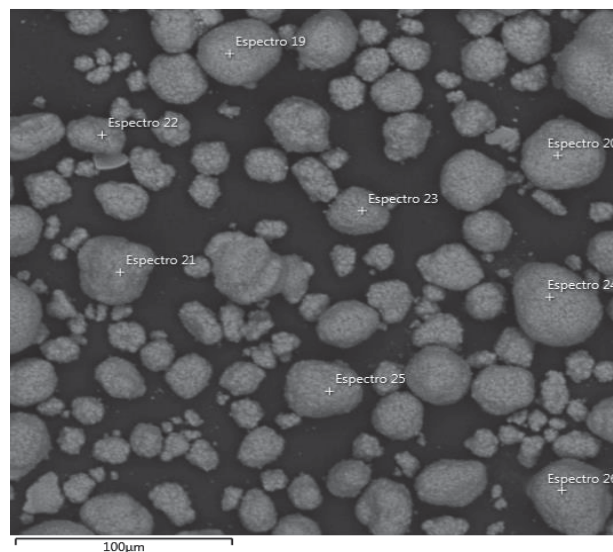
FIGURA 5-MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA EVIDENCIANDO A MORFOLOGIA DA HIDROXIAPATITA. (APROXIMAÇÃO DE 40.000X)

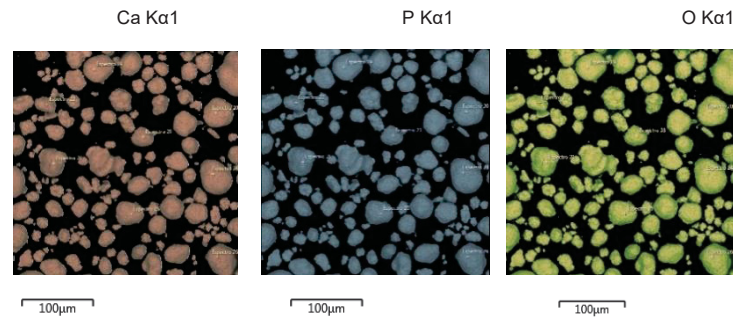


FONTE: A autora (2021)

Na Figura 6 são mostradas partículas granulares grandes (2 µm) selecionadas para análise por EDS (Tabela 7). A amostra não apresentou elementos anômalos em relação à sua composição, confirmando o grau de pureza do material. Como a análise por Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS) é menos precisa (semiquantitativa) que a determinação os teores totais pelo método EPA 3052, os teores totais de P dessas duas determinações foram diferentes (média de 181 g kg⁻¹ e 206 g kg⁻¹, respectivamente).

FIGURA 6- (A) ÁREAS AMOSTRADAS PARA A COMPOSIÇÃO QUÍMICA QUALITATIVA DA HIDROXIAPATITA, REALIZADA POR EDS; (B) DISTRIBUIÇÃO DE Ca, (C) DISTRIBUIÇÃO DE P E (D) DISTRIBUIÇÃO DE O.





FONTE: A autora (2021)

A informação importante do EDS é verificar a homogeneidade dos teores de P entre as partículas do mineral (desvio padrão de apenas 0,41% - Tabela 6). Outra informação é o elevado tamanho médio das partículas granulares selecionadas (37,2 µm) (Tabela 7). Essas partículas se enquadram ao tamanho silte (2 a 50 µm). Diferente da matriz da amostra, essas partículas granulares grandes são mais difíceis de serem solubilizadas por processos de hidrólise ácida.

TABELA 6- COMPOSIÇÃO QUÍMICA (EDS) E TAMANHO DE PARTÍCULAS ESFÉRICAS SELECIONADAS NA FIGURA 6 DE HIDROXIAPATITA

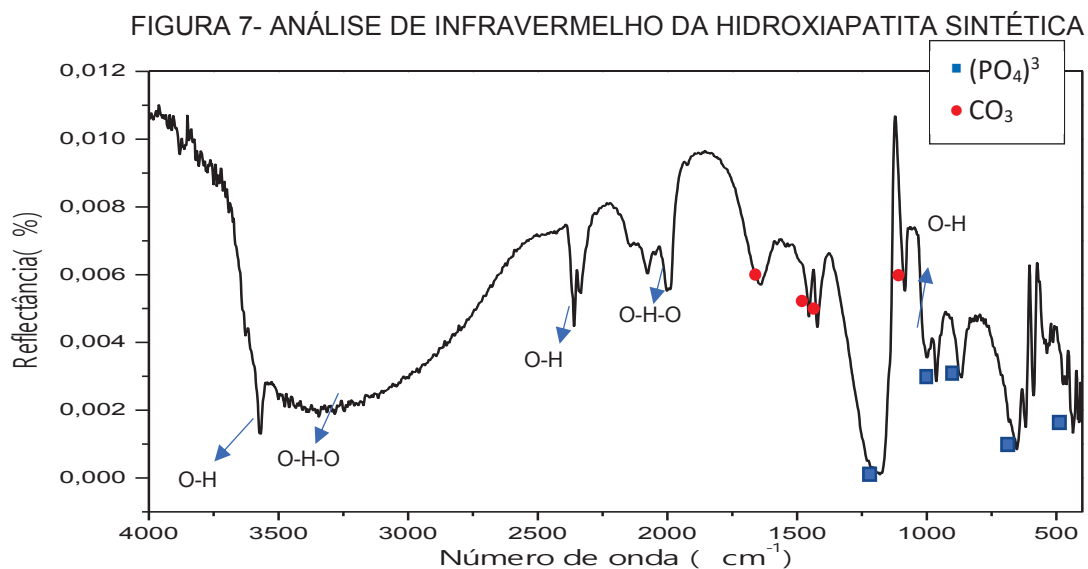
Amostra	Ca % (m/m)	P % (m/m)	O % (m/m)	Maior tamanho (µm)
Espectro 19	38,1	18,2	43,6	37
Espectro 20	36,9	18,1	45	42
Espectro 21	34,9	17,4	47,7	37
Espectro 22	40,7	18	41,3	28
Espectro 23	37,1	17,8	45,1	28
Espectro 24	38	18,6	43,5	47
Espectro 25	39,5	18,7	41,8	37
Espectro 26	37,8	18,0	44,3	42
Média	37,87	18,10	44,03	37,2
DP	1,73	0,41	2,01	

FONTE: A autora (2021)

3.7.1.3 Espectroscopia de Infravermelho – IFRIV

Os grupos funcionais da HPA foram mostrados através do IFRIV (Figura 7). As bandas formadas em 3597 cm^{-1} , 2357 cm^{-1} e 998 cm^{-1} são características da vibração da ligação O-H. O alargamento da banda entre 3481 à 2992 cm^{-1} e em 1890 cm^{-1} é característico da adsorção da H_2O na estrutura do mineral. As bandas formadas em 1186 cm^{-1} , 957 cm^{-1} , 857, cm^{-1} 652 cm^{-1} e 423 cm^{-1} são características da vibração do grupo $(\text{PO}_4)^{3-}$ na hidroxiapatita (Figura 7).

A vibração do grupo C-O pode ser observada nas bandas formadas em 1639 cm^{-1} , 1461 cm^{-1} , 1420 cm^{-1} e 1084 cm^{-1} , o que é correspondente à apatita carbonatada. Resultados similares em relação à vibração e assinatura espectral dos grupos de adsorção e funcionais foram encontrados por CONZ et al., (2005), JORDAN (1997); KUMAR et al., (2004). Amostras sintéticas de HPA com altos teores de carbonato tendem a apresentar maior capacidade de serem degradadas/dissolvidas (CONZ et al., 2005).



3.7.2 Experimentos microbiológicos para solubilização do P

3.7.2.1 Análise da eficiência dos microrganismos para solubilização e dissolução de diferentes fontes de P em meio líquido

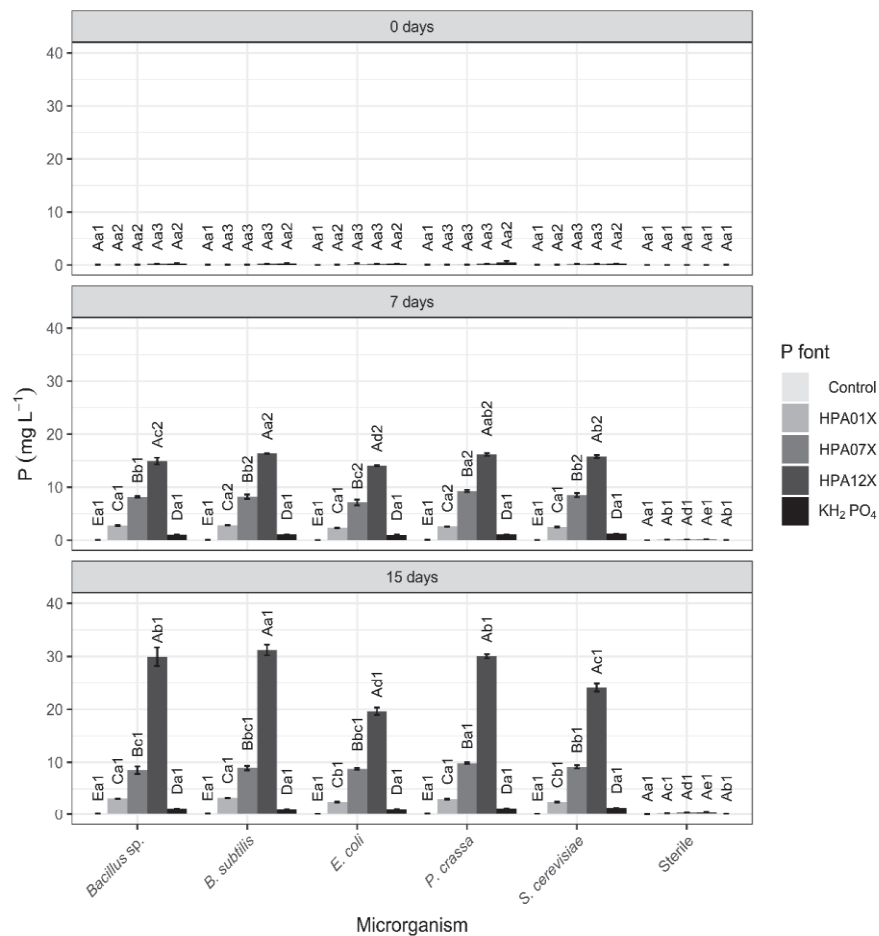
Aplicando-se o teste de Tukey (5%) para o tempo 0 h, as concentrações de P para os tratamentos KH_2PO_4 , HPA 1, HPA 7 e HPA 12 não apresentaram diferenças estatísticas quando comparada as médias obtidas para o controle nativo e positivo, para todos os microrganismos (Figura 8). Para o tempo 0 h, o valor de pH se manteve igual ao do grupo controle para todos os microrganismos, em todos os tratamentos avaliados (pH=7.0) (Figura 9).

Resultados similares foram encontrados por AHMAD et al., (2018) ao utilizarem o microrganismo *Bacillus subtilis*, simulando solos mais alcalinos. SOUCHIE

et al., (2005) ao avaliaram *Aspergillus* e quatro bactérias solubilizadoras, da família *Enterobacteriaceae*, para estudar a solubilização de três tipos de fosfato inorgânico em meio sólido e líquido, relataram maior eficiência dos fungos leveduriformes comparados às bactérias, explicado pela maior produção de biomassa e redução de pH.

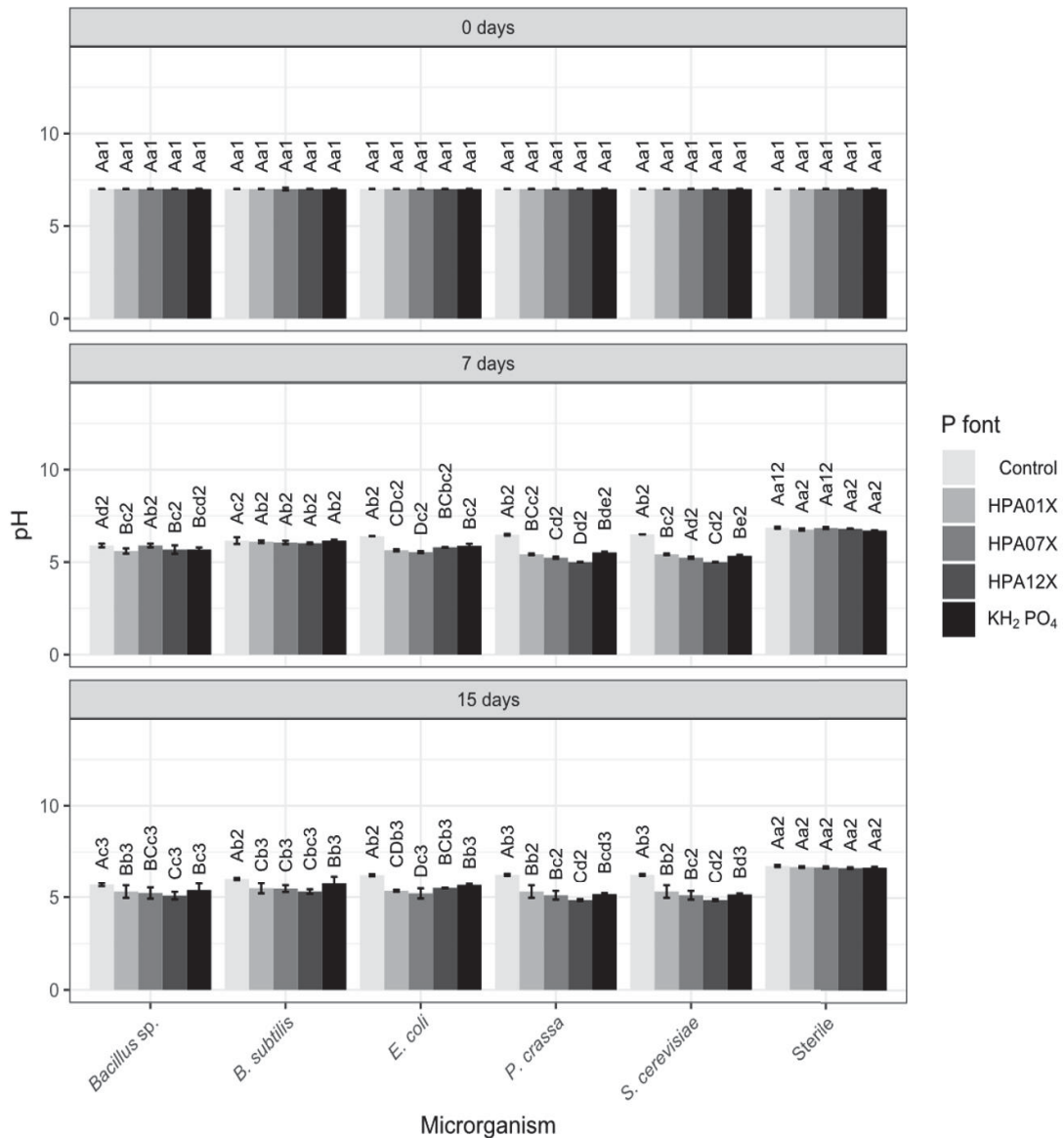
Reyes et al., (2006) ao isolarem microrganismos rizosférico e avaliarem sua eficiência em promover a dissolução da hidroxiapatita, constataram que os microrganismos demonstraram variações em relação ao seu metabolismo o que afetou diretamente sua eficiência em liberar o P estrutural do mineral. Segundo os autores, essa diferença metabólica está relacionada às fontes de carboidrato e nitrogênio presentes no meio.

FIGURA 8- CONCENTRAÇÃO DE P-DISPONÍVEL NOS DIFERENTES TRATAMENTOS, SOB AÇÃO DOS MICRORGANISMOS.



*Letras minúsculas indicam médias iguais dentro dos tratamentos de cada microrganismo. Letras maiúsculas diferentes indicam médias diferentes para a concentração entre os microrganismos. Número iguais indicam que não houve diferença para o tempo avaliado (número 1 indica maior concentração de P no respectivo tempo e assim por diante até tempo 3). Control – grupo controle – sem adição de P e inoculado. Sterile – controle negativo (com adição de P e sem inoculação).

FIGURA 9- EFEITO DO pH SOBRE AS DIFERENTES FONTES DE P, SOB AÇÃO DOS MICRORGANISMOS



*Letras minúsculas indicam que médias iguais dentro dos tratamentos de cada microrganismo. Letras maiúsculas diferentes indicam médias diferentes para a concentração entre os microrganismos. Número iguais indicam que não houve diferença para o tempo avaliado (número 1 indica maior concentração de P no respectivo tempo e assim por diante até tempo 3). Control – grupo controle – sem adição de P e inoculado. Sterile – controle negativo (com adição de P e sem inoculação).

A baixa eficiência em promover a dissolução da HPA para o tempo 0 h pode ocorrer devido ao fenômeno inerente à cinética microbiana na fase lag (SWINNEN *et al.*, 2004). Neste período, pode ocorrer um delay na resposta da população microbiana quando ocorre uma mudança das condições do meio. Esse período é considerado uma fase de ajustes para que os microrganismos possam se adaptar à essas mudanças, e assim modificar o ambiente para obter vantagens que contribuam para o crescimento exponencial da colônia (ROLFE *et al.*, 2012; ŠTUMPF *et al.*, 2020)

Alguns estudos apontam que quando as condições do meio são alteradas nessa fase, pode ocorrer ainda uma fase lag intermediária, aumentando a duração desta fase (ŠTUMPF et al., 2020; SWINNEN et al., 2004; VARGAS et al., 2017).

Esse comportamento foi constatado por ŠTUMPF et al. (2020), ao submeter *E. coli* a condições iniciais de estresse em decorrência da alteração da constituição do meio.

Para o tempo de 7 dias, todos os microrganismos apresentaram diferenças estatísticas significativas, na comparação das médias dentro dos seus tratamentos, e apresentaram maior eficiência em liberar o P estrutural do tratamento com o HPA 12. A dose de P total desse tratamento é 12 vezes superior ao tratamento HPA 1. No HPA 12, o teor de P total (estrutural) também é 12 vezes superior ao teor de P da fonte solúvel KH_2PO_4 .

Para o HPA 12 não houve diferenças estatísticas em relação a capacidade de promover a liberação do P estrutural do mineral dos microrganismos *B. subtilis* (16,3 mg L^{-1}) e *P. crassa* (16,2 mg L^{-1}). Em relação ao efeito do pH, *P. crassa* e *S. cerevisiae* apresentaram a mesma e maior eficiência em acidificar o meio (pH=5,2) para este tempo, enquanto para *B. subtilis* o pH caiu para 5,7.

Para o tempo de 15 dias a eficiência em promover a dissolução do mineral, para os tratamentos HPA 1, HPA7 e HPA 12, aumentou para todos os microrganismos. Dentre os tratamentos, HPA 12 foi o tratamento onde houve maior eficiência para todos os microrganismos. *B. subtilis* apresentou maior eficiência de solubilização para a HPA12 (P= 31,2 mg L^{-1} , com pH =5,2). Os microrganismos *P. crassa* e *Bacillus* sp., não apresentaram diferenças estatísticas (30,0 e 29,9 mg L^{-1} , respectivamente) (Figura 8), contudo, *P. crassa* e *S. cerevisiae* contribuíram para a maior acidificação do meio (pH=4,8) (Figura 9).

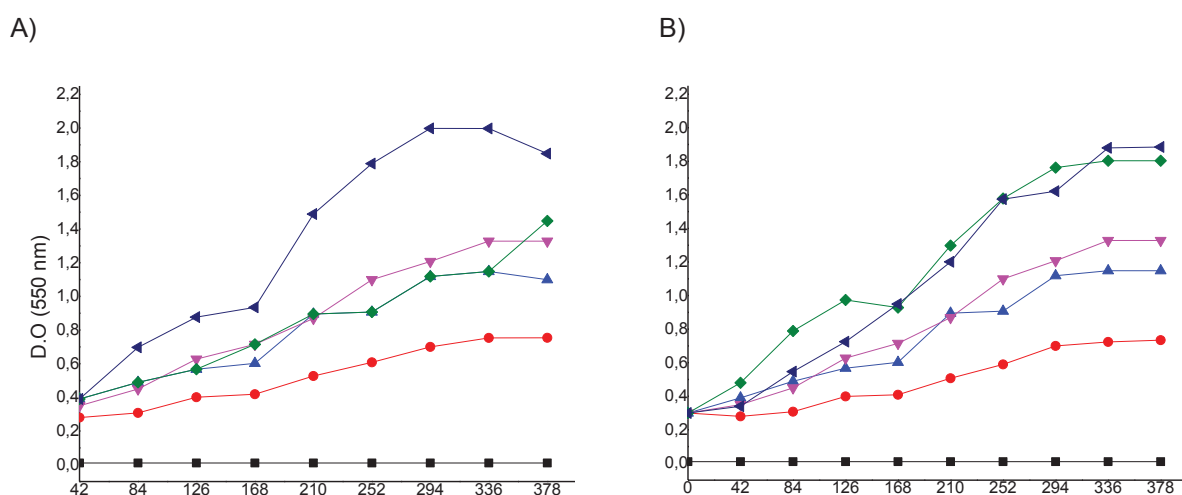
Estudos realizados com *Bacillus subtilis*, geralmente correlacionam o microrganismo com a sua capacidade de liberar P de fontes mais solúveis de Ca-P, como fosfato tricálcico (MAHESWAR, SATHIYAVANI, 2012). DIPAK, SANKAR (2016) também reportaram a máxima eficiência em solubilizar fosfato para *Bacillus* sp., depois de 96 h de incubação.

Para os tempos de 7 e 15 dias, para a fonte solúvel KH_2PO_4 , o teste de médias mostrou que todos tiveram a mesma eficiência em promover a liberação do P para o meio de cultura após filtragem. Os microrganismos para a fonte solúvel KH_2PO_4 não foram eficientes em acidificar os meios (7 e 15 dias médias de pH de 5,88 e 6,7,

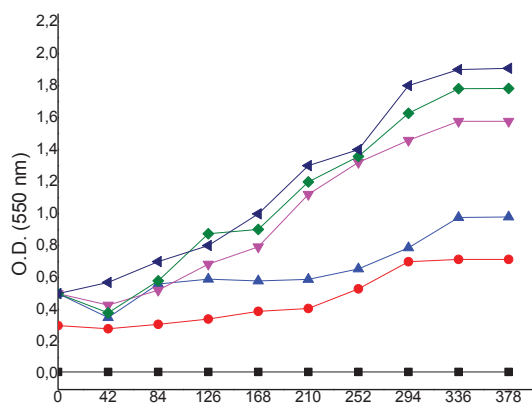
respectivamente). As maiores acidificações para os tempos de 7 e 15 dias foram para *S. cerevisiae* no tratamento HPA 12 (pH=5,34 e 5,14, respectivamente (Figura 9).

Uma comparação importante é a similaridade nos teores de P solúvel no meio de crescimento filtrado entre os tratamentos HPA 1 e KH_2PO_4 , para 7 e 15 dias de avaliações (Figura 8). Como a dose de P para esses dois tratamentos foi a mesma no meio de cultura (o que difere é a forma do P: KH_2PO_4 prontamente solúvel e HPA1 estrutural e não disponível), essa similaridade nos teores de P indica que os mecanismos de solubilização dos microrganismos foram eficientes. Para alguns microrganismos, inclusive, os teores de P do HPA1 foram superiores aos teores de P do KH_2PO_4 . Como o meio de cultura foi filtrado antes da determinação dos teores de P solúveis no meio de cultura, possivelmente, na fonte solúvel uma maior quantidade de P foi imobilizada nas células dos microrganismos. Com a filtragem (Millipore Sigma-Aldrich - 0,22 μM) tem-se a retenção de fase sólida, debris celulares e colônias. Como se pode verificar nos dados de crescimento microbiano (Figura 10), houve maior crescimento no tratamento KH_2PO_4 , o que amplia a possibilidade de imobilização do P na biomassa microbiana.

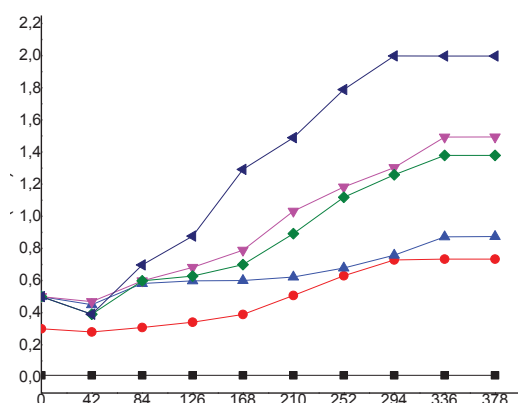
FIGURA 10 - CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS SUBMETIDOS À DIFERENTES FONTES DE P: A) *Bacillus* sp. B) *Bacillus subtilis*; C) *P. crassa*; D) *S. cerevisiae*; E) *E. coli*



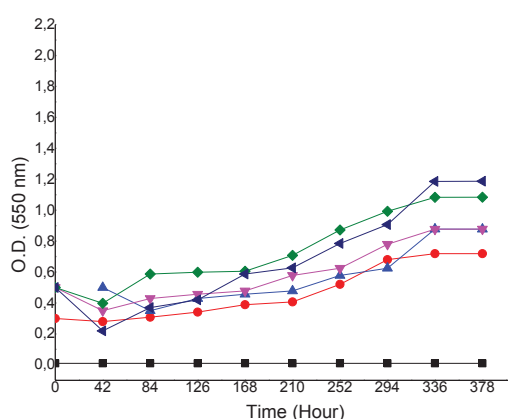
C)



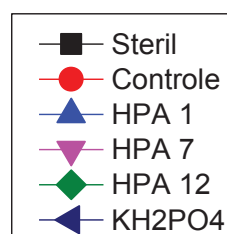
D)



E)



Legenda



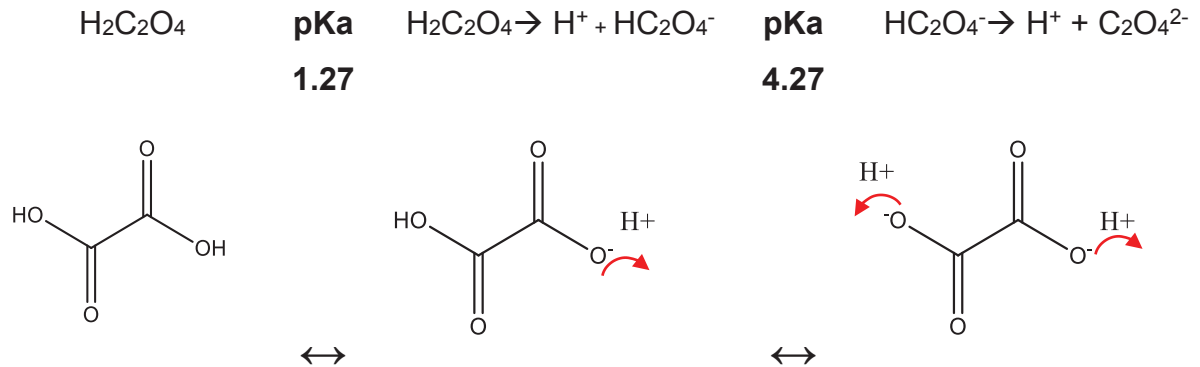
A eficiência em promover a dissolução de minerais Ca-P, está na característica e eficiência do microrganismo em liberar compostos metabólicos que sejam capazes de promover a acidificação do meio, uma vez que as reações de dissolução da hidroxiapatita são controladas pelo pH (DOROZHKIN, 1997, 2012^a). Os resultados demonstraram que a concentração de P solúvel apresenta tendência a aumentar à medida que ocorre a diminuição do pH para todos os microrganismos (Figuras 8 e 9), o que está de acordo com experimentos realizados por MASSENSINI et al., (2015); SHI et al., (2017)

Dentre os mecanismos hipotetizados para solubilização de fontes de P, devido a sua capacidade de acidificação do meio, está a produção dos ácidos orgânicos (A.Os) (BEHERA et al., 2017; JONES et al., 2003; VALSAMI-JONES et al., 1998; WANG et al., 2019). Os A.Os apresentam elevada densidade de carga negativa nos grupos carboxílicos de superfície acima de pKa 4,0 (Figura11). A dissociação acima desse pH contribuirá para o aporte de prótons para a solução ao redor da colônia

microbiana (ASH et al., 2016; PLANTE; STONE; MCGILL, 2015; SCHMITT et al., 2018).

FIGURA 11- EXEMPLO DE DISSOCIAÇÃO DE ÁCIDO ORGÂNICO ACIMA DO pKa E FORMAÇÃO DE CARGA NOS GRUPOS HIDROXILÍCOS:

ÁCIDO OXÁLICO



FONTE: A autora (2021)

Outros metabólitos secundários, como polissacarídeos, também estão associados à capacidade de solubilização de P. Contudo, ainda não está claro como ocorre essa solubilização e nem quais classes de polissacarídeos são eficientes (SULTANA *et al.*, 2019; UPADHYAY, SINGH, SINGH, 2011; Yanmei, Weiyi, Ying, 2007). Para testar os mecanismos envolvidos na solubilização da HPA, experimentos adicionais foram feitos com ácidos orgânicos e sideróforos.

3.2.2 Eficiência dos microrganismos para solubilização e dissolução de diferentes fontes de P em meio sólido

A capacidade de produzir ácidos orgânicos que sejam capazes de promover a hidrólise das fontes fosfato tricálcico (TCP) e hidroxiapatita (HPA) em meio sólido foram avaliadas pela formação de halo translúcido ao redor das colônias.

Após 15 dias de incubação, os microrganismos foram classificados de acordo com a formação deste halo ao redor de suas colônias como baixa (I.S. < 2), média ($2 \leq \text{I.S.} < 4$) e alta solubilização (I.S. > 4) (HARA; OLIVEIRA, 2004).

Para o TCP, os microrganismos apresentaram diferenças quanto ao índice de solubilização (IS), apresentando valores entre 1,1 e 2,95 (Tabela 8). *P. crassa* apresentou I.S. médio, tanto para TCP, quanto para a fonte mineral HPA. Os demais microrganismos foram classificados como baixos (I.S.<2) para as duas fontes de P. A maior solubilização de P promoveu maior crescimento de *P. crassa* (UFC 10 vezes superior aos demais microrganismos), o que evidencia a respostas destes a esse nutriente. Os índices para *P. crassa* estão de acordo com o relatado na literatura para fungos leveduriformes (EL-AZOUNI, 2008). Narsian et al. (2010), por exemplo, obtiveram como melhor resultado para solubilização de fosfato em meio sólido o índice de solubilização de 1,43, pela levedura *Saccharomyces* sp.

Os microrganismos foram eficientes em promover a hidrólise do TCP e HPA em meio líquido (Figura 8), embora o mesmo não tenha sido observado no presente experimento em meio sólido (Tabela 8). Vários estudos têm relatado que, embora muitos organismos não apresentem nenhuma formação de zona clara ao redor das colônias, ou classificações baixas de I.S. no meio NBRIP, eles são capazes de solubilizar fontes inorgânicas de P em meio líquido (DE OLIVEIRA-LONGATTI et al., 2020; MEHTA; NAUTIYAL, 2001; SUSILOWATI; KUSUMO; ARIFIN, 2019).

TABELA 7 - ÍNDICE DE SOLUBILIZAÇÃO (IS) DOS MICRORGANISMOS PARA DIFERENTES FONTES DE P EM MEIO SÓLIDO

Cepas	TCP					HPA		
	D.O	UFC mL ⁻¹	\bar{X}	σ	C.V	\bar{X}	σ	C.V
<i>P. crassa</i>	0,5	0,5 x 10 ⁷	2,80	0,14	9,88	2,95	0,05	3,25
<i>Bacillus</i> sp	0,32	0,5x10 ⁸	1,7	0,15	8,42	1,47	0,05	3,94
<i>B. subtilis</i>	0,3	0,5x10 ⁸	1,36	0,14	10,41	1,38	0,05	4,09
<i>S. cerevisiae</i>	0,51	0,5 x 10 ⁸	1,1	0,13	7,98	1,58	0,05	3,90
<i>E. coli</i>	0,5	0,4x10 ⁸	1,9	0,14	8,78	1,20	0,05	3,50
Controle	---	--	--	--	--	--	--	--

TPC: Fosfato tricalcico; HPA: Hidroxiapatita; As médias apresentadas referem-se ao r=10, para cada microrganismo e fonte de P.

FONTE: A autora (2021)

3.2.3 Análise da produção de sideróforos

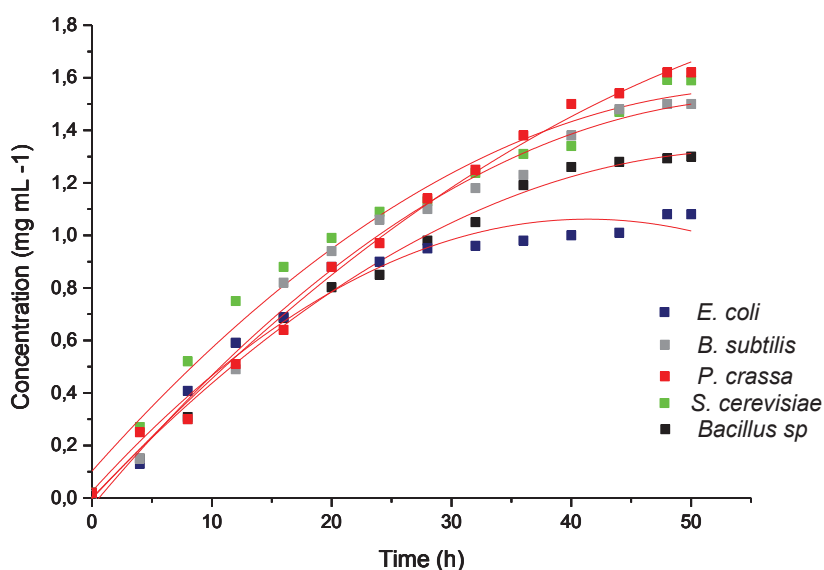
3.2.3.1 Validação da metodologia

Os dados foram apresentados segundo suas médias e as curvas de crescimento foram monitoradas em triplicata.

A fim de evitar o transporte de Fe do meio onde estavam previamente inoculados, o que inibiria a produção de sideróforos, as células foram lavadas e reinoculadas no meio sem Fe. Uma alíquota foi retirada do meio inoculado e o Fe quantificado utilizando-se ICP-OES. A leitura ficou abaixo do limite de detecção de Fe do aparelho (0.007 mg L^{-1}).

A validação consistiu se haveria crescimento dos microrganismos (Figura 12) e produção de sideróforos (Figura 13) em meio sem Fe, mas com fonte solúvel de P (KH_2PO_4), para as cinco espécies avaliadas. Após um período de 48 horas de crescimento, o *Bacillus* sp. e *B. subtilis* alcançaram uma produção de biomassa de $1,3 \text{ mg mL}^{-1}$ e $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$, respectivamente (Figura 12). Comportamento similar foi reportado para outras espécies de *Bacillus* (BHARUCHA et al., 2013, AIT TAKI et al., 2015; SANTOS et al., 2014). *P. crassa* e *S. cerevisiae* obtiveram biomassa superior aos demais microrganismos ($1,62$ e $1,59 \text{ mg mL}^{-1}$, respectivamente).

FIGURA 12- CURVA DE CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS. CADA PONTO REPRESENTA A MÉDIA ($r=5$) DAS ANÁLISES REALIZADAS DURANTE O CRESCIMENTO NO MEIO CAS-BLUE

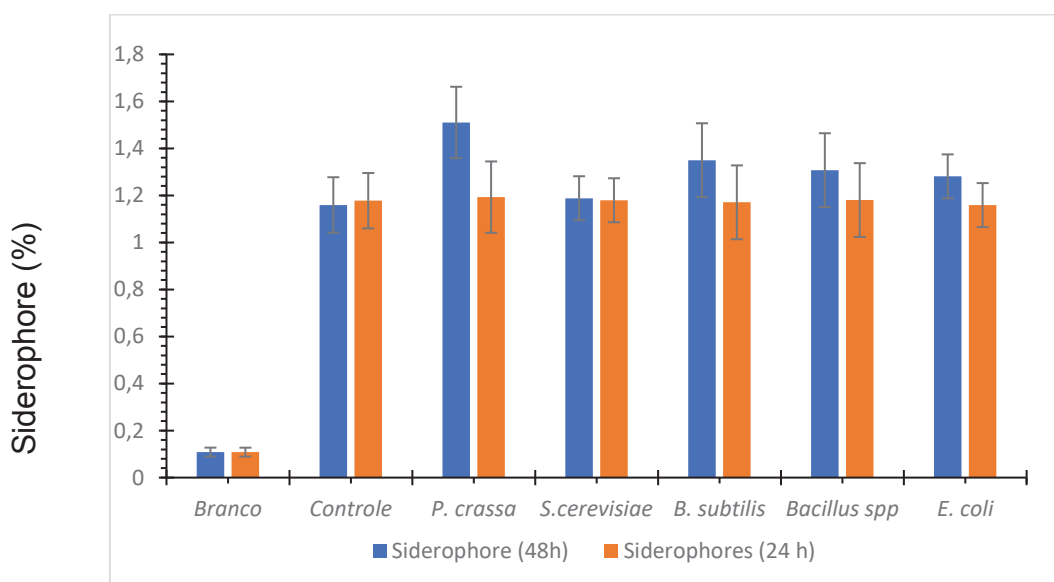


FONTE: A autora (2021)

Em relação à eficiência na produção de sideróforos (Figura 13), os microrganismos foram capazes de sobreviver em condições de privação de Fe, sem inibição do crescimento. A concentração mínima de Fe no meio para que os microrganismos (principalmente gram-negativos) tenham uma ótima produção de biomassa deve ser de 10^{-8} - $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (ANDRADE et al., 2000; GABRIELIAN et

al., 2019). A fim de adquirir o Fe necessário para as atividades metabólicas, muitos mecanismos são ativados, como a produção de muitas enzimas ou complexos como sideróforos. Esse alto custo energético pode limitar também a proliferação celular microbiana (CHAHAL; OUTTEN, 2012; KAPLAN et al., 2006; MENDOZA-CÓZATL, et al., 2019). As espécies de microrganismos não apresentaram diferença estatística no tempo de 24 h para produção de sideróforos quando comparadas como grupo controle (Figura 13). Já no tempo de 48 h, a produção de sideróforos foi maior ao tratamento controle para todos os microrganismos, com exceção de *S. cerevisiae*. A maior produção de sideróforos ocorre após a fase exponencial de crescimento, o que ocorre para muitos microrganismos após 24 h de crescimento (KUMAR et al., 2017).

FIGURA 13 - SCREENING DA PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS PELOS MICRORGANISMOS AVALIADAS EM MEIO COM PRIVAÇÃO DE Fe.



FONTE: A autora (2021)

Para o tempo de 48 h, os microrganismos *B. subtilis*, *Bacillus sp.*, *E. coli* e *S. cerevisiae* não apresentaram diferenças estatísticas para a produção de sideróforos (Figura 13). A produção de sideróforos foi mais significativa para *P. crassa*. Estudos realizados com outras espécies de fungos têm demonstrado elevada capacidade de produzir compostos quelantes, como os sideróforos sob condições limitantes (MARTINO et al., 2004).

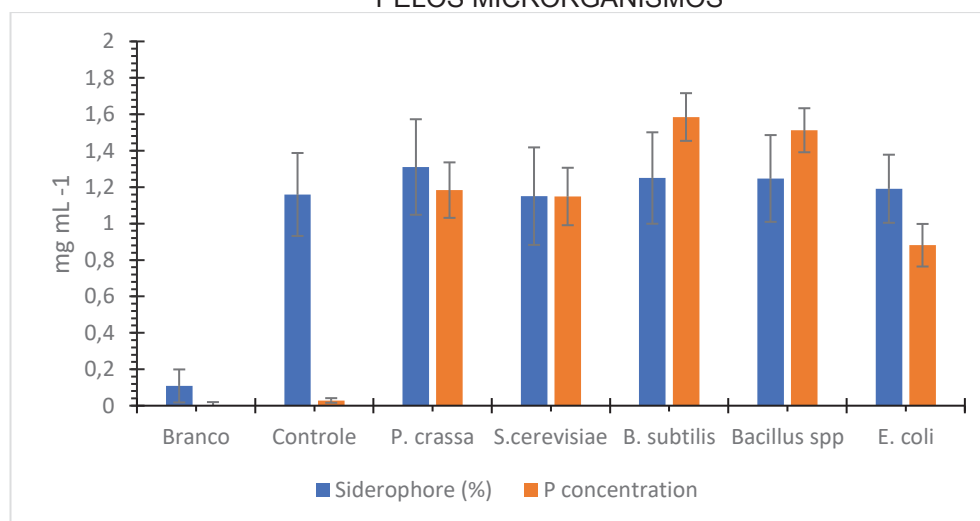
A baixa produção de sideróforos, como foi verificada por *S. cerevisiae*, pode ser explicada pelo fato de que muitos microrganismos não expressam os genes ou

não se adaptam ao meio de cultivo usado especialmente para estes testes (MUKHTAR, et al., 2017).

3.2.3.2 Eficiência na dissolução da HPA pelos sideróforos

Nesse experimento, como no item anterior, houve privação de fonte de Fe no meio de cultura, mas com o uso de fonte insolúvel de P (HPA) para verificar a relação entre produção de sideróforos e liberação de P. A maior competência na produção de sideróforos em meio contendo HPA foi para *P. crassa*, seguido das bactérias *Bacillus subtilis* e *Bacillus* sp. (Figura 14). Em comparação ao grupo controle (sem adição de P e inoculado), em que a concentração de P foi de $0,0287 \text{ mg mL}^{-1}$, os microrganismos promoveram a dissolução da HPA e liberação do P estrutural.

FIGURA 14 - PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS E LIBERAÇÃO DE P DA HIDROXIAPATITA PELOS MICRORGANISMOS



FONTE: A autora (2021)

A ação dos sideróforos ser reconhecidamente na complexação do Fe^{3+} , existe algumas moléculas que apresentam grupos carboxílicos, como rhizoferrina (com grupos funcionais hidroxicarboxilados) e Anguibactina (grupos funcionais catecol-hidroxâmico) (Figura 1, capítulo 1). Como a acidez dos grupos carboxílicos é relativamente elevada ($\text{pKa} \sim 4,0$), a dissociação desses grupos favorece a acidificação do meio e apresenta como ação a dissolução e solubilização da HPA.

É possível que para as espécies de *Bacillus* esses sideróforos carboxilados tenham sido produzidos em maior quantidade (maior solubilização de P) (Figura 14).

Portanto, nessa linha de raciocínio, o efeito mais importante da produção de sideróforos na solubilização da HPA é a qualidade dos compostos produzidos e excretados.

Contudo, não se pode negligenciar o efeito da produção simultânea de ácidos orgânicos pelos microrganismos. Por exemplo, em todos os tratamentos inoculados houve a produção de ácidos orgânicos (inclusive no grupo controle), o que promoveu a dissolução da HPA e liberação de P nos tratamentos com as cinco espécies de microrganismos. As duas possibilidades podem ser aditivas, em que a acidificação do meio pode ter sido pelos ácidos orgânicos e sideróforos com grupos carboxílicos.

Para isolar o efeito dos ácidos orgânicos na solubilização da HPA foi conduzido o experimento a seguir.

3.2.4 Dissolução da hidroxiapatita pelos ácidos orgânicos

Os dados a seguir referem-se à média de três repetições, de três experimentos (Figuras 15-22). A dissolução da HPA e liberação de P foi dependente de pH e ocorreu em tempos muito curtos (5-20 min).

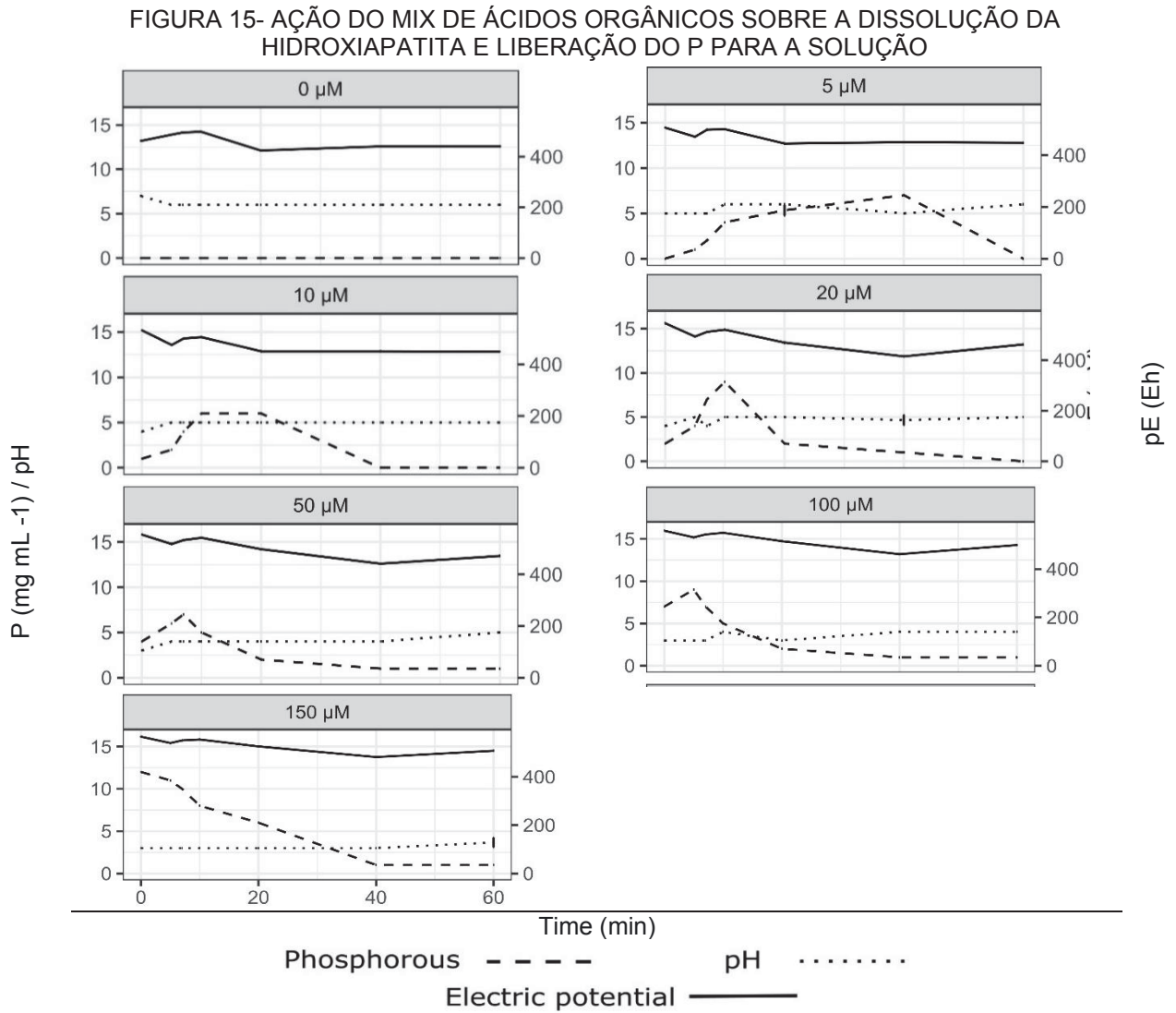
A concentração do ácido orgânico tem influência direta na velocidade das reações em tempos inferiores a 5 min. O pH inicial era em torno de 7,0 e pode ser verificado no tratamento sem ácidos orgânicos. Em todos os tratamentos com a adição de ácido, mesmo no tempo zero, o pH reduziu para valores próximos ou bem inferior a 5.

Quanto maior a concentração do Mix de ácidos orgânicos (composto por todos os ácidos orgânicos), mais expressiva foi a redução do pH no tempo zero e maior a liberação de P estrutural da HPA (Figura 15). No 0 h o pH já reduziu para 3,2 e com o tempo houve ligeira redução do potencial redox do meio.

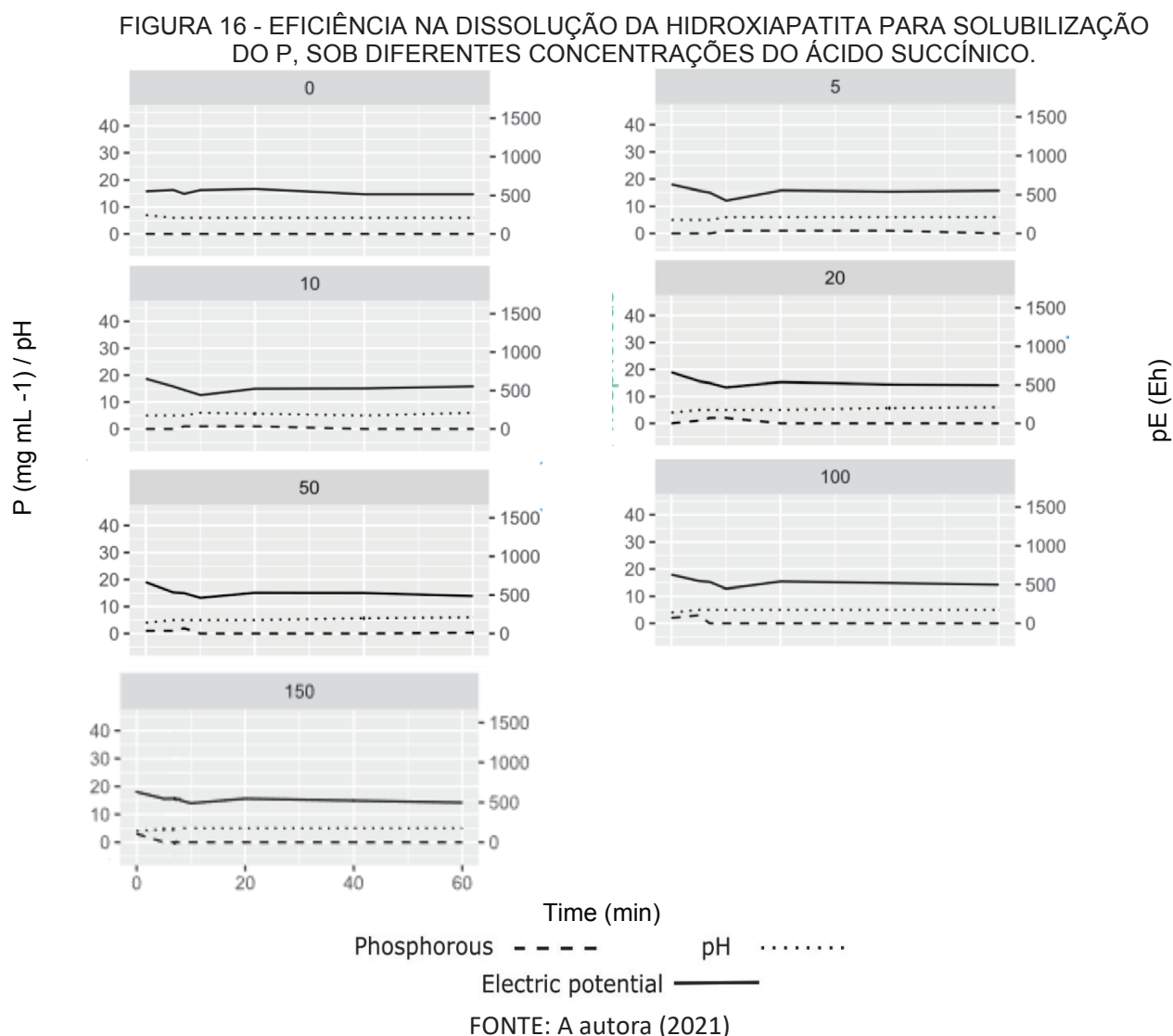
Contudo, apesar de ser composto por vários ácidos, o tempo de dissolução de 60 min (Figura 15), apresentou a mesma tendência que dos ácidos avaliados individualmente (Figuras 16 a 22), com as menores concentrações encontradas de P ($1,18 \text{ mg mL}^{-1}$). Houve diferenças estatísticas entre os tempos para as maiores concentrações do mix.

A menor concentração do Mix ($5 \mu\text{M}$) em um tempo de reação instantânea (0 min) não foi suficiente para liberação significativa de P (concentrações inferiores a $0,68 \text{ mg mL}^{-1}$), mesmo sob condições ácidas (pH 5,0) (Figura 15).

As maiores liberações de P pelo ácido succínico (3,1 e 2,1 mg mL⁻¹) foram para as maiores concentrações de 100 e 150 µM, no tempo 5 e 0 min, respectivamente (Figura 16). Nas demais situações, a liberação de P ficou próxima a zero.

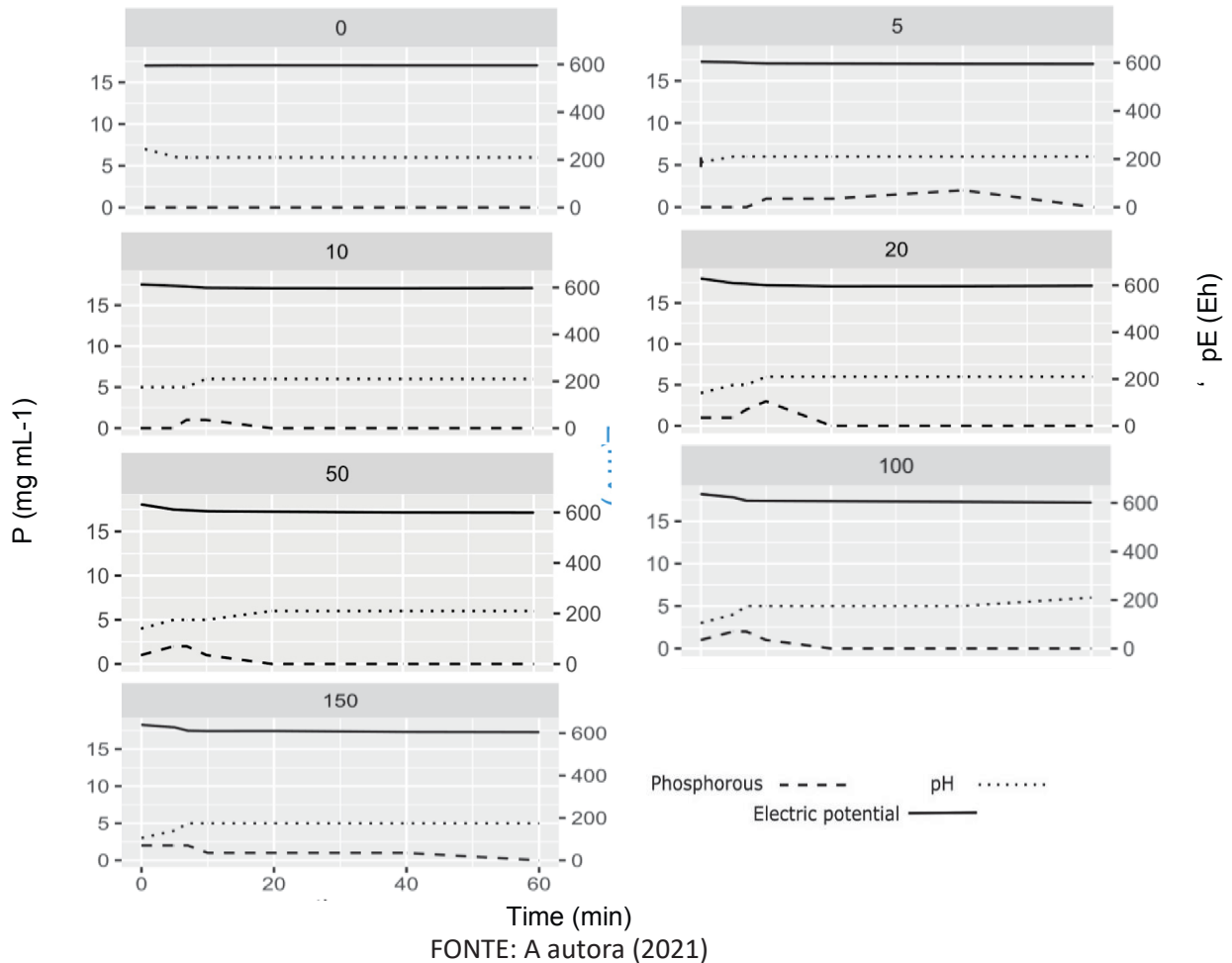


FONTE: A autora (2021)



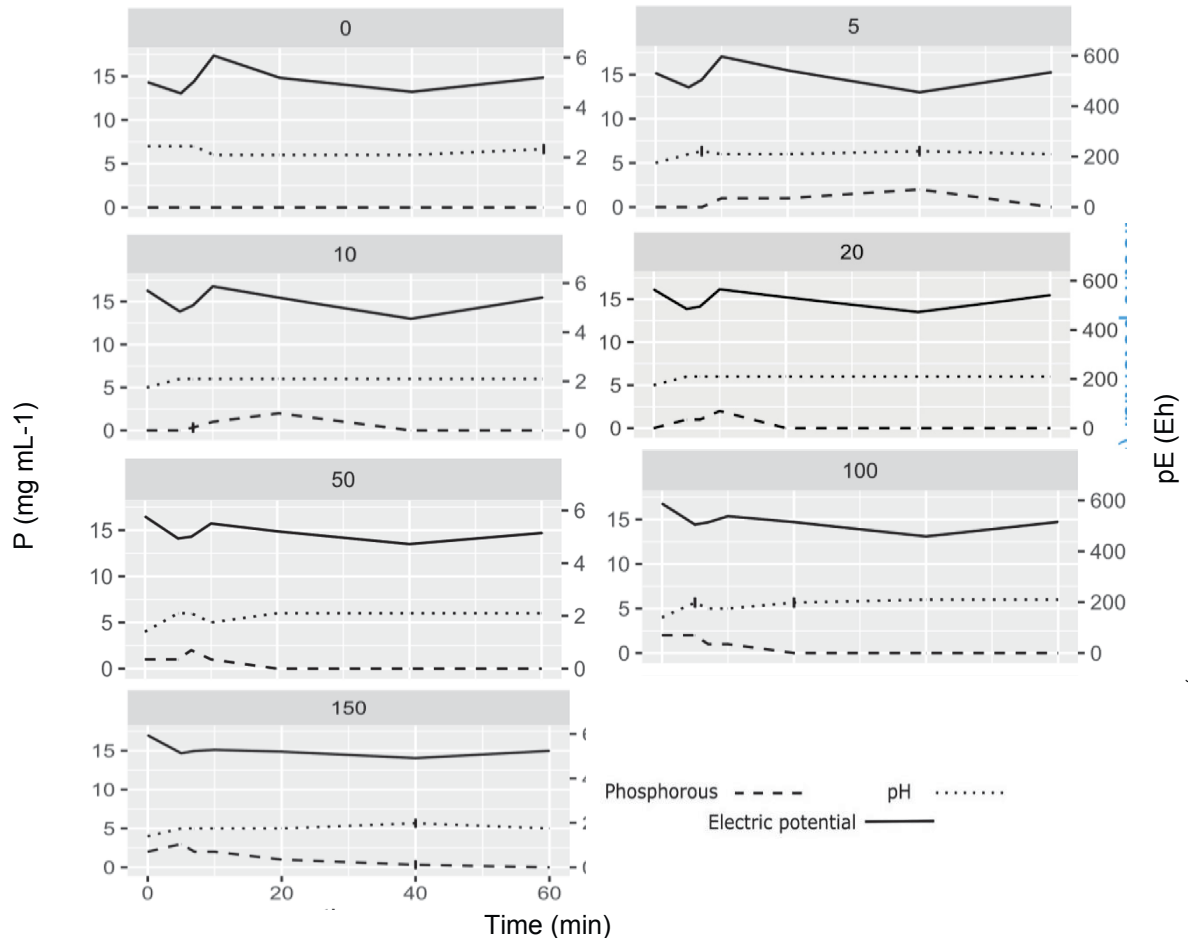
As maiores concentrações de P liberadas pelo ácido láctico também foram para as concentrações de 100 e 150 μM (1,8 e 2,6 mg mL^{-1} , respectivamente) (Figura 17). No tempo máximo de dissolução da HPA (60 min), as concentrações de P decaíram à medida que houve aumento do pH. O meio foi mais ácido no 0 min para as concentrações de 100 e 150 μM (3,5 e 3,2, respectivamente). Após 5 min, a capacidade de acidificação do ácido decaiu 2 pontos, até o tempo de 60 min (pH 5,2), o que condiz com a capacidade de dissociação do ácido, o qual apresenta apenas um pK_a (Figura 2, capítulo 1).

FIGURA 17- EFICIÊNCIA NA DISSOLUÇÃO DA HIDROXIAPATITA PARA SOLUBILIZAÇÃO DO P, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO LÁTICO.



As concentrações de P no tempo 0 min de contato HPA com ácido málico não apresentaram diferenças estatísticas entre as concentrações do ácido (Figura 18). A dissolução da HPA por este ácido e liberação do P ocorre dentro dos tempos 0-10 min, principalmente para as maiores concentrações do ácido (100 e 150 μM). O pH para as maiores concentrações (100 e 150 μM) foi de 4,1 no tempo 0 min, elevando-se no tempo de 60 (pH 6,2 e 5,9, respectivamente).

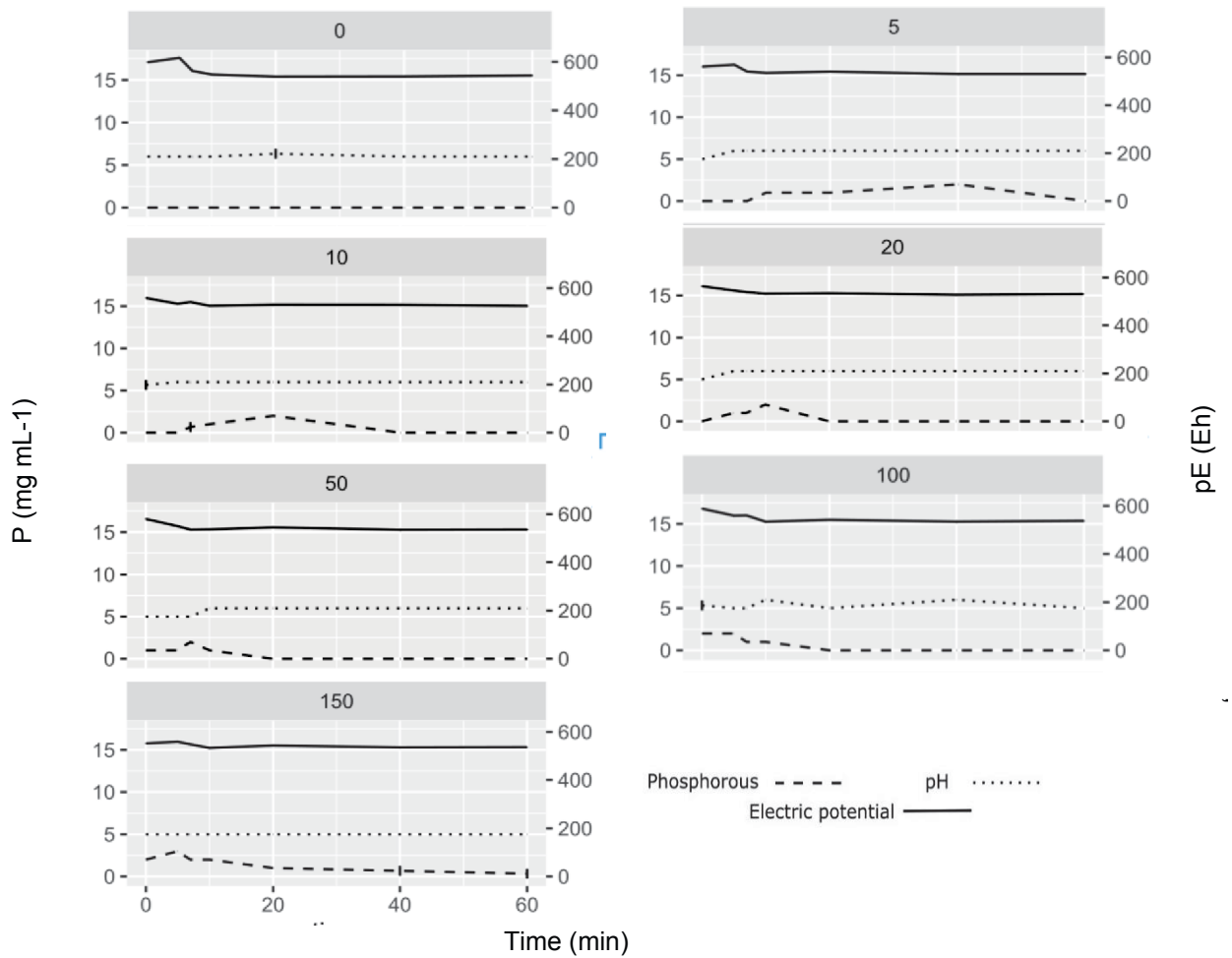
FIGURA 18 - EFICIÊNCIA NA DISSOLUÇÃO DA HIDROXIAPATITA PARA SOLUBILIZAÇÃO DO P, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO MÁLICO.



FONTE: A autora (2021)

As concentrações 100 e 150 μM do ácido malônico foram mais eficientes em promover a solubilização de P da HPA para o tempo de zero (2,3 e 2,7 mg mL⁻¹, respectivamente) e 5 min (2,8 e 3,8 mg mL⁻¹, respectivamente). As concentrações mais expressivas de P na solução foram obtidas no tempo máximo de 10 min (Figura 19).

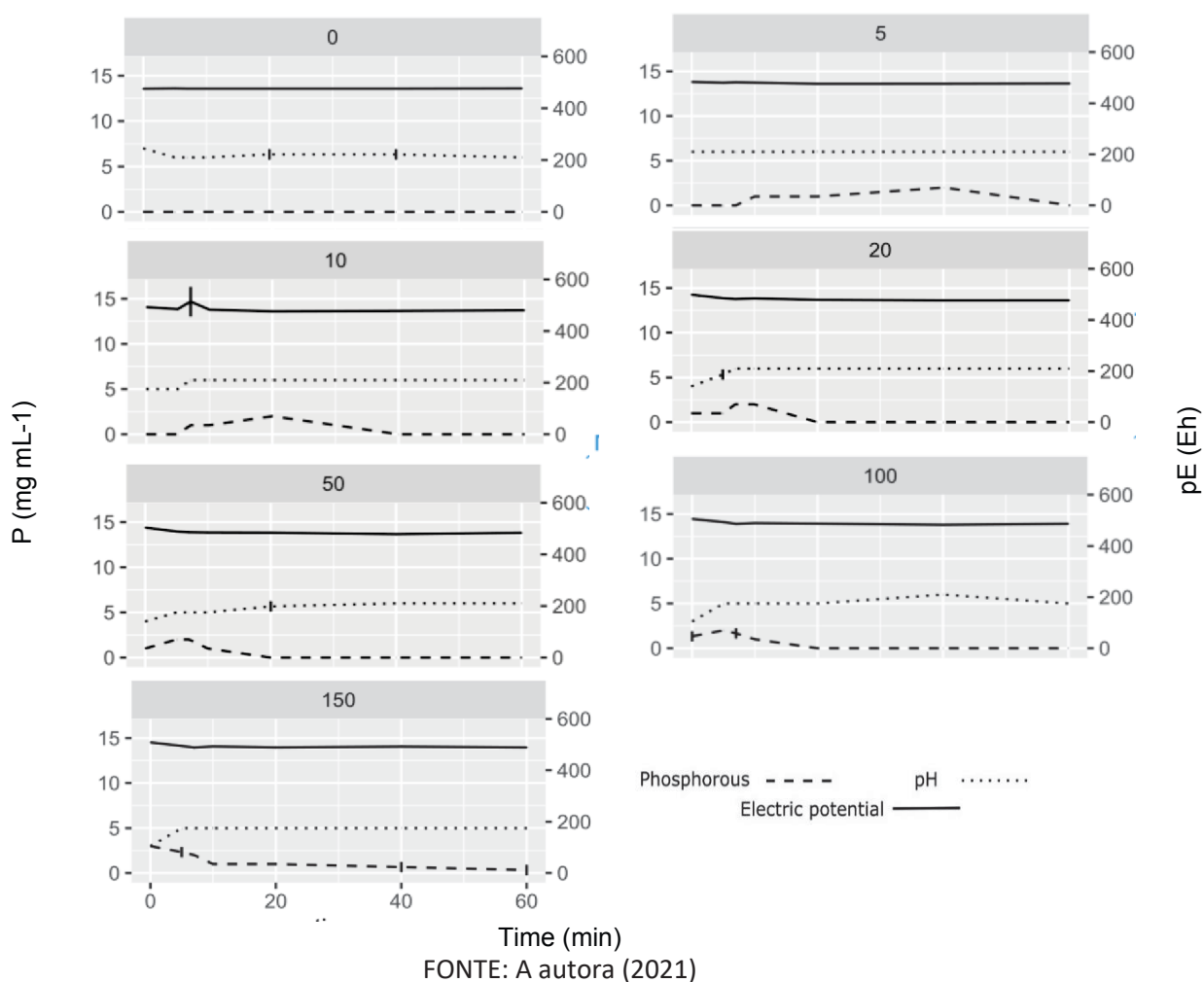
FIGURA 19 - EFICIÊNCIA NA DISSOLUÇÃO DA HIDROXIAPATITA PARA SOLUBILIZAÇÃO DO P, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO MALÔNICO.



FONTE: A autora (2021)

As reações de solubilização pelo ácido oxálico ocorreram em menor tempo (0 - 1 min), na maior concentração do ácido (150 μM). Nessas condições, o valor de pH reduziu para 3,6 (Figura 20). As concentrações de 10, 20 e 50 μM ; 100 e 150 μM não apresentaram diferenças significativas em relação à concentração de P solubilizado.

FIGURA 20 - EFICIÊNCIA NA DISSOLUÇÃO DA HIDROXIAPATITA PARA SOLUBILIZAÇÃO DO P, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO OXÁLICO.

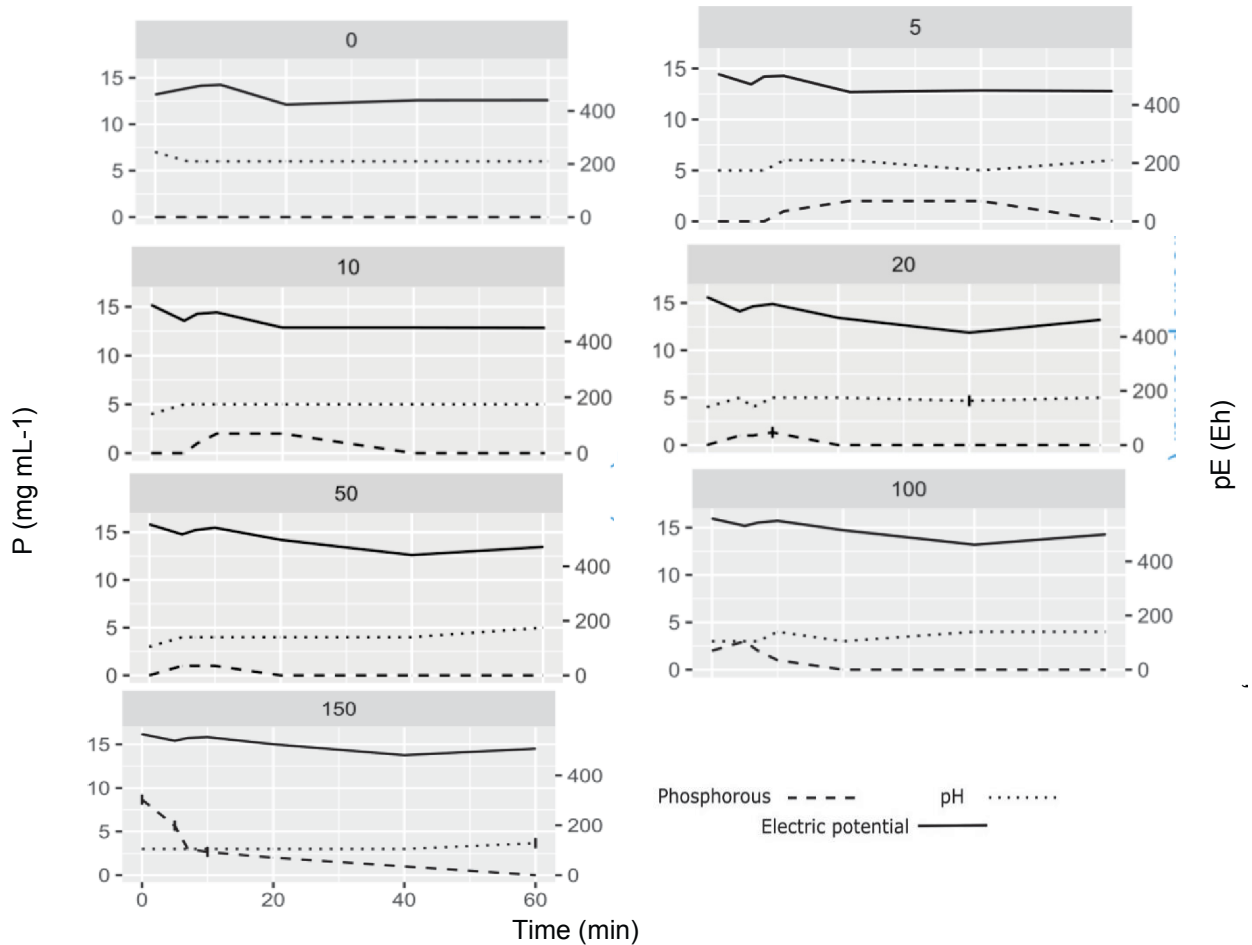


FONTE: A autora (2021)

Dentre os ácidos avaliados, os ácidos fumárico (Figura 21) e cítrico (Figura 22) apresentaram melhor capacidade de solubilização do P no tempo 0 min para a concentração de 150 μM (5,8 e 9,0 mg mL⁻¹, respectivamente).

Para o ácido fumárico na concentração de 5 μM, as concentrações de P para os tempos de 0, 5 e 60 min foram estatisticamente iguais (Figura 21). As maiores concentrações de P para esta concentração foram para os tempos de 20 e 40 min (2,4 e 2,4 mg mL⁻¹, respectivamente). Na concentração de 10 μM do ácido fumárico, a melhor dissolução da HPA ocorreu em tempos menores (10 min: 2,1 mg mL⁻¹ e 20 min: 2,9 mg mL⁻¹). Para a maior concentração do ácido (150 μM) o tempo de reação com maior liberação de P ocorreu nos tempos de 0 min (9,1 mg mL⁻¹) (Figura 21).

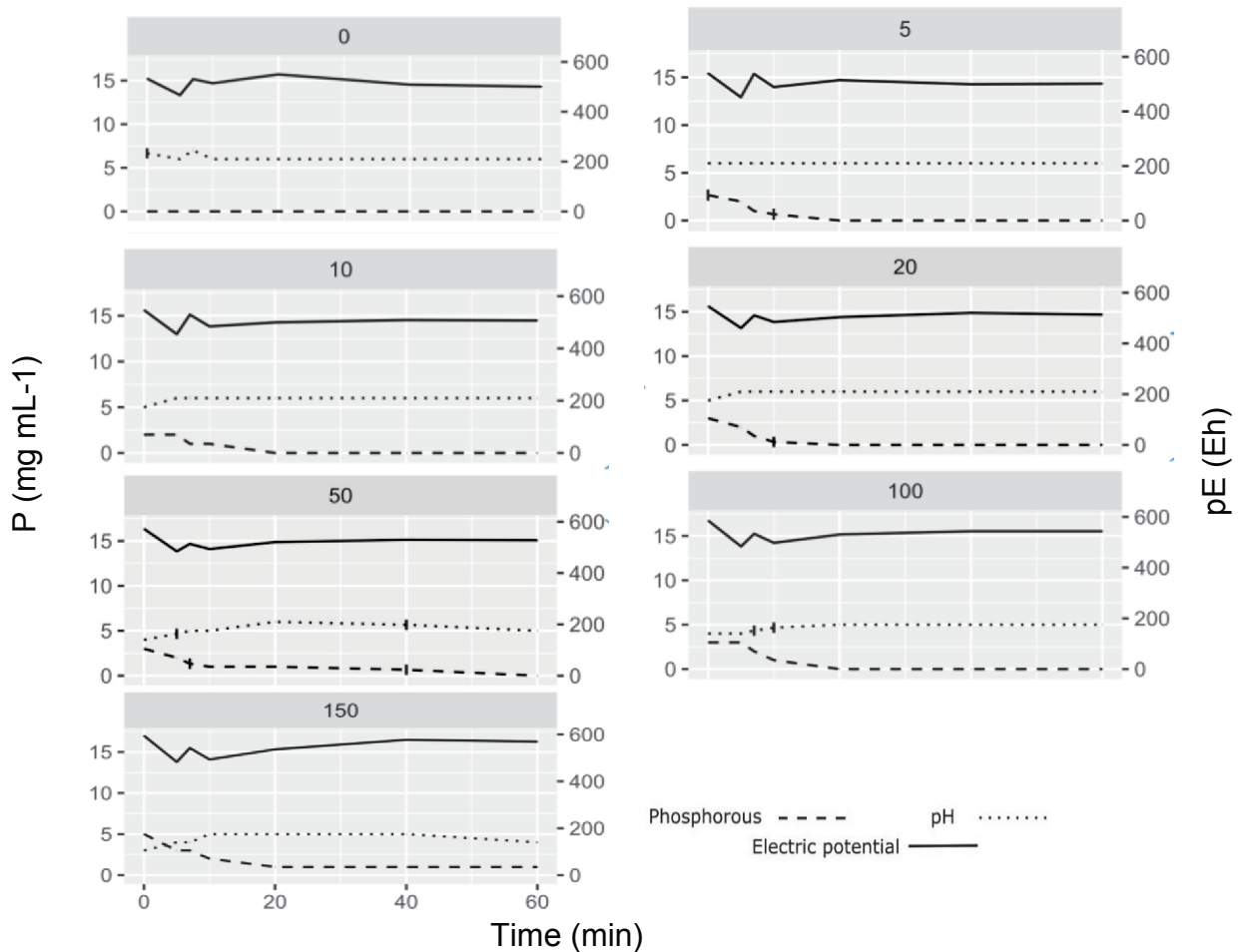
FIGURA 21- EFICIÊNCIA NA DISSOLUÇÃO DA HIDROXIAPATITA PARA SOLUBILIZAÇÃO DO P, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO FUMÁRICO



FONTE: A autora (2021)

Para o tempo de 5 min, não houve diferença estatística na liberação de P entre as concentrações de 5, 10, 20 e 50; 100 e 150 μM do ácido cítrico. Após o tempo de 10 min, a solubilização do P não foi eficiente para nenhuma das concentrações avaliadas, exceto para a concentração de 150 μM (Figura 22).

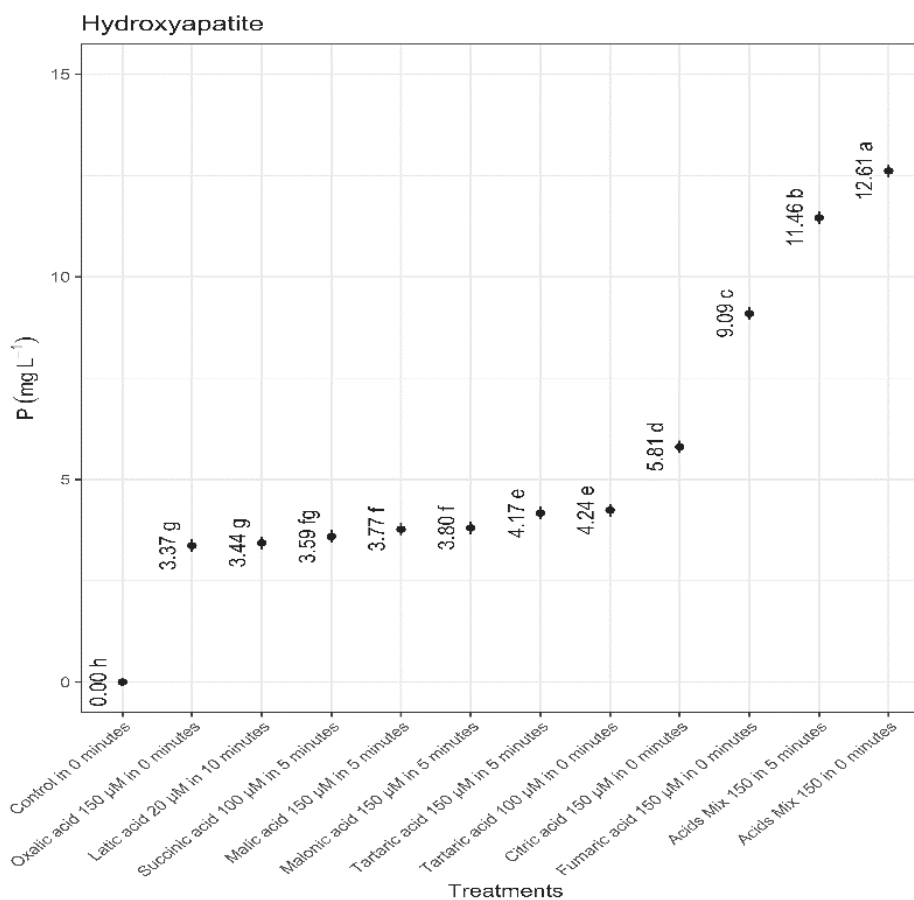
FIGURA 22 - EFICIÊNCIA NA DISSOLUÇÃO DA HIDROXIAPATITA PARA SOLUBILIZAÇÃO DO P, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO CÍTRICO



FONTE: A autora (2021)

Todos os ácidos demonstraram melhor eficiência na solubilização de P em concentrações de 150 μM para tempos inferiores a 5 minutos, exceto para os ácidos succínico, tartárico e láctico (Figura 23). A maior eficiência foi do mix, para os tempos de 0 a 5 min, o que evidencia o efeito sinérgico da mistura dos ácidos. Estudos sobre a dissolução de minerais de apatita demonstram uma forte correlação entre a taxa de solubilização e produção de ácidos orgânicos pelos microrganismos (WALPOLA, YOON, 2013; WANG et al., 2016;).

FIGURA 23 - COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS ÁCIDOS QUE APRESENTARAM MELHOR EFICIÊNCIA EM PROMOVER A DISSOLUÇÃO DA HIDROXIAPATITA E SOLUBILIZAÇÃO DO P



*Letras iguais, não apresentam diferenças entre si aplicando o teste de Tukey a 5% de probabilidade
 FONTE: A autora (2021)

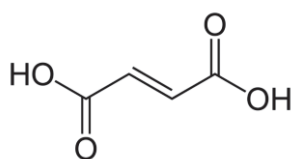
O ácido fumárico, maior eficiência isolada na solubilização da HPA (Figura 23), é dicarboxílico (Figura 24a) (de pKa1 = 3,0 e pKa2 = 4,5). Já o ácido succínico, menor eficiência geral junto com os ácidos oxálico e láctico, também é dicarboxílico (Figura 24b) e apresenta valores de pKa ligeiramente inferiores (pKa1 = 2,2 e pKa2 = 4,0), portanto, a maior acidez desse último ácido não explica sua menor solubilização da HPA. Também suas massas atômicas são muito próximas (fumárico = 116 g mol⁻¹ e succínico 118 g mol⁻¹). Esse comportamento explica-se através da diferenças na estrutura desses dois ácidos (Figura 24). Ambos têm quatro átomos de carbono (Figura 24a,b), mas o ácido fumárico tem uma ligação dupla no interior da cadeia carbônica, o que pode estar promovendo maior complexação dos produtos da solubilização da HPA (principalmente Ca²⁺). Os ácidos málicos e tartárico também são dicarboxílicos, com quatro átomos de carbono (Figuras 24c, d) (distribuição espacial

similar ao ácido succínico) e ficaram em posições intermediárias em relação a dissolução da HPA (Figura 23). Mesmo não apresentando ligação dupla central, como o ácido fumárico (Figura 24a), a vantagem desses ácidos na capacidade de complexação em relação ao ácido succínico (Figura 24b) é a presença de uma (ácido málico – Figura 24c) e duas (ácido tartárico – Figura 24d) hidroxilas ligadas aos átomos centrais da estrutura. Por ter quatro hidroxilas, o ácido tartárico apresentou maior capacidade de dissolução da HPA que o ácido málico (Figura 23).

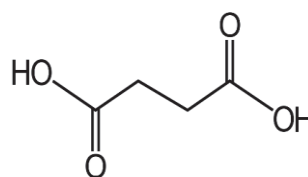
Na segunda posição de eficiência de solubilização da HPA (atrás do ácido fumárico) ficou o ácido cítrico (Figura 23), que tem elevado poder de acidificação e de complexação por ser tricarboxílico ($pK_{a1} = 3,2$, $pK_{a2} = 4,8$ e $pK_{a3} = 6,4$) e com presença de uma hidroxila (Figura 24e).

FIGURA 24 - ESTRUTURA DOS ÁCIDOS FUMÁRICO, SUCCÍNICO, MÁLICO, TARTÁRICO E CÍTRICO.

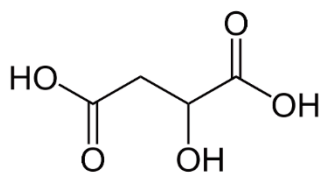
(A) Ácido fumárico



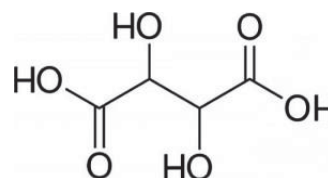
(B) Ácido succínico



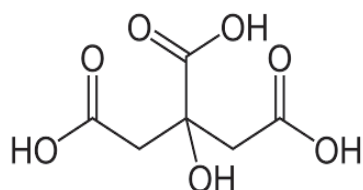
(C) Ácido málico



(D) Ácido tartárico

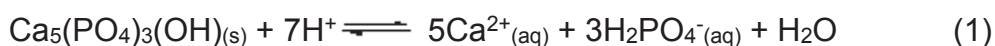


(E) Ácido cítrico



FONTE: A autora (2021)

Com a entrada de ácidos orgânicos secretados pela atividade biológica, a hidroxiapatita irá reagir com os prótons da dissociação dos ácidos e acelerar a dissolução do mineral (Princípio de Châtelier):



Além do deslocamento do equilíbrio químico por acidificação, a complexação do P solubilizado pelos compostos orgânicos acelera e mantém a dissolução da hidroxiapatita.

A troca próton-cátion (Ca^{2+} por H^+) e consumo de H^+ na reação de hidrólise (equação 1) reduz a eficiência do ácido em continuar acidificando o meio, por isso, de maneira geral, o pH do meio tende a subir novamente com o tempo de contato com a HPA (Figuras 15 – 22). O tamponamento do pH segue a dissolução de partículas de menor tamanho e maior área superficial específica (partículas na argila média/fina) seguido pelas partículas na fração silte (diferenças de tamanho das partículas identificadas pela análise em MEV – Figuras 5 e 6).

Estudos de WANG et al. (2016) demonstraram a maior taxa e eficiência de dissolução da hidroxiapatita por ácidos orgânicos de baixo peso molecular no tempo 0 em solução com pH entre 3,60 e 4,79, em decorrência do aporte de prótons provenientes da dissociação dos ácidos. Minutos mais tarde, a dissolução foi representada por um platô, devido a depleção de íons de H^+ e neutralização da solução. Os ácidos fumárico e oxálico apresentam as menores massas molares (Tabela 5).

No solo, o comportamento dos ácidos orgânicos é semelhante ao demonstrado no experimento. Os ácidos orgânicos exsudados pelas células têm uma vida útil muito curta (SHEN et al. 1996), e, portanto, as reações precisam acontecer imediatamente após a sua exsudação, como foi observado no presente estudo. Contudo, se o P solubilizado não for rapidamente absorvido pelas plantas, com a degradação dos exsudados, o P pode seguir caminhos como: precipitação com cátions divalentes, como o Ca^{2+} liberado da estrutura do mineral, reações de complexação na matéria orgânica, adsorção aos óxidos de Fe e Al ou saída do sistema (FINK et al., 2016; SCHLESINGER, BERNHARDT, 2013).

3.3 CONCLUSÕES

Houve expressivo efeito da ação dos microrganismos em solubilizar a HPA e liberar o P estrutural. O tempo de incubação dos microrganismos foi importante para aumentar a dissolução da HPA. O principal mecanismo associado à dissolução da HPA foi a acidificação do meio pelos microrganismos e a maior eficiência foi verificada para o *B. subtilis*.

A acidificação do meio promovida pela liberação de ácidos orgânicos pode contribuir de modo direto e significativo para a dissolução da HPA e liberação de P para a solução. Os ácidos orgânicos diferem em relação à sua eficiência em promover a dissolução da hidroxiapatita e liberação do P. Individualmente, o ácido fumárico foi o mais eficiente na dissolução da HPA.

Por outro lado, os piores resultados foram para os ácidos oxálico e láctico. Verificou-se efeito expressivo da mistura dos ácidos na solubilização da HPA (sinergismo). As reações de dissolução da HPA pelos ácidos orgânicos são rápidas e dependentes da concentração do ácido.

Não houve relação entre a quantidade de sideróforos produzidos e a solubilização da HPA.

REFERÊNCIAS

ADCOCK, C.T., HAUSRATH, E.M., FORSTER, P.M., Readily available phosphate from minerals in early aqueous environments on Mars. **Nat. Geosci.**, vol. 6, 2013

ADELEKE, R.; NWANGBURUKA, C.; OBOIRIEN, B. Origins, roles, and fate of organic acids in soils: A review. **South African Journal of Botany**, v. 108, p. 393–406, 2017.

ADILSON DOS SANTOS HARA, F.; ANTONIO DE OLIVEIRA, L. **Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas***. [s.l: s.n.].

ALORI, E. T.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–8, 2017.

ANDRADE, A. *et al.* The iron uptake mechanisms of enteroinvasive *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 200–205, 2000.

ARAÚJO, J. C. DE; DULCE, G.; SOARES, D. A. Síntese da hidroxiapatita e refinamento estrutural por difração de raios-x. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1853–1859, 2007.

ASH, C. *et al.* Different low-molecular-mass organic acids specifically control leaching of arsenic and lead from contaminated soil. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 187, p. 18–30, 2016.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 43, n. 4, p. 529–535, 2008.

BEHERA, B. C. *et al.* Alkaline phosphatase activity of a phosphate solubilizing *Alcaligenes faecalis*, isolated from Mangrove soil. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, n. 1, p. 101–111, 2017.

BENSALAH, H. *et al.* Azo dye adsorption on an industrial waste-transformed hydroxyapatite adsorbent: Kinetics, isotherms, mechanism, and regeneration studies. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 3, p. 103807, 2020.

BERRAQUERO, F.R.; BAYA, A.M.; CORMENZANA, A.R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, 17(4):399-406, 1976.

BERTAZZO, S., BERTRAN, C.A. Morphological and dimensional characteristics of bone mineral crystals. **Key Eng. Mater.** 309, 3–6, 2006.

BERTRAN, C.A. Hydroxyapatite surface solubility and effect on cell adhesion. **J. Colloids Surf. B** 78, 177–184, 2010.

BERTRAN, C.A., BERTAZZO, S., FARIA, L.P., 2006. Surface charge of hydroxyapatite and bone mineral. **Key Eng. Mater.** 330, 713–716, 2006.

BILLAH, M. *et al.* Phosphorus and phosphate solubilizing bacteria: Keys for sustainable agriculture. **Geomicrobiology Journal**, v. 36, n. 10, p. 904–916, 2019.

BISWAS, P. P. *et al.* Systematic changes of bone hydroxyapatite along a charring temperature gradient: An integrative study with dissolution behavior. **Science of the Total Environment**, n. 21, p. 142601, 2020.

BOUDIA, S. *et al.* Mineralogical transformation during hydroxyapatite dissolution in simple aqueous solutions. **Chemical Geology**, v. 477, n. December 2017, p. 85–91, 2018.

CHAÏRAT, C., SCHOTT, J., OELKERS, E.H., LARTIGUE, J.E., HAROUIYA, N., Kinetics and mechanism of natural fluorapatite dissolution at 25 C and pH from 3 to 12. **Geochim. Cosmochim. Acta** 71, 5901–5912, 2007.

CHAHAL, H. K.; OUTTEN, F. W. Separate FeS scaffold and carrier functions for SufB2C 2 and SufA during in vitro maturation of [2Fe2S] Fdx. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 116, p. 126–134, 2012.

CONZ, M. B.; GRANJEIRO, J.M.; SOARES, G. A. Commercial hydroxyapatites for medical- dental applications as bone graft. **J Appl Oral Sci**, v. 13, n. 2, p. 136–140, 2005.

DE OLIVEIRA-LONGATTI, S. M. *et al.* The culture medium volume and the inoculation method should be considered in semi-quantitative screening of calcium phosphate solubilization by bacteria. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 42, p. 1–5, 2020.

DIPAK, P.; SANKAR, N. S. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential from river Ganga, India. **Annals of Agrarian Science**, v. 15, n. 1, p. 130–136, 1 mar. 2017.

DOROZHKIN, S. V. Dissolution mechanism of calcium apatites in acids: A review of literature. **World Journal of Methodology**, v. 2, n. 1, p. 1, 2012.

DUDEK, A. ADAMCZYK, L. Properties of hydroxyapatite layers used for implant coatings. **Optica applicata**, v. XLIII, n. 1, p. 143–151, 2013.

EL-AZOUNI, I. M. Effect of phosphate solubilizing fungi on growth and nutrient uptake of soybean (*Glycine Max L.*) plants. **Journal of Applied Sciences Research**, Ma'an, v. 4, n. 6, p. 592-598, June 2008.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs (Portugues)**. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/ExpDes.pt/ExpDes.pt.pdf>>. Acesso em: 7 jan. 2021.

FILIPPELLI, G.M. The global phosphorous cycle. **Reviews in Mineralogy**. 48. pp. 391–425, 2002.

FILHO, G. N. S.; VIDOR, C. Solubilização de fostatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Rev. Bras. Ci. Solo** n. 1, p. 311–319, 2000.

GABRIELIAN, L. *et al.* Antibacterial effects of iron oxide (Fe_3O_4) nanoparticles: distinguishing concentration-dependent effects with different bacterial cells growth and membrane-associated mechanisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 6, p. 2773–2782, 2019.

GRAY, J.A., FRANCIS, M.D., GRIEBSTEIN, W.J., 1962. Chemistry of enamel dissolution. In: Sognnaes, R.F. (Ed.), **Chemistry and Prevention of Dental**. 1962.

HARDING, I. S.; RASHID, N.; HING, K. A. Surface charge and the effect of excess calcium ions on the hydroxyapatite surface. **Biomaterials**, v. 26, n. 34, p. 6818–6826, 1 dez. 2005.

HOTHORN, T. *et al.* **multcomp: Simultaneous Inference in General Parametric Models**. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/multcomp/multcomp.pdf>>. Acesso em: 7 jan. 2021.

IVANOVA, R.; BOJINOVA, D.; NEDIALKOVA, K. Rock Phosphate Solubilization By Soil Bacteria. **Chemical Technology**, p. 297–302, 2006.

JONES, D. L. et al. Organic acid behavior in soils - Misconceptions and knowledge gaps. **Plant and Soil**, v. 248, n. 1–2, p. 31–41, 2003.

JORDAN, K. Y. K. G. A. M. D. Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. **Biol Fertil Soils**, v. 24, p. 347–352, 1997.

KAPLAN, J. et al. Iron-dependent metabolic remodeling in *S. cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 7, p. 646–651, 2006.

KAUFMAN, H.W., KLEINBERG, I., 1979. Studies on the incongruent solubility of hydroxyapatite. **Calcif. Tissue Int.** 27, 143–151.

KOSTOV-KYTIN, V. V. et al. Powder X-ray diffraction studies of hydroxyapatite and β -TCP mixtures processed by high energy dry milling. **Ceramics International**, v. 44, n. 7, p. 8664–8671, 2018.

KUMAR, R. et al. Temperature Driven Morphological Changes of Chemically Precipitated Hydroxyapatite Nanoparticles. **Langmuir**, v. 8, n. 18, p. 5196–5200, 2004.

LA MER, V.K. The solubility behavior of hydroxylapatites. **J. Phys. Chem.** 66, 973–978, 1962.

LARSEN, M.J., JENSEN, S.J. The hydroxyapatite solubility product of human dental enamel as a function of pH in the range 4.6–7.6 at 20 °C. **Arch. Oral Biol.** 34, 957–996, 1989.

LENTH, R. v. et al. **emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means**. Disponível em: <<https://github.com/rvlenth/emmeans>>. Acesso em: 7 jan. 2021.

LU, C.; TIAN, H. Global nitrogen and phosphorus fertilizer use for agriculture production in the past half century: shifted hot spots and nutrient imbalance. **Earth Syst. Sci. Data Discuss.** p. 181–192, 2017.

MAFE, S., MANZANARES, J.A., REISS, H., THOMANN, J.M., GRAMAIN, P. Model for the dissolution of calcium hydroxyapatite powder. **J. Phys. Chem.**, v. 96, p. 861–866, 1992.

MAHESWAR, N.; SATHIYAVANI, G. Solubilization of phosphate by *Bacillus* Sps, from groundnut rhizosphere (*Arachis hypogaea* L). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 8, p. 4007–4011, 2012

MARGOLIS, H.C.; MORENO, E. C. Kinetics of Hydroxyapatite Dissolution in Acetic, Lactic, and Phosphoric Acid Solutions. **Calcified Tissue International**, v. 50, p. 137–143, 1992.

MARTINO, E. *et al.* Physical and biochemical interactions of soil fungi with asbestos fibers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 938–944, 2004.

MASSENSINI, A. M. *et al.* Solubilização Potencial de Fosfatos Mediada pela Microbiota Rizosférica de Eucalipto Cultivado em Topossequência Típica da Zona da Mata Mineira. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 39, n. 1, p. 692–700, 2015.

MEHTA, S.; NAUTIYAL, C. S. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. **Current Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 51–56, 2001.

MENDIBURU, F. de. agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/agricolae/agricolae.pdf>>. Acesso em: 7 jan. 2021.

MENDOZA-CÓZATL, D.G./ GOKUL, A.; CARELSE, M.F.; JOBE, T.O.; LONG, T.A.; KEYSTER, M. Keep talking: crosstalk between iron and sulfur networks fine-tunes growth and development to promote survival under iron limitation. **Experimental Biology**, p. 1–31, 2019.

MEYER, G. *et al.* *Pseudomonas protegens* CHA0 does not increase phosphorus uptake from ³³P labeled synthetic hydroxyapatite by wheat grown on calcareous soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 131, n. July 2018, p. 217–228, 2019.

MORENO, E. C.; GREGORY, T. M.; BROWN, W. E. Preparation and solubility of hydroxyapatite. **Journal of Research of the National Bureau of Standards Section A: Physics and Chemistry**, v. 72A, n. 6, p. 773, 1968.

MUKHTAR, S. *et al.* Assessment of two carrier materials for phosphate solubilizing biofertilizers and their effect on growth of wheat (*Triticum aestivum* L.).

Microbiological Research, v. 205, n. August, p. 107–117, 2017.

NARSIAN, V.; ABU, A.; PATEL, S. S. M. H. H. Rock phosphate dissolution by specific yeast. n8. March, p. 57–62, 2010.

NEUMAN, W.F., BAREHAM, B.J.. Evidence for the presence of secondary calcium phosphate in bone and its stabilization by acid production. **Calcif. Tissue Res.** 18, 161–172, 1975.

PATEL, S. *et al.* Transmission electron microscopy analysis of hydroxyapatite nanocrystals from cattle bones. **Materials Characterization**, v. 109, p. 73–78, 2015.

PLANTE, A. F.; STONE, M. M.; MCGILL, W. B. The Metabolic Physiology of Soil Microorganisms. In: ELDOR, E. P. : **Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry** (pp.245-272), Elsevier Inc.: 4ed, Colorado-USA, 2015.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing** VienaR Foundation for Statistical Computing, , 2021. . Disponível em: <<https://cran.r-project.org/>>.

RAKOVAN, J., HUGHES, J.M. (Eds.), Phosphates: Geochemical, Geobiological, and Materials Importance Mineralogical Society of America, **Reviews in Mineralogy**. 48. pp. 391–425, 2002.

REYES, I.; VALERY, A.; VALDUZ, Z. Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. **Plant and Soil**, v. 287, n. 1–2, p. 69–75, 2006.

ROLFE, M. D. *et al.* Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 3, p. 686–701, 2012.

ROOTARE, F. H.M., DEITZ, V.R., CARPENTER, F.G. Solubility product phenomena in hydroxyapatite water systems. **J. Colloid Sci.** 17, 179–206, 1962.

SANTOS, M. L. *et al.* Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. **Ecl.Quimica**, v. 30, p. 29–35, 2005.

SCHMITT, D. E. *et al.* Formation of ternary organic acids-Fe-P complexes on the growth of wheat (*Triticum aestivum*). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 22, n. 10, p. 702–706, 2018.

SCHRODER, J.J.; CORDELL, D., SMIT, A.L., ROSEMARIN, A. **Sustainable Use of Phosphorus**. 1. ed. Wageningen: DLO Foundation, 2010.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal CAS assay for the detection and determination of siderophores. **Anal. Biochem.**, v. 160, p. 47–60, 1987.

SHEN, Y. *et al.* Low-molecular organic acids in the rhizosphere soil solution of beech forest (*Fagus sylvatica* L.) Cambisols determined by ion chromatography using supported liquid membrane enrichment technique. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, n. 9, p. 1163–1169, 1996.

SHI, X. K.; MA, J. J.; LIU, L. J. Effects of phosphate-solubilizing bacteria application on soil phosphorus availability in coal mining subsidence area in shanxi. **Journal of Plant Interactions**, v. 12, n. 1, p. 137–142, 2017.

SOUCHIE, E. L. *et al.* Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido. **Pesq. Agropec. Bras.** v.40 n.11, p. 1149–1152, 2005.

ŠTUMPF, S. *et al.* Generation Times of *E. coli* Prolong with Increasing Tannin Concentration while the Lag Phase Extends Exponentially. **Plants**, v. 9, n. 12, p. 1680, 1 dez. 2020.

SUSILOWATI, L. E.; KUSUMO, B. H.; ARIFIN, Z. Screening of the drought tolerant phosphate solubilizing bacteria in dissolving P-inorganic. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1402, n. 5, 2019.

SVERDRUP, H. Chemical weathering of soil minerals and the role of biological processes. **Fungal Biology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 94–100, 2009.

SWINNEN, I. A. M. *et al.* Predictive modelling of the microbial lag phase: A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 2, p. 137–159, 15 jul. 2004.

SYLVESTER-BRADLEY, R. *et al.* Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 12, n. 1, p. 15–22, 1982.

TEAM RSTUDIO. **RStudio: Integrated Development for R** Boston RStudio, , 2021. .
Disponível em: <<http://www.rstudio.com/>>.

THOMANN, J.M., VOEGEL, J.C., GRAMAIN, P., 1993. Kinetics of dissolution of calcium hydroxyapatite powder IV. Interfacial calcium diffusion-controlled process. **J. Colloid Interface Sci.** 157, 369–374.

USEPA. SW-846 EPA method 3051A. Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils and oils. In: **Test methods for evaluating solid waste**, 3rd Update. Washington: US Environmental Protection Agency, 1998.

VALSAMI-JONES, E. *et al.* The dissolution of apatite in the presence of aqueous metal cations at pH 2-7. **Chemical Geology**, v. 151, n. 1–4, p. 215–233, 1998.

VARGAS, S. *et al.* Dynamic light scattering: A fast and reliable method to analyze bacterial growth during the lag phase. **Journal of Microbiological Methods**, v. 137, p. 34–39, 1 jun. 2017.

WALPOLA, B. C., AND YOON, M.-H. Phosphate solubilising bacteria: assessment of their effect on growth promotion and phosphorus uptake of mung bean (*Vigna radiata* L.). **Chil. J. Agric. Res.** 73, 275–281, 2013.

WANG, D. *et al.* Effects of low-molecular-weight organic acids on the dissolution of hydroxyapatite nanoparticles. **Environmental Science: Nano**, v. 3, n. 4, p. 768–779, 2016.

WANG, H. *et al.* Improvement of menaquinone-7 production by *Bacillus subtilis* natto in a novel residue-free medium by increasing the redox potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 18, p. 7519–7535, 2019.

WANG, J. Incorporation of iodine into apatite structure: A crystal chemistry approach using Artificial Neural Network. **Frontiers in Earth Science**, v. 3, n. June, p. 1–11, 2015.

WEI, W. *et al.* Interaction between low molecular weight organic acids and hydroxyapatite with different degrees of crystallinity. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 392, n. 1, p. 67–75, 2011.

WU, Q.; BISHOP, P. L.; KEENER, T. C. Biological Phosphate Uptake and Release: Effect of pH and Magnesium Ions. v. 78, n. 2, 1999.

ZHANG, B. *et al.* Phosphorus mediates soil prokaryote distribution pattern along a small-scale elevation gradient in Noijin Kangsang Peak, Tibetan Plateau. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 95, n. 6, p. 1–12, 2019.

ZÚÑIGA-SILGADO, D. *et al.* Soil type affects organic acid production and phosphorus solubilization efficiency mediated by several native fungal strains from Mexico. **Microrganisms**, v. 8, n. 9, p. 1–17, 2020.

4 CAPÍTULO 3: DESSORÇÃO DO P ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA NA GOETHITA POR MECANISMOS MICROBIOLÓGICOS

4.1 RESUMO

A expansão da agricultura tem aumentado a demanda por fertilizantes minerais, principalmente fontes de nitrogênio (N) e fósforo (P). Como a maior parte do P do solo é temporariamente/permanentemente é fixado (adsorção por esfera interna) na superfície dos óxidos de Fe e Al, o uso de bactérias solubilizantes de P, pode ser uma alternativa para aumentar a disponibilidade deste nutriente. O presente trabalho objetivou verificar a eficiência de microrganismos na liberação das formas fixadas (esfera interna) de P nos óxidos de Fe (goethita) por meio de acidificação e produção de sideróforos. Para isso, a goethita foi sintetizada e saturada com P por adsorção por esfera interna. A solubilização do P por *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp. *P. crassa*, *S. cerevisiae* e *E. coli* foram avaliados através do índice de solubilização (IS) durante o crescimento em meio sólido e cultivadas em meio líquido sob os seguintes tratamentos: Controle (sem P), com KH_2PO_4 e com goethita em duas doses. A eficiência na dessorção de P está relacionada com o crescimento dos microrganismos em meio líquido e foi dependente do tempo de contato com a goethita e da acidificação do meio, promovida pela atividade dos microrganismos. Não ocorreu dessorção do P no meio sólido. A espécie que promoveu maior dessorção do P (*Bacillus subtilis*) apresentou menor produção de sideróforos que os fungos leveduriformes (*S. cerevisiae* e *P. crassa*). As menores concentrações e tempo de contato dos ácidos orgânicos foram mais eficientes na dessorção do P da goethita. A mistura de todos os ácidos orgânicos foi mais eficiente da dessorção do P (efeito sinérgico). Individualmente, o ácido fumárico apresentou os melhores resultados. Definiu-se uma hipótese combinada da ação dos ácidos orgânicos na dessorção do P da goethita: efeito de protonação da superfície do mineral e troca de ligantes entre o ácido orgânico dissociado e o fosfato adsorvido por esfera interna.

Palavras- chave: Ciência do Solo 1. Mineralogia 2. Fosfato 3. Goethita 4. Microbiologia 5.

4.2 ABSTRACT

The expansion of agriculture has increased the demand for mineral fertilizers, mainly nitrogen (N), phosphorus (P) sources. As the major amount of P is temporarily/permanently fixed (adsorption by inner sphere complex) on the surface of Fe and Al oxides, the use of P solubilizing bacteria can be an alternative to increase the nutrient availability. The present work aimed to verify the microorganisms efficiency in promote the release from of P bonded on iron oxides by inner sphere complexes through the mechanisms of acidification and siderophores production. For this, the goethite was synthesized and saturated with P to form the adsorption of inner sphere complexes. In the experiment, the P desorption by *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp. *P. crassa*, *S. cerevisiae* e *E. coli*, were evaluated through the solubilization index (IS) during microbial growth in solid and liquid medium under the following treatments: Control (without P), with KH_2PO_4 and with goethite in two doses. The efficiency in promoting P desorption is related to the microbial growth in the liquid medium. The desorption of the adsorbed P was dependent on the time of contact with the goethite and the acidification of the medium, promoted by the activity of the microorganisms. P desorption was dependent of time and the acidification of the medium, promoted by microorganisms activity. In the solid medium wasn't possible to verify any P desorption. The specie that promoted the highest P desorption from goethite (*Bacillus subtilis*) showed fewer siderophores production when compared to fungi (*S. cerevisiae* e *P. crassa*). The experiment with organic acids, demonstrated that the lower concentrations and contact time of organic acids were more efficient in the desorption of P from goethite. The mix of all organic acids were more efficient in P desorption (synergic effect) to the lower concentrations and contact time. Individually, fumaric acid showed the best results. Was defined a new hypothesis for P desorption by organic acids mechanism: Protonation of mineral surface and ligand exchange between the dissociated organic acids and the phosphate bonded by inner sphere on the mineral surface.

Keywords: Soil Science 1. Mineralogy 2. Phosphate 3. Goethite 4. Microbiology 5.

4.3 INTRODUÇÃO

A expansão das áreas agricultáveis não só no Brasil, mas no mundo, tem aumentado a demanda por fertilizantes químicos. O Brasil é considerado um dos maiores consumidores de fertilizantes importando do total mundial (4,1% do N, 10,1% do P e 11,7% do K). A demanda brasileira por P e K pode estar relacionada a fatores intrínsecos da classe de solo predominante no país, o Latossolo. Esta classe apresenta como características maior intemperização, acidez potencial elevada, baixa saturação de bases e baixa disponibilidade de nutrientes (GUEDES et al., 2016)

Solos tropicais altamente intemperizados tendem a apresentar alta capacidade de fixação de P (adsorção por esfera interna), tornando-o indisponível para as plantas (ANDA et al., 2008; EBERHARDT et al., 2008; NEGASSA et al., 2008; PARDO, GUADALIX, GARCIA-GONZALES, 1992). Embora sejam usadas técnicas de manejo, como a adubação com fontes solúveis de P nos sulcos de semeadura e incremento da matéria orgânica no solo a fim de minimizar a adsorção por esfera interna do nutriente, não se tem ainda, uma proteção eficiente do P disponível, principalmente em Latossolos (BORGGAARD et al., 1990; FINK et al., 2016; FONTES; WEED, 1996).

Óxidos e hidróxidos de Fe e Al são minerais centrais no processo de fixação do P (BARROW, 1983; GÉRARD, 2016; PARFITT, 2019; WEI et al., 2014). Uma vez que a magnitude destes eventos se relaciona com a quantidade de grupos aluminol (-AlOH) e ferrol (-FeOH) na superfície dos minerais, solos com elevada concentração de óxidos tenderão a fixar mais P (GÉRARD, 2016).

Dentre os óxidos de Fe, a goethita é mais abundante na fração argila dos solos brasileiros. Sua estrutura é formada de uma rede dupla de octaedro de $\text{FeO}_3(\text{OH})_3$ no eixo z. Os espaços justapostos nesta rede ficam vazios, em decorrência do Fe^{3+} ocupar apenas metade destes espaços; cada rede dupla encontra-se ligada uma à outra por compartilhamento de oxigênios apicais. O segundo óxido de Fe mais abundante na fração argila é a Hematita (hm), estruturalmente consiste em camadas de O sobrepostas no eixo z, com Fe^{3+} , ocupando cerca de 66% de todo octaedro formado, com compartilhamento de faces na camada superior (BARRON et al., 1990; BIGHAM et al., 2002; GÉRARD, 2016).

A adsorção específica nos óxidos de Fe e na gibbsita é dada pela troca de ligante H_2PO_4^- e os grupo $\text{OH}^{-1/2}$ ou $\text{OH}_2^{+1/2}$, na superfície dos minerais (BARRON et

al., 1990). Segundo ROLIM NETO et al. (2004) a adsorção ocorre de acordo com ordem de prevalência dos seguintes minerais: argila 2:1 < argila 1:1 < óxidos cristalinos de Fe e Al < óxidos amorfos de Fe e Al.

O P adsorvido por esfera externa aos óxidos de Fe e Al é prontamente disponível para as plantas. O fator capacidade de P, também conhecido como capacidade de tamponamento do fosfato, é definido pela relação entre quantidade de P adsorvido (esferas externas e interna) e P na solução, indicando a capacidade do solo em manter uma concentração constante de P na solução. Na Figura 1 são mostrados os compartimentos do P associado a um óxido de Fe. As características mineralógicas da fração argila delimitam a velocidade na qual o P se tornará lábil (adsorção por esfera externa), ou não lábil (adsorção por esfera interna). O P coordenado aos óxidos de Fe e Al, formando complexo de esfera interna, dificilmente volta a ser dessorvido, uma vez que a energia necessária para desfazer esta ligação deve ser alta (EBERHARDT et al., 2008; JONES et al., 2015).

Estudos realizados com microrganismos, com potencial de solubilização (PSM) (AHMED et al., 2016; ALORI; GLICK; BABALOLA, 2017; BROWNING et al., 2017; IVANOVA et al., 2006; MENEZES-BLACKBURN et al., 2016; RODRIGUEZ, 2000; SASHIDHAR; PODILE, 2010; SHARMA et al., 2013; WEBER et al., 2006), têm estabelecido sua importância em relação a solubilização de formas inorgânicas de P, demonstrando que sua utilização pode ser uma alternativa para o aumento da disponibilidade de P na solução do solo. Contudo, os experimentos realizados restringem-se ao processo de solubilização, principalmente de fosfatos de Ca, e não ao processo de dessorção do P não lábil, sendo realizados através da inoculação de bactérias em plantas ou sobre a mobilização do P em meio líquido ou ágar. Poucos estudos quantificam e caracterizam o processo de dessorção sob condições de solos brasileiros, ou ainda apontam claramente quais os mecanismos microbiológicos utilizados para mediar a dessorção do P ligado aos óxidos de Fe e Al por complexo de esfera interna.

microbiológicos mais específicos de dessorção (FINK et al., 2016; SILVA FILHO, VIDOR, 2001).

Como o comportamento dos microrganismos diverge grandemente, uma vez que bactérias têm maior habilidade para colonizar raízes de plantas e fungos são mais tolerantes à acidez (PUENTE et al., 2009), estudos mais detalhados são necessários a fim de definir os mecanismos de reversão da adsorção específica do P em óxidos de Fe (BARROSO; NAHAS, 2008; ÇAKMAKCI et al., 2007; JONES et al., 2015; SASHIDHAR; PODILE, 2010; SRIVIDYA et al., 2014). Esses estudos são importantes para solos oxidicos, a fim de minimizar futuramente o impacto da escassez de fertilizantes fosfatos na produção de alimentos no país.

O presente trabalho possui objetivo de verificar a eficiência de microrganismos na liberação das formas fixadas (esfera interna) de P nos óxidos de Fe (goethita) por meio de acidificação e produção de sideróforos.

As seguintes hipóteses foram estudadas através do presente experimento:

- (1) A dessorção do P fixado aos óxidos de Fe é mediada pela atividade metabólica dos microrganismos.
- (2) A produção de ácidos orgânicos pelos microrganismos contribui para a dessorção do P fixado na goethita através da acidificação.
- (3) A produção de sideróforos pelos microrganismos promove a dessorção do P fixado na goethita através do mecanismo de troca de ligantes.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1. Síntese da goethita

Para síntese da goethita foram preparadas duas soluções utilizando água ultra pura (18,2 MΩ.cm a 25°C - Millipore Direct-Q System): (A) 100 mL de FeCl₃.6H₂O 1,0 mol L⁻¹, e (B) 180 mL de KOH 3,5 mol L⁻¹. A solução A foi transferida para um becker, e a adição da solução B para o mesmo recipiente foi feito de forma lenta e sob vigorosa agitação com bastão de vidro. A solução composta resultante foi diluída inicialmente em 1000 mL com água ultrapura e o volume ajustado para 2000 mL, sob agitação.

Após homogeneização, o becker contendo a solução resultante foi fechado e colocado em estufa sob temperatura constante de 70 °C durante 72 h. Decorrido o tempo de incubação em estufa, houve decantação do material sólido e a solução sobrenadante foi descartada. Em seguida, adicionou-se 200 mL de água ultra pura para lavagem do material sólido. O pH do meio foi ajustado para 7,5 com o auxílio de HCl 1,0 mol L⁻¹ ou de NaOH 1,0 mol L⁻¹. Esse pH viabilizou a floculação do material sólido, que foi transferido para tubos de centrifuga de 180 mL para centrifugação a 3000 rpm por 15 min, descartando-se a solução sobrenadante. O processo de lavagem foi repetido por oito vezes (CORNELL; SCHWERTMANN, 2003)

O produto foi seco em estufa a 40 °C por 24 h. Cada processo de síntese produziu cerca de 5 g do material (Figura 2). Posteriormente as amostras foram maceradas, com auxílio de graal e pistilo de porcelana, e peneiradas em peneiras de 0,02 mm de malha.

A reação de síntese da goethita pode ser expressa através da seguinte equação:

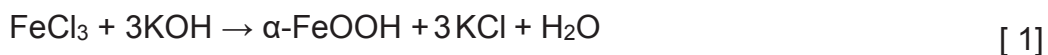


FIGURA 2-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD2-GOETHITA SINTETIZADA, SECA E MOÍDA



FONTE: A autora (2021)

4.4.2 Concentração da goethita

A remoção de resíduos da síntese e purificação da goethita foi realizada pelo método do oxalato de amônio ((NH₄)₂C₂O₄·H₂O) na ausência de luz (McKEAGUE, 1966).

Antes do preparo das soluções e da realização do procedimento, todo o material foi devidamente protegido da luz, através do uso de folha metalizada. O pH da solução de oxalato de amônio 0,2 mol L⁻¹ foi ajustado em 3,0. Cerca de 3 g de goethita foram pesados e transferidos para tubo de centrífuga na presença de 75 mL da solução de oxalato de amônio. Os tubos foram colocados em agitador orbital por 2 h sob rotação de 250 rpm.

As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 min e o sobrenadante descartado. As amostras foram transferidas para membrana de diálise, que foram dispostas em bandejas com 4 L de água ultrapura a fim de remover o excesso de sais. A troca da água foi realizada por 10 dias com intervalo de troca de 24 h. Logo após esse procedimento, as amostras foram transferidas para estufa a 40 °C por 24 h.

4.4.3 Saturação das amostras com H₂PO₄⁻

Para o processo de saturação foi preparada solução com concentração de P de 40.000 mg L⁻¹, usando o sal KH₂PO₄. O pH da solução foi ajustado para 5,0 com o auxílio de HCl 1,0 mol L⁻¹ ou de NaOH 1,0 mol L⁻¹.

Cerca de 2 g de goethita purificada (total de 60 repetições) foram transferidos para tubos de polietileno com tampa, na presença de 50 mL da solução de P na concentração de 40.000 mg L⁻¹. O material foi submetido à agitação por um ciclo de 140 h em agitador orbital a 400 rpm. A medição do pH foi realizada a cada 12 h após um intervalo de repouso de 3 h. Esses procedimentos resultaram em amostras altamente saturadas com P (1.000 g de P kg⁻¹ de amostra). Esse excesso de P foi para garantir a saturação de todos os sítios de adsorção por esfera interna da goethita.

Após o ciclo de saturação, as amostras foram floculadas ajustando-se o pH a 7 com o auxílio de HCl 1,0 mol L⁻¹ ou de NaOH 1,0 mol L⁻¹ e submetidas à centrifugação a 3000 rpm por 15 min.

O material foi transferido para membrana de diálise a fim de retirar o excesso de sais (principalmente o H₂PO₄⁻ solúvel) por 20 dias, com renovações diárias da água

(Figura 3). Ao final do período de lavagem em diálise, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 min e o material sólido seco em estufa a 40 °C por 24 horas, moído, tamizado em malha de 0,02 mm e homogeneizado.

FIGURA 3-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD3 - DIÁLISE EM BANDEJAS DAS AMOSTRAS DE GOETHITA SATURADAS COM P



FONTE: A autora (2021)

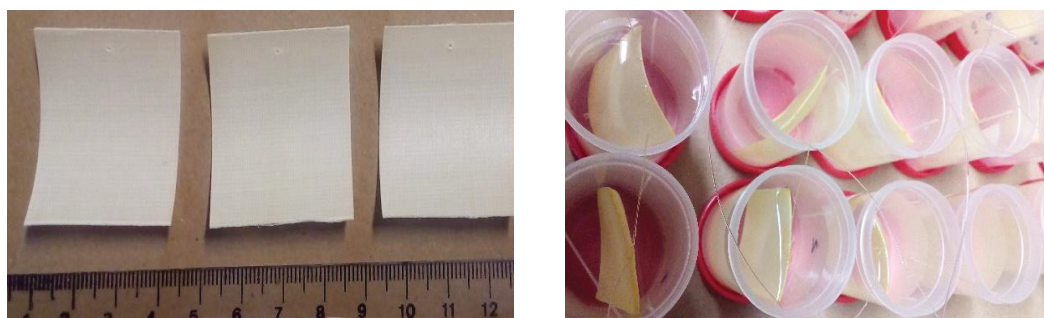
4.4.4 Remoção do p solúvel residual e do p adsorvido por esfera externa

4.4.4.1 Funcionalização da resina trocadora de ânions (RTA)

A fim de remover o H_2PO_4^- solúvel residual e adsorvido por esfera externa das amostras (Figura 1) foi utilizado o método da resina de trocadora de ânions (RTA) (MCKEAN, WARREN, 1996; RHEINHEIMER *et al.*, 2000 - com adaptações). A resina utilizada para o experimento foi a AR 103 QDP 434 (Ionics Inc.)

A resina foi cortada em placas no tamanho de 5 x 3 cm (15 cm²) e colocada em tubo de polietileno com tampa, contendo Resina Trocadora de Ânions. O conjunto foi agitado por 2 h em agitador orbital a 200 rpm (Figura 4).

FIGURA 4-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD4 - FUNCIONALIZAÇÃO DA RESINA TROCADORA DE ÂNIONS



FONTE: A autora (2021)

Logo após essa etapa, as placas da resina foram recuperadas e agitadas a 200 rpm por 2 h com 40 mL de HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e finalmente lavadas com 40 mL de água ultrapura por 1 h, sob as mesmas condições de agitação. A funcionalização da resina foi feita após cada ciclo de extração do P adsorvido por esfera externa.

4.4.4.2 Extração com a resina funcionalizada

Foram pesados 2 g de goethita (total de 60 repetições) em tubos de polietileno de centrifuga de 180 mL com 100 mL de água ultrapura e a placa de 15 cm^2 da resina. O conjunto foi agitado por 16 h a 300 rpm.

Após este período, foram realizados os seguintes procedimentos: (1) resgate da resina e lavagem com água ultrapura dentro do próprio tubo para retirada do excesso de amostra sólida aderida à sua superfície; (2) transferência da resina para tubo de polietileno contendo 50 mL de HCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para recuperação do H_2PO_4^- adsorvido à resina; (3) verificação visual da presença de P desorvido da resina (desenvolvimento de cor azul) pelo método colorimétrico do molibdato e ácido ascórbico e; (4) centrifugação do material sólido a 3000 rpm por 15 min para realização da próxima etapa de extração com a resina. Todo o processo foi realizado em 700 ciclos para cada amostra.

4.4.4.3 Extração com Mehlich 1

Foi realizada também extração de P com o Mehlich 1 (H_2SO_4 $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ e HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$) nas amostras previamente submetidas à extração com a resina.

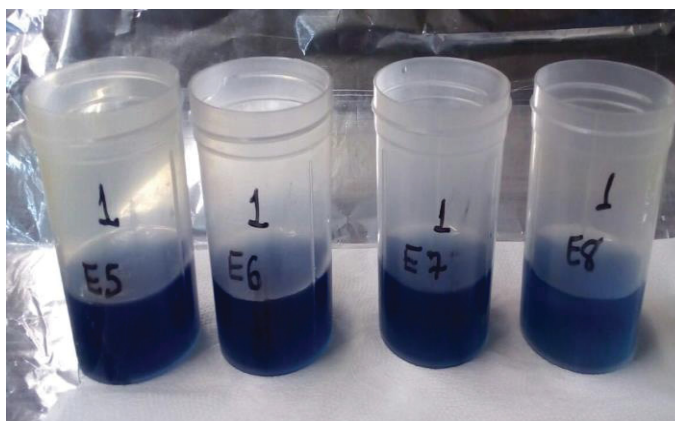
Foram colocados em tubo de polietileno 2 g de goethita contendo 100 mL do extrator Mehlich 1. A suspensão foi agitada a 400 rpm por 10 min e centrifugação a 3000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi descartado, e o material decantado novamente submetido à novo ciclo de extração com Mehlich 1. Foi utilizado um total de 160 ciclos de extração com Mehlich 1 para cada uma das amostras.

Os sobrenadantes foram recolhidos para leitura do P em espectrofotômetro UV-VIS pelo método colorimétrico do molibdato e ácido ascórbico (Figura 5). Na última extração com Mehlich 1 o teor de P no sobrenadante foi inferior a $0,10 \text{ mg L}^{-1}$. Ao final dos ciclos de extrações, as amostras foram secas em estufa a 40°C por 24 h, moídas, tamizadas em malha de 0,02 mm e homogeneizadas e conduzidas para caracterização.

Existe um tamponamento entre as formas de P que interagem com a goethita (Figura 1). A resina extrai primeiro o P solúvel, que é instantaneamente tamponado pelo P adsorvido por esfera externa. Com o grande número de extrações com a resina (700 ciclos) e posterior extrações com Mehlich-1 (160 ciclos), parte do P mais lábil (ligações monodentada) adsorvido por esfera interna também deve ter sido desorvido.

Com a continuidade desse processo, espera-se que apenas as formas mais estáveis de P adsorvido por esfera interna (p. ex. adsorção bidentada – Figura 1) tenha resistido às extrações com a resina e com o Mehlich 1. Esse intenso processo de extrações visou garantir que o P adsorvido por esfera interna à goethita apresentasse alta energia de ligação para efetivamente verificar a capacidade dos microrganismos em quebrar essas ligações e solubilizar o P não lábil.

FIGURA 5-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD5 - AMOSTRAS PREPARADAS COM MOLIBDATO – ÁCIDO ASCÓRBICO, APÓS EXTRAÇÃO COM RESINA.



FONTE: A autora (2021)

4.5 DETERMINAÇÃO DO P ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA DAS AMOSTRAS SUBMETIDAS AOS CICLOS DE EXTRAÇÕES COM RESINA E MELHLICH 1.

4.5.1 EPA 3052 (HNO₃/HF) - Teores totais de P (USEPA, 1998)

O material foi pesado (0,3005 g) e transferido para tubo de teflon contendo 2 mL de HF e 9 mL de HNO₃ concentrados. Os tubos foram selados e mantidos em um forno de microondas (Mars Xpress 6, CEM) por 5,5 min para aumentar a temperatura para 180°C, atingindo uma pressão máxima de 16 atm por 4,5 min de digestão com temperatura e pressão constantes.

O teor de P no extrato determinado por colorimetria UV-VIS pelo método colorimétrico do molibdato e ácido ascórbico.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DA GOETHITA SINTETIZADA

4.6.1 Área superficial específica

Determinou-se a área superficial específica (ASE) da goethita natural, tratada com oxalato de amônio e saturada com P pelo método BET (Brunauer-Emmett-Teller) por adsorção por N₂, utilizando-se o equipamento Quantachrome™ Nova Stacion C 4000e Surface Area e Pore Analyzer e o software Nova Win.

Para isto, foram pesados 0,1007 g de cada amostra e transferidas para tubos e levados para as estações a fim de serem degasadas por 8 horas à 60°C (pressão relativa de 0,05 – 0,30 atm).

4.6.2 Difração de raios x (DRX)

As amostras de goethita purificada (tratada com oxalato de amônio) e a saturada com P foram peneiradas em malha de 0,2 mm e analisadas por DRX pelo método do pó. Os difratogramas foram obtidos em aparelho da marca PAN Analytical, modelo X'pert3 Powder, dotado de Detector Xcelerator Scientific e com fonte de radiação de Cu K α numa amplitude de 4 a 70 °2 Θ , operando a 40mA e 40kV. O amostrador utilizado foi o Spinner e o software de leitura e tratamento de dados o XRD Data Collection Software e High Score Plus (PAN Analytical).

4.6.3 Microscopia eletrônica de varredura acoplada a espectroscopia por energia dispersiva (MEV-EDS)

As amostras de goethita sem saturação e saturadas com P foram estudadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) modelo Tescan Vega 3 com detector de raios X por dispersão de energia (EDS). As análises elementares foram realizadas por equipamento Oxford X-Max50 com detector de raios X de silício com precisão de até 1%. O aparelho foi operado com energia de 15 kV e distância de trabalho de 15 mm.

4.6.4 Espectroscopia de Infravermelho

As análises por infravermelho foram realizadas no espectrômetro VERTEX 70. O espectro foi obtido por refletância difusa de 4000 a 400 cm⁻¹ (região do

infravermelho médio), com resolução de 4 cm^{-1} . Os dados espectrais foram registrados em modo de reflectância (R).

4.7 EXPERIMENTOS MICROBIOLÓGICOS PARA DESSORÇÃO DO P ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA À GOETHITA

4.7.1 Preparação dos inóculos

Conforme descrito no capítulo 2, *item 3.3.1*.

4.7.2 Análise da eficiência dos microrganismos para dessorção do P em meio líquido

Conforme descrito no capítulo 2, *item 3.3.2*, exceto para o mineral e massa utilizados nos tratamentos:

As massas de goethita utilizadas para os tratamentos foram definidas em função dos teores totais de P e dos teores de P no meio de cultura com a adição da fonte solúvel KH_2PO_4 , conforme descrição no capítulo 2. O teor total médio de P da goethita usado nos cálculos foi 571,8 mg kg^{-1} .

Para os ensaios com a Goethita, foram empregados os seguintes microrganismos: *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Pseudozyma crassa*, *Escherichia coli*.

Os tratamentos consistiram em:

1. **Controle negativo:** Meio líquido com adição de KH_2PO_4 como fonte de P e não inoculado;
2. **Controle negativo:** Meio líquido com adição de GOE 1x como fonte de P e não inoculado;
3. **Controle negativo:** Meio líquido com adição de GOE 3x como fonte de P e não inoculado;
4. **Grupo controle:** Meio líquido sem adição de fonte de P e inoculado.
5. **Fonte de P-solúvel (KH_2PO_4):** Meio líquido com adição de KH_2PO_4 como fonte de P e inoculado;
6. **GOETHITA (GOE1):** Meio líquido com adição de GOE 1 (3,96 g L^{-1}) como fonte de P e inoculado;
7. **GOETHITA (GOE 3):** Meio líquido com adição de GOE 3 (11,88 g L^{-1}) como fonte de P e inoculado;

Como a solubilidade do P da goethita é inferior à do KH_2PO_4 , no tratamento GOE 3 colocou-se quantidade de P 3 vezes superior à quantidade adicionada com a fonte solúvel. Os tratamentos foram avaliados nos tempos de 0, 168 e 336 h. Cada tratamento teve três repetições ($n=10$). Para demonstrar a reprodutibilidade da técnica, o experimento foi repetido 2 vezes no tempo.

4.7.3 Análise da eficiência dos microrganismos para dessorção do P em meio sólido

Para este item foram mantidas as mesmas condições, conforme descrito no capítulo 2, *item 3.3.3*, exceto para o mineral e massa utilizados para composição do meio NBRIP.

Como fonte de P foram acrescentadas para cada microrganismo, no preparo de 1 L de em seus respectivos meios: (1) 1,0 g de goethita; (2) 5 mL de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ preparada da seguinte forma: 100 mL de solução contendo 5,0 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 50 mL contendo 0,05 g de KH_2PO_4 , as quais foram autoclavadas separadamente.

Pela relação de peso atômico do P e massa molar do sal ($31/136 = 0,227$), chega-se à quantidade de 0,01135 g de P ($0,227 \times 0,05$ g) ou 11,35 mg de P em 50 mL. Como passou para um balão de 150 mL (mistura com 100 mL da solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) houve uma diluição de 3 vezes ($11,35/3 = 3,78$ mg de P). Ao final, houve uma diluição extra de 200 vezes ($1000 \text{ mL}/5 \text{ mL}$), o que resulta em uma concentração final de P em 1 L do meio de cultura de $0,0189 \text{ mg P L}^{-1}$ ($3,78/200$). Considerando que o teor de P da goethita é de $571,8 \text{ mg kg}^{-1}$, a adição de $1 \text{ g goethita L}^{-1}$ equivale à concentração de $0,5718 \text{ mg P L}^{-1}$ de meio de cultura. Com isso, a relação usada do P da fonte insolúvel goethita em relação a fonte solúvel KH_2PO_4 foi de 30 vezes ($0,5718/0,0189$). Essa relação alta foi para favorecer a formação de halo de crescimento no meio sólido para permitir a distinção entre os microrganismos na capacidade de dessorver o P adsorvido por esfera interna.

4.7.4 Análise da produção de sideróforos

Conforme descrito no capítulo II, *item 3.3.4*.

4.7.4.1 Preparo do Chromo-Azurol

Conforme descrito no capítulo II, *item 3.3.4.1*.

4.7.4.2 Validação da metodologia para detecção dos sideróforos

Conforme descrito no capítulo II, *item 3.3.4.2*

4.7.4.3 Eficiência em dessorção do P pelos sideróforos

Conforme descrito no capítulo II, *item 3.3.4.3*, com exceção do mineral e massa utilizado: para avaliação dos meios para avaliação da produção de sideróforos com o mineral goethita foi adicionado aos seus respectivos meios, 1 g de goethita.

Todos os experimentos foram repetidos ao menos cinco vezes. Os dados foram apresentados através de suas médias e as curvas de crescimento foram monitoradas em triplicata.

As culturas foram previamente lavadas a fim de não transportarem ferro do meio de cultura anterior e dessa forma não inibirem a produção de sideróforos. Após serem lavadas as células reinoculadas no meio sem ferro. Uma alíquota de 100 μL foi retirada do meio reinoculado e quantificado utilizando-se o ICP-OES e o limite ficou abaixo do detectado pelo método utilizado (0.09 mg L^{-1}).

4.7.5 Eficiência em dessorção do P pelos ácidos orgânicos

Conforme descrito no capítulo II, *item 3.3.5*, com exceção do mineral e massa utilizados: para compor os tratamentos foram pesadas 3,96 g de goethita.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Conforme descrito no capítulo II, *item 3.6*.

4.9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.9.1 Caracterização da goethita sintetizada

4.9.1.1 Teor total de P da goethita após uso da membrana de diálise e extrações sucessivas com resina e Mehlich 1

Mesmo após 700 ciclos de extrações com a resina e 160 ciclos de extrações com Mehlich 1 para cada uma das amostras, o teor total médio de P da goethita foi de 571,8 mg kg⁻¹ (Tabela 1). Portanto, em um meio de crescimento sem outras fontes de P, a presença dessa amostra de goethita permite analisar a eficiência dos microrganismos em desorver formas adsorvidas por esfera interna do nutriente.

TABELA 5-TEOR TOTAL DE P ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA NA GOETHITA

Rep.	P- Total mg kg ⁻¹
1	541,8
2	601,7
3	571,9
Média	571,8
Desv.P	29,9

FONTE: A autora

4.9.1.2 Área Superficial Específica (ASE)

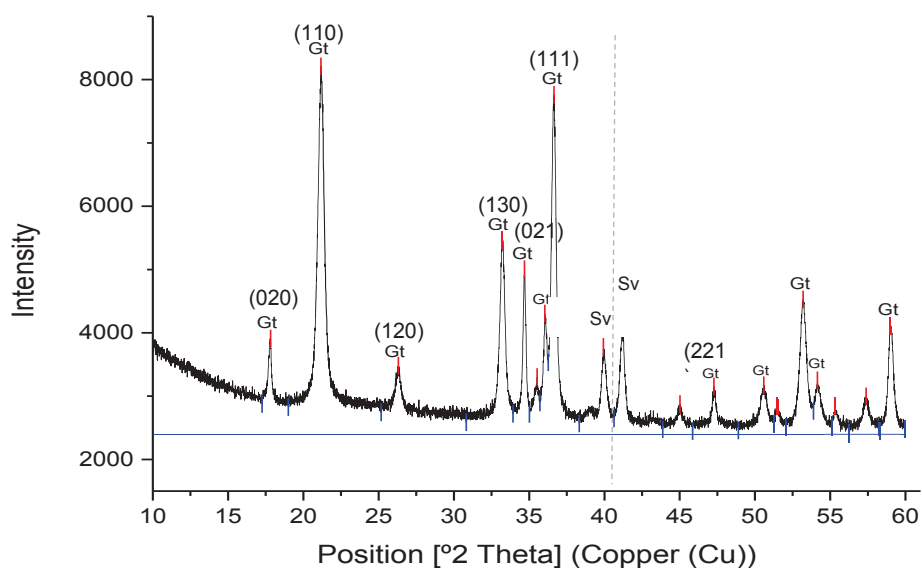
A ASE da Gt sintetizada foi de 36,8 m² g⁻¹, e com a extração com oxalato de amônio aumentou para 38,1 m² g⁻¹. Esse aumento garante que o tratamento com oxalato de amônio foi eficiente na remoção de impurezas e artefatos da síntese da goethita, resultado na purificação do mineral. A saturação da amostra com P promoveu uma redução da ASE para 33,1 m² g⁻¹.

4.9.1.3 Difração de Raios X (DRX)

Para análise do difratograma foi utilizado o padrão do ICCD (International Centre for Diffraction Data) para Goethita nº 29-0713, onde $a=4.608\text{Å}$, $b=9.956\text{Å}$, $c=3.02\text{Å}$.

Os principais picos encontrados e que estão de acordo com o padrão da goethita foram (2θ - radiação CuK α) foram (Figura 6): 17,7245°, 21,2614°, 26,2755°, 33,1877°, 34,6516°, 36,0454°, 36,5922°, 39,9225°, 41,1423°, 53,1460°, 58,9701°.

FIGURA 6-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD6 - DIFRATOGRAMA DE RAIOS X (DRX) DA GOETHITA SINTETIZADA ANTES DO TRATAMENTO COM OXALATO DE AMÔNIO.



Os tamanhos dos cristalitos foram calculados através do software High Score Plus (PAN Analytical), que utiliza a equação de Scherrer. Para os principais picos da goethita sintetizada foram: (200) - 26,3 nm, (110) - 60,9 nm, (210) - 30,8 nm, (130) - 31,5 nm, (210) - 35,4 nm, (111) - 75,7 nm, (212) - 41,2 nm. A reduzida largura e meia altura dos picos indicam alta cristalinidade do mineral.

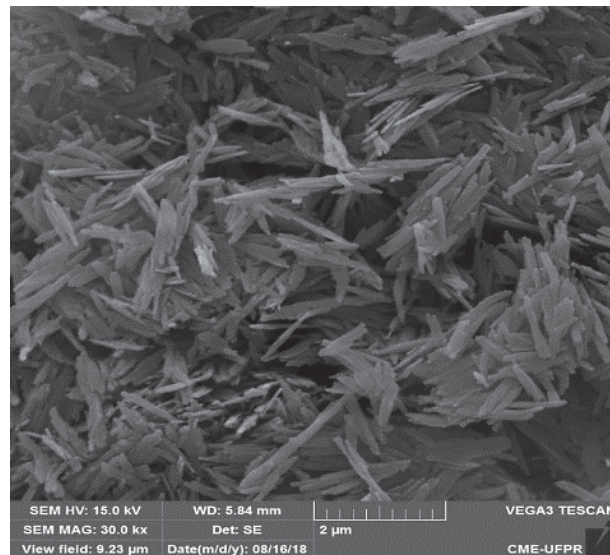
O pico observado Gt em $40,29^\circ 2\theta$ (Figura 6) é atribuído à silvita (Sv - KCl), mineral que é originado na síntese da goethita (equação 1). No DRX da amostra após o tratamento com oxalato de amônio o pico de silvita não foi identificado.

4.9.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada Espectroscopia por energia dispersiva (MEV-EDS)

As micrografias eletrônicas de varredura evidenciam que o método empregado neste trabalho foi capaz de formar cristais de goethita com morfologia acicular (maior crescimento em direção ao eixo *c*) (Figura 7). Os cristais de goethita sintetizados podem apresentar morfologia (crescimento do cristal em direção ao eixo *a*, *b* ou *c*) e tamanhos de cristais diferentes dependendo do método utilizado, o que pode oferecer uma maior gama de diferentes formas goethita (CORNELL, SCHWERTMANN (2003). Ensaios realizados por CORNELL, SCHWERTMANN (2003), sob as mesmas condições, também formaram cristais aciculares. Já JAISWAL

et al. (2013), utilizando menor concentração de KOH em condições similares de temperatura, produziram cristais com formato esférico.

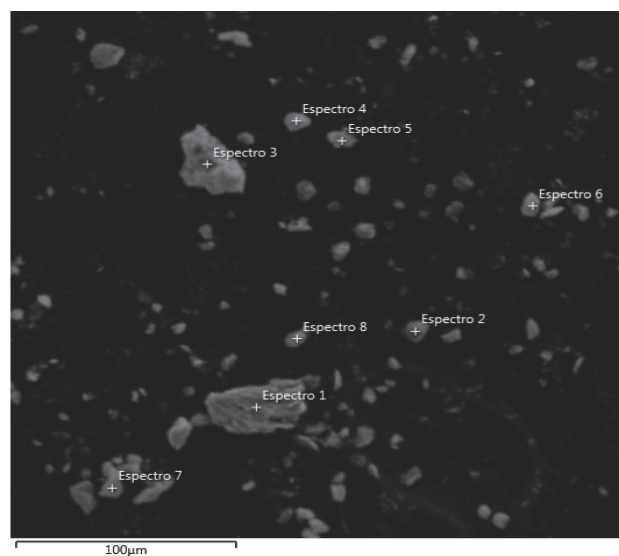
FIGURA 7-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD7 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA EVIDENCIANDO A MORFOLOGIA ACICULAR DA GOETHITA SINTETIZADA

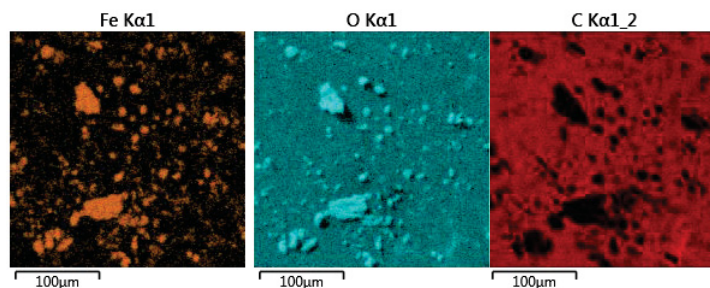


FONTE: A autora (2021)

A fim de obter a composição química semiquantitativa do mineral sintetizado, não saturado com KH_2PO_4 , foi realizado uma varredura através de análise de dispersão de energia (EDS) (Figura 8 e Tabela 2).

FIGURA 8-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD8 - PARTÍCULAS DE GOETHITA ESCOLHIDAS PARA ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MICROQUÍMICA POR EDS (RESULTADOS NA TABELA 3) (A); MAPA DE DISTRIBUIÇÃO QUÍMICA DE Fe (B), O (C) E C (C).





FONTE: A autora (2021)

A amostra de sintetizada é composta basicamente de Fe (em laranja) ($X=65,0\%$) e O (azul) ($X=34,8\%$), não havendo assim, a contaminação da mesma por outros elementos durante seu processo de síntese. A ampla distribuição de C (vermelho) está relacionada principalmente à película metálica condutora no preparo da lâmina (Figura 8C). Outra possibilidade da presença de CO_2 é a escolha do sistema de síntese que se caracteriza como “sistema aberto” (com presença de CO_2). Segundo SCHWERTMANN et al. (1987), a goethita sintetizada pode conter algum percentual de carbono na forma de carbonato (CO_3), o qual encontra-se fortemente adsorvido na estrutura do mineral, não sendo possível dessorvê-lo com o tratamento pós síntese (lavagens com água ultrapura) (CORNEL, SCHWERTMANN, 2003; LIU et al., 2014; SCHWERTMANN et al., 1987) .

TABELA 6 - ANÁLISE POR EDS DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ESPECTROS DA GOETHITA SINTETIZADA.

Amostra	Fe Teor %	O Teor %	C Teor %
Espectro 1	64,6	35,2	0,2
Espectro 2	66,5	33,2	0,3
Espectro 3	67,2	32,7	0,1
Espectro 4	63,2	36,6	0,2
Espectro 5	66,9	33,0	0,1
Espectro 6	66,1	33,7	0,2
Espectro 7	65,1	34,7	0,2
Espectro 8	60,4	39,4	0,2
Média	65,0	34,8	0,18
DesvP	2,28	2,26	0,064

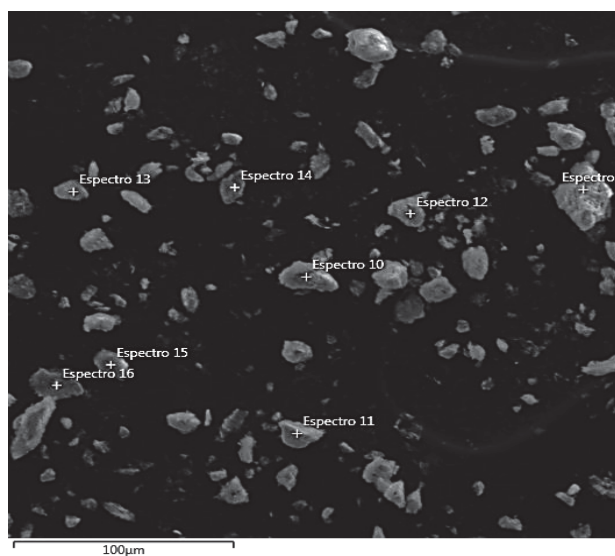
FONTE: A autora (2021)

Após o processo de saturação e remoção das formas lábeis de P, a da goethita foi novamente submetida à análise de MEV-EDS a fim de verificar a presença de P no mineral (Figura 9 e Tabela 4).

A microanálise confirmou a presença de P, com concentração média de 0,35%. Também foram identificados Na ($X=0,13,7\%$) e Cl ($X=0,15\%$) (Tabela 3) A

presença destes elementos é justificada pela correção do pH da amostra para 7 com o uso de NaOH 0,1 mol L⁻¹ e HCl 0,1 mol L⁻¹ após o processo de dessorção do P lábil.

FIGURA 9-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD9 - PARTÍCULAS DE GOETHITA SELECIONADAS PARA ANÁLISE MICROQUÍMICA COM EDS (RESULTADOS NA TABELA 3)



FONTE: A autora (2021)

TABELA 7- COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ESPECTROS DA GOETHITA SINTETIZADA E COM P ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA ANALISADOS POR EDS

Amostra	Fe Teor %	O Teor %	P Teor %	Na Teor %	Cl Teor %
Espectro 09	67,5	32	0,3	0,1	0,1
Espectro 10	65,4	33,8	0,4	0,2	0,2
Espectro 11	69,1	30,3	0,4	0,1	0,1
Espectro 12	62,3	37,1	0,4	0,1	0,1
Espectro 13	61,8	37,6	0,4	0,1	0,1
Espectro 14	68,5	30,9	0,3	0,1	0,2
Espectro 15	67,7	31,5	0,4	0,2	0,2
Espectro 16	60,0	39,4	0,2	0,2	0,2
Média	65,2	34,1	0,35	0,13	0,15
DesvP	3,47	3,49	0,07	0,05	0,05

FONTE: A autora (2021)

4.9.1.5 Espectroscopia de Infravermelho (IF-IV)

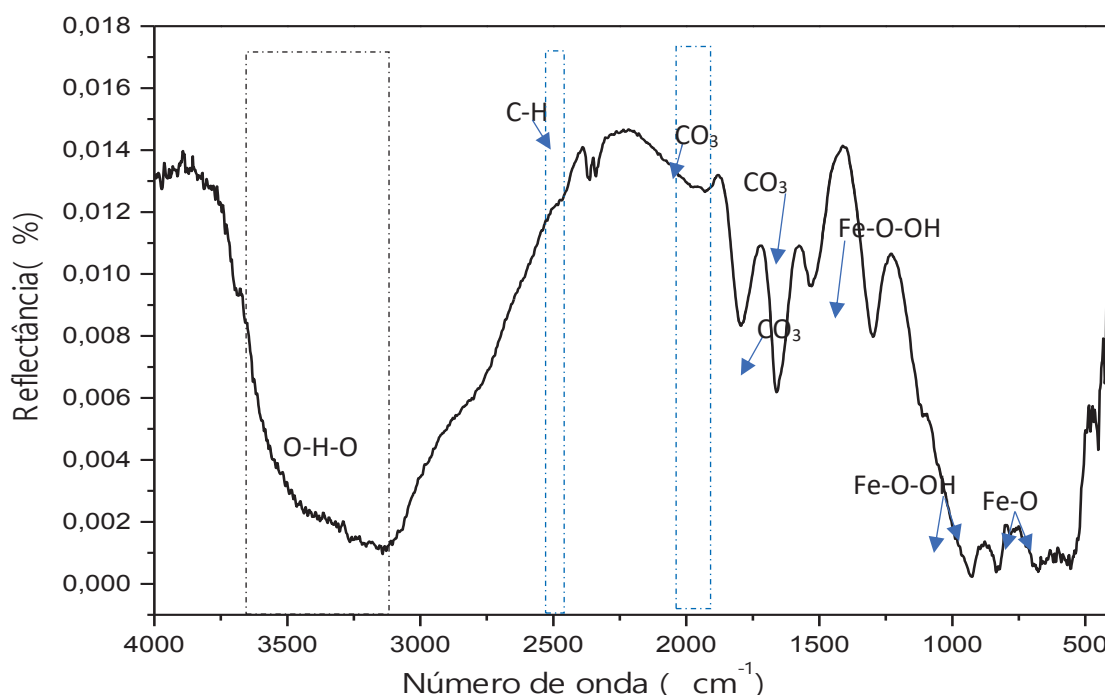
4.9.1.6 Goethita antes do tratamento com oxalato de amônio

O espectro de IF-IV foi medido de uma faixa de 4000 cm⁻¹ a 400 cm⁻¹. As bandas formadas em 3214, 1297, 922, 823, 689 e 563 cm⁻¹ são consideradas características da goethita (Figura 10).

A banda formada em 3214 cm^{-1} é atribuída à vibração do grupamento O-H-O. Esta banda é uma formação típica que indica a presença da água na estrutura do mineral, a qual pode ser incorporada e/ou adsorvida à sua superfície durante o processo de síntese (PARFITT, 2019). O estiramento da banda formada em 3148 cm^{-1} pode ser atribuído à vibração da molécula de OH. Em 2361 e à 2333 cm^{-1} é característico da vibração da ligação C-H. O IF-IV mostrou a formação de bandas dada a vibração da ligação C-O em 1793 , 1660 , e em 1527 cm^{-1} , o que indica a formação de CO_3 em decorrência da contaminação de CO_2 atmosférico.

As bandas formadas pela ligação Fe-O-OH podem ser vistas em 1297 , 922 , 823 e 823 cm^{-1} , mostrando, portanto, a formação de $\alpha\text{-FeOOH}$. As bandas atribuídas a ligação Fe-O da goethita foram formadas em 689 cm^{-1} e 563 cm^{-1} .

FIGURA 10-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD10 - ESPECTRO DA GOETHITA SINTETIZADA ANTES DO TRATAMENTO COM OXALATO DE AMÔNIO



FONTE: A autora (2021)

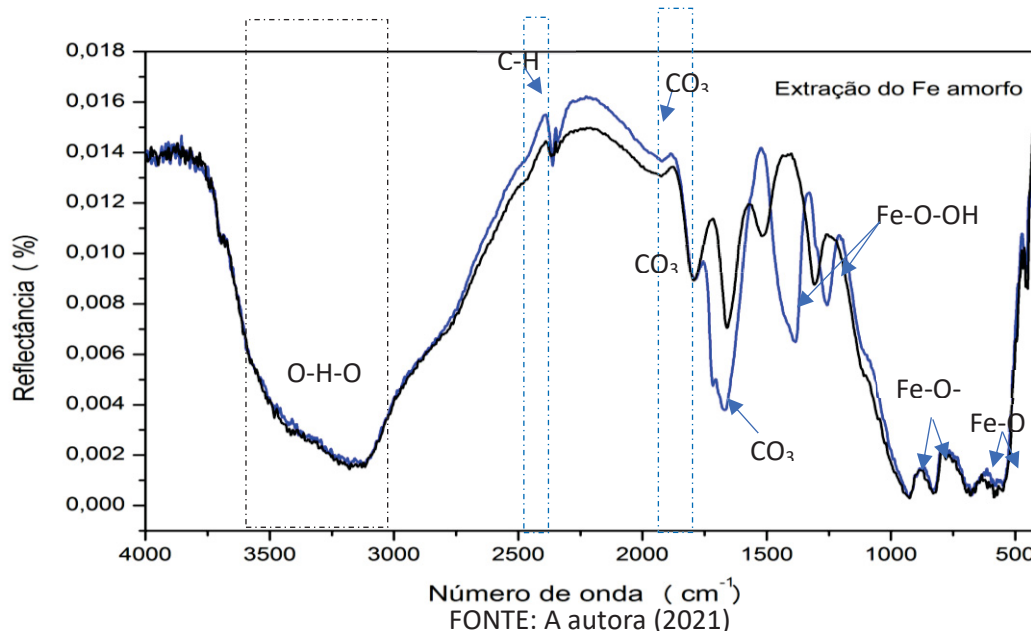
4.9.1.7 Goethita após o tratamento com oxalato de amônio

Os espectros de IF-IV mostram um deslocamento de algumas bandas e mudança de alguns picos relacionados ao CO_3 . Nenhuma mudança aparente quanto

aos grupos característicos deste mineral foram observadas em 3214, 922, 823, 689 e 563 cm^{-1} (Figura 11).

O tratamento com oxalato de amônio promoveu o surgimento de uma nova banda em 1391 cm^{-1} , que é decorrente da exposição do grupamento OH, da ligação Fe-OH (w). Também promoveu o estiramento da banda formada pela vibração do grupamento Fe-O-OH em 1273 cm^{-1} . Também ocorreu um encurtamento da banda formada pela vibração da ligação C-O em 1771 cm^{-1} , assim como uma curta vibração do grupamento O-H em 1720 cm^{-1} , não observados anteriormente. Com essas novas configurações, é possível afirmar que o tratamento com oxalato de amônio, além de purificar, funcionalizou mais o mineral pela exposição de grupos hidroxilados.

FIGURA 11-ESPECTRO DA GOETHITA SINTETIZADA APÓS O TRATAMENTO COM OXALATO DE AMÔNIO



Após a saturação KH_2PO_4 e remoção do P-lábil, o IF-IV foi realizado para determinar a frequência das mudanças nos grupos funcionais onde o H_2PO_4^- foi adsorvido por esfera interna.

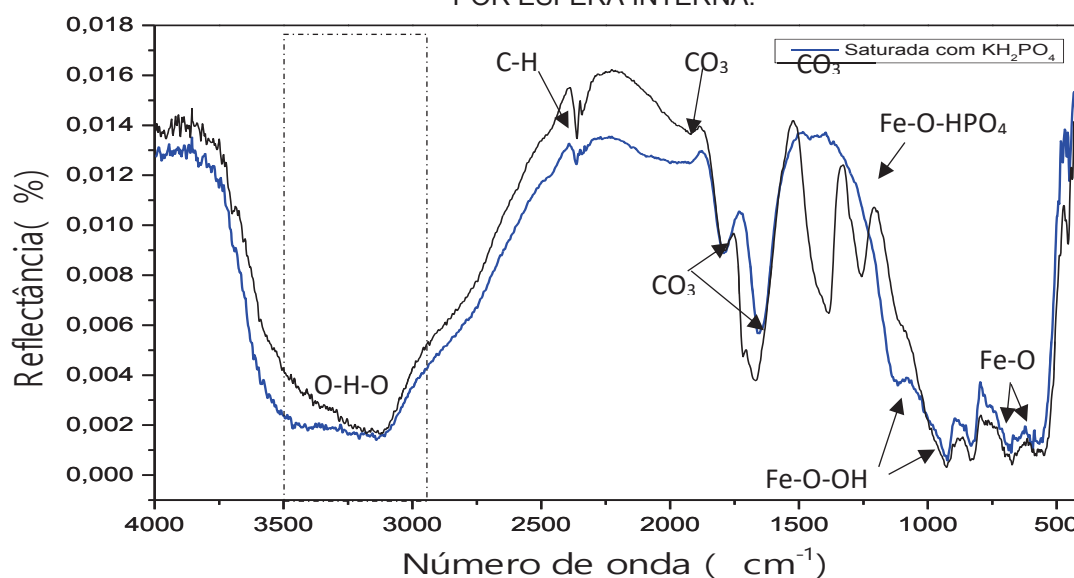
A adsorção promoveu mudanças em todos as bandas dos grupos característicos da goethita (Figura 12). A formação da banda anterior em 3214 cm^{-1} , típica de grupamentos O-H, sofreu uma deformação, o que pode sugerir a remoção/substituição de alguns grupos O-H, ou uma mudança no plano de orientação dos átomos de H. Segundo RUAN et al., (2002) a intensidade relativa da banda diminui linearmente com a desidroxilação, a qual ocorre sob elevadas temperaturas ($>110^\circ\text{C}$). Como o material não foi submetido à temperaturas maiores que 40°C , a

perda de grupos OH por desidroxilação, seria pouco provável, o que sugere a troca de ligante com o H_2PO_4^- .

RUAN et al. (2002), em estudos sobre IF-IV da estrutura de goethita, observaram que a formação das bandas ocorre em virtude da vibração ocasionada pela posição dos grupamentos hidroxílicos em relação ao arranjo trigonal do Fe e as ligações de H. A mudança da posição das bandas ou seu alargamento, ocorre em virtude de um novo rearranjo proveniente da adsorção do $\text{O-Fe-H}_2\text{PO}_4^-$, o que gerou um novo padrão de vibração (Figura 12).

As bandas formadas da vibração da ligação O-Fe-OH em 1391 cm^{-1} (formada após o tratamento com oxalato de amônio) e 1297 cm^{-1} , desapareceram. Isso sugere que os sítios OH com carga remanescente foram ocupados pelo H_2PO_4^- . Em experimentos de adsorção com goethita sintetizada JAIWAL et al.,(2013) encontraram resultados semelhantes em relação aos grupos funcionais característicos deste mineral, o que levou os autores a concluírem que a goethita apresenta alta capacidade de adsorção em meio aquoso. As bandas 823 , 689 e 563 cm^{-1} tiveram uma diminuição do seu estiramento, o que sugere que os grupos funcionais também podem ter adsorvido o H_2PO_4^- por esfera interna (Figura 12).

FIGURA 12-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD12- ESPECTRO DA GOETHITA SINTETIZADA APÓS O TRATAMENTO COM OXALATO DE AMÔNIO E COM H_2PO_4^- ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA.



FONTE: A autora (2021)

4.9.2 Experimentos microbiológicos para dessorção do p adsorvidos por esfera interna da goethita

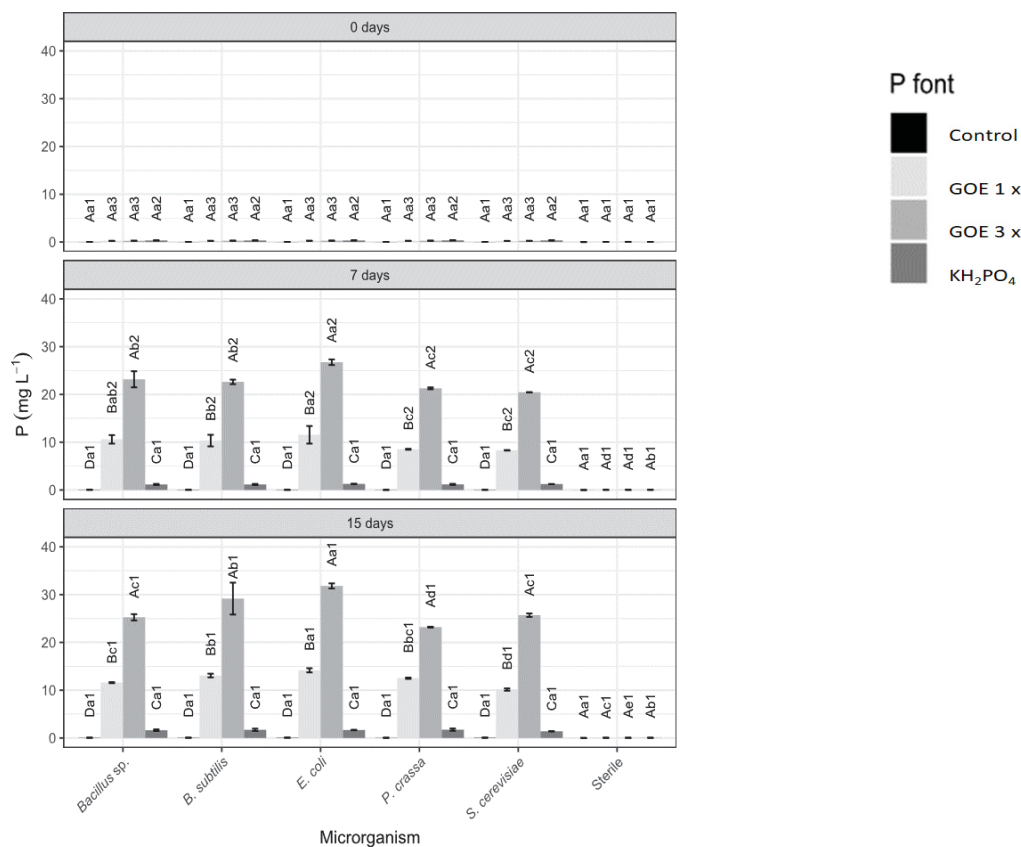
4.9.2.1 Eficiência na dessorção do P por microrganismos em meio líquido

Para o tempo avaliado de 0 h, o teste de comparação das médias ($p < 0,05$), não demonstrou diferenças significativas entre as concentrações de P presentes nos tratamentos KH_2PO_4 , GOE 1 e GOE 3 para todos os microrganismos: grupo controle - $0,02940 \text{ mg L}^{-1}$ (sem adição de P e inoculado) e controle negativo - $0,002083 \text{ mg L}^{-1}$ (com adição de P e sem inoculação) (Figura 13).

O pH do meio para o tempo de 0 h manteve-se próximo da neutralidade para todos os microrganismos ($X=6,8$) (Figura 14).

Para o tempo de 7 dias, a maior dose de goethita (GOE 3x) promoveu maior liberação de P por todos os microrganismos. A dose de P total desse tratamento é 3 vezes superior ao tratamento GOE 1x e da fonte solúvel KH_2PO_4 .

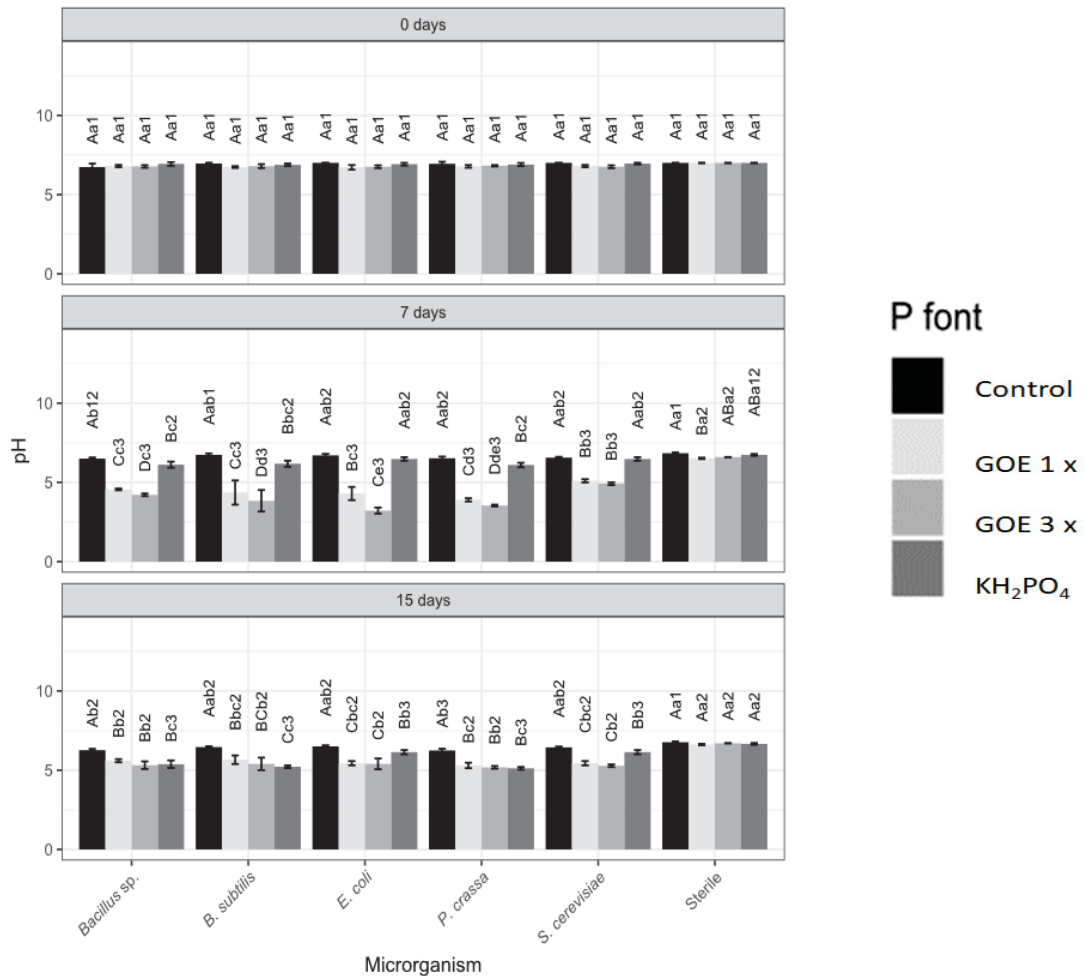
FIGURA 13-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD13-CONCENTRAÇÃO DE P SOLÚVEL NOS DIFERENTES TRATAMENTOS, SOB AÇÃO DOS MICRORGANISMOS.



*Letras minúsculas indicam que as médias são iguais dentro dos tratamentos de cada microrganismo. Letras maiúsculas diferentes indicam que as médias são diferentes para a concentração entre os microrganismos. Número iguais indicam que não houve diferença para o tempo avaliado (número 1 indica maior concentração de P no respectivo tempo e assim por diante até tempo 3). Control – grupo controle – sem adição de P e inoculado. Sterille – controle negativo (com adição de P e sem inoculação).

FONTE: A autora (2021)

FIGURA 14-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD14-EFEITO DAS DIFERENTES FONTES DE P SOBRE OS VALORES DE PH.



*Letras minúsculas indicam que as médias são iguais dentro dos tratamentos de cada microrganismo. Letras maiúsculas diferentes indicam que as médias são diferentes para a concentração entre os microrganismos. Número iguais indicam que não houve diferença para o tempo avaliado (número 1 indica maior concentração de P no respectivo tempo e assim por diante até tempo 3). Control – grupo controle – sem adição de P e inoculado. Sterille – controle negativo (com adição de P e sem inoculação).

FONTE: A autora (2021)

Mesmo não havendo diferença estatística entre os microrganismos para o tratamento (GOE 3x) em 7 dias, a concentração média de P dessorvido pela *E. coli* foi de $26,7 \text{ mg L}^{-1}$. Em relação ao P médio da *S. cerevisiae* ($20,4 \text{ mg L}^{-1}$) (Figura 13) tem-

se uma relação em favor da *E. coli* de 31%. Esse é apenas o P solúvel que passou pelo papel de filtro. O P imobilizado nas células dos microrganismos não foi computado, pois não houve determinação do P do material retido no papel de filtro. Essa determinação de P microbiano não seria precisa pela presença de goethita com P adsorvido por esfera interna também retida no papel de filtro. Uma forma indireta de estimar o P imobilizado nos microrganismos é comparar os seus respectivos crescimentos (Figura 15). O crescimento médio da *E. coli* em 7 dias medido como D.O foi de 0,64, contra 0,56 da *S. cerevisiae* ($0,64/0,56 = 14\%$). Combinando essas duas informações, pode-se hipotetizar que a *E. coli* desorveu mais P adsorvido por esfera interna da goethita, em decorrência de maior formação de biomassa.

Considerando esse mesmo raciocínio de combinação de concentração de P solúvel e crescimento de microrganismos, aos 15 dias de avaliação do tratamento GOE 3x, essa diferença é ainda mais favorável entre *E. coli* em relação a *P. crassa*: *E. coli* – P solúvel = 31,8 mg L⁻¹ (37% superior), crescimento (D.O.) = 1,45 (45 % superior); *P. Crassa* - P solúvel = 23,2 mg L⁻¹, crescimento (D.O.) = 1,0.

A baixa liberação de P solúvel da fonte solúvel KH₂PO₄ (Figura 13) pode ser atribuída, em parte ao maior crescimento de todos os microrganismos aos 7 e 15 dias nesse tratamento. Além do maior crescimento, espera-se que a concentração de P microbiano imobilizado seja maior nessa fonte solúvel. Os microrganismos crescendo em condições adequadas de fornecimento de P devem ter acumulado mais o nutriente por unidade de biomassa. Os microrganismos do solo ao encontrarem substrato com fornecimento adequado de carbono e exsudatos de raízes de plantas para transformação energética tendem a gerar mais biomassa e como consequência disto, imobilizam mais P (WU et al., 2017). O P imobilizado pode ser liberado novamente no meio durante após a morte microbiana e mineralização da célula (ZHANG et al, 2018). O fluxo de P imobilizado pela biomassa microbiana e solução do solo pode chegar a 18,1–36,9 kg P ha⁻¹ ano⁻¹. Vários estudos têm sido realizados em relação a eficiência microbiana em imobilizar as fontes solúveis de P a fim de evitarem que estes, quando utilizados através da fertilização, sejam sorvidos aos óxidos de Fe (SPOHN, WIDDIG, 2017; RICHARDSON, SIMPSON, 2011; MARSCHNER, 2008; KOUNO et al., 2002).

Nos tratamentos GOE 1 e GOE 3 sem inoculação (sterile) praticamente não houve desorção de P aos 7 e 15 dias, mostrando que o processo é dependente da atividade dos microrganismos (Figura 13). Nesses tratamentos também não houve

efeito do tempo na liberação do P (mesma dessorção de P ao zero e 15 dias de incubação).

Para o tempo de 15 dias a eficiência em promover a dessorção do P dos tratamentos GOE 1 e GOE 3 aumentou para todos os microrganismos (Figura 13), mostrando que a dessorção do P adsorvido por esfera interna na goethita é dependente do tempo.

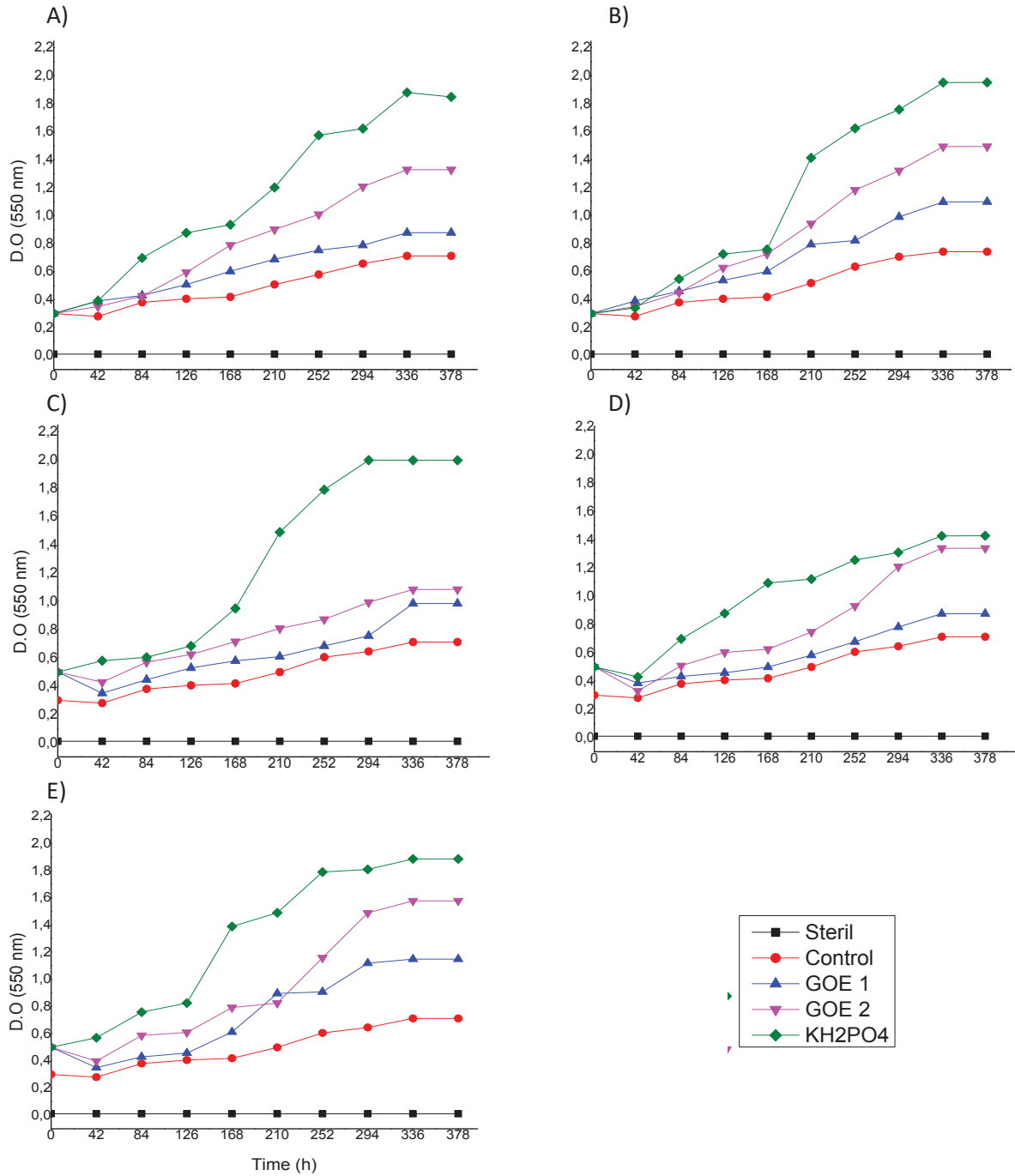
Para todos os microrganismos houve redução significativa nos valores de pH entre o tempo zero e 7 dias de incubação para os tratamentos GOE 1 e GOE 3, com redução mais expressiva para a maior dose de goethita para alguns microrganismos (Figura 14). Esse comportamento é uma evidência da importância da acidificação na dessorção do P adsorvido por esfera interna na goethita. A entrada de prótons na superfície da goethita favorece as reações de hidrólise e quebra da ligação Fe-O-P e dessorção do nutriente. Quando as condições do meio tendem a acidificação, ocorre o predomínio de biprotonação dos grupamentos ferróis ($-FeOH_2^{+0,5}$) (AHMED et al., 2020; ASOMANING, 2020; OFOEGBU, 2019) (Figura 16).

Através do teste de correlação de Pearson ($p < 0,05$) foi possível observar que existe uma correlação positiva entre acidificação do meio e concentração de P solúvel para todos os microrganismos avaliados ($r = 1$), tanto para os tempos de 7 e 15 dias.

As diferentes fontes de P sem a inoculação com os microrganismos não promoveram redução do pH aos 7 e 15 dias em relação aos tratamentos inoculados (tratamentos sterill) (Figura 14), ou seja, nenhuma fonte de P por si só promove redução expressiva no pH do meio. De forma similar, nos tratamentos controles (sem adição de P) aos 7 dias o crescimento dos microrganismos em fontes solúveis dos demais nutrientes não promoveu redução expressiva do pH em relação ao tempo zero. Outro comportamento importante são os valores similares de pH entre os tratamentos inoculados sem P e inoculado com KH_2PO_4 aos 7 dias, evidenciando, mais uma vez, que o processo de acidificação do meio pelos microrganismos quando se adiciona apenas fontes solúveis de nutrientes não é significativo.

Em todos os tratamentos com GOE 1 e GOE 3 houve aumento do pH aos 15 dias em relação aos 7 dias de incubação com os diferentes microrganismos. Esse comportamento evidencia o tamponamento do pH com o aumento do período de incubação pelos microrganismos e liberação do P adsorvido por esfera interna.

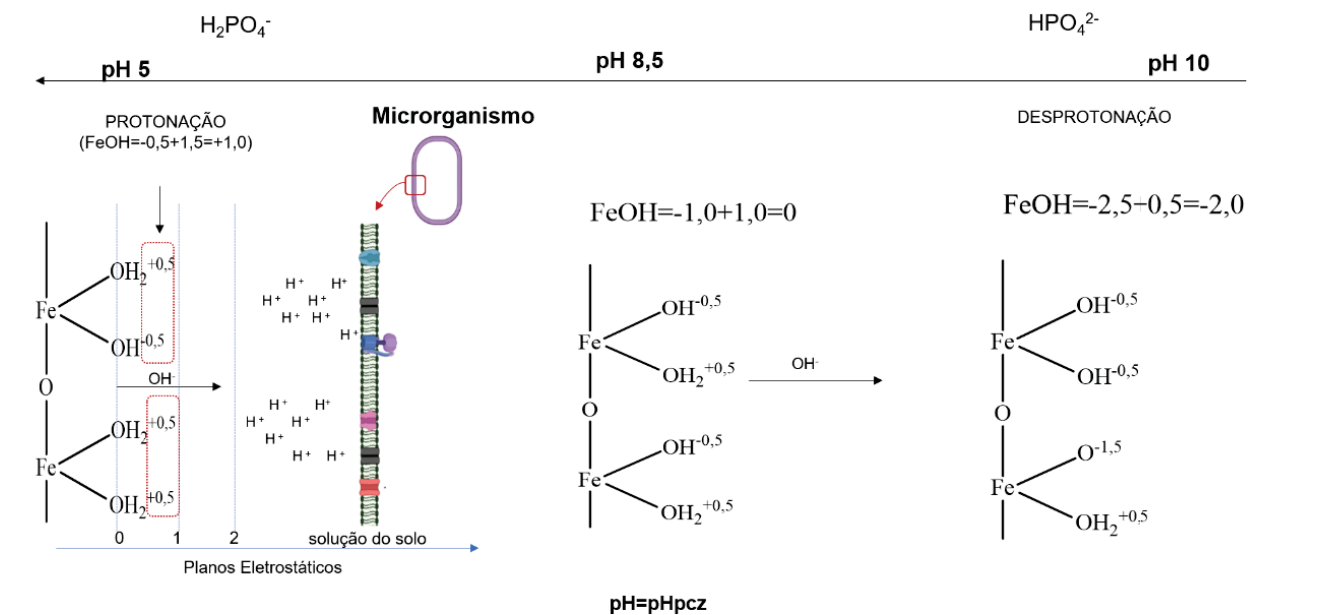
FIGURA 15-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD15 - CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS SUBMETIDOS À DIFERENTES FONTES DE P: A: *Bacillus sp.*; B: *Bacillus subtilis*; C: *P. crassa*; D: *S. cerevisiae*; E: *E. coli*.



Control – grupo controle – sem adição de P e inoculado. Steril – controle negativo (com adição de P e sem inoculação).

FONTE: A autora (2021)

FIGURA 16-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD16 – PROTONAÇÃO DA SUPERÍCIE DOS ÓXIDOS DE FE PELA ACIDIFICAÇÃO MICROBIANA DO MEIO.



A atividade biológica, pode contribuir com o aporte de prótons para a solução do solo. No caso dos microrganismos, a própria atividade metabólica, como o funcionamento da bomba de prótons para geração de ATP, uptake de nutrientes, ou extrusão para o meio externo dos ácidos orgânicos, podem contribuir com a entrada de H⁺ para a solução do solo. Esse excesso de H⁺ na superfície do mineral favorece a hidrólise e quebra de ligação Fe-O-P.

Sob condições de pH = pH_{pcz} do mineral, ocorre equilíbrio entre protonação e desprotonação

Condições mais alcalinas favorecem a desprotonação dos sítios de carga na superfície do mineral.

Fonte: A autora (2021)

4.9.2.2 Eficiência na dessorção do P por microrganismos em meio sólido

A capacidade de dessorção (solubilização) foi realizada através do meio com fosfato de tricálcico (formado a partir da fonte solúvel KH₂PO₄), o qual comumente é utilizado para fins comparativos da eficiência de dessorção de óxidos de Fe ou Al, ou para realizar screening de solubilização para fontes Ca-P (JOE et al., 2018; SINGH et al., 2016).

Os microrganismos foram avaliados através da formação do halo translúcido ao redor das colônias. Para a fonte mineral goethita não houve formação de halo translúcido ao redor das colônias, mesmo com a adição de 30 vezes mais P em relação a fonte solúvel, indicando que, em meio sólido os microrganismos não demonstraram nenhuma eficiência, dentro dos tempos avaliados, na dessorção do P.

O mesmo comportamento foi encontrado por MATOS *et al.* (2018), que em experimento utilizando 40 isolados, entre fungos e bactérias, não obtiveram nenhuma formação de halo quando a fonte FePO_4 foi adicionada ao meio como fonte de fosfato.

Segundo BASHAN *et al.* (2013) a produção de halo em meio sólido não deve ser utilizado como único teste a fim de verificar a eficiência dos microrganismos em solubilizar fontes insolúveis de P, principalmente por que muitas colônias podem não apresentar formação de halo em decorrência das inúmeras vezes em que são cultivadas, ou durante o experimento, ou para a manutenção das colônias, sendo portanto, necessária a avaliação em meio líquido (DE OLIVEIRA-LONGATTI *et al.*, 2020; MEHTA; NAUTIYAL, 2001; SUSILOWATI; KUSUMO; ARIFIN, 2019), como pode ser verificado na Figura 13.

Para a fonte fosfato tricálcico (formado a partir da fonte solúvel $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Ca}^{2+}$) os microrganismos foram classificados de acordo com a formação de halo ao redor de suas colônias como baixa (I.S. < 2), média ($2 \leq \text{I.S.} < 4$) e alta solubilização (I.S. > 4) (HARA, OLIVEIRA, 2004).

Para esta fonte os microrganismos apresentaram diferenças quanto ao índice de solubilização (I.S.), apresentando valores entre 1,1 e 2,95 (Tabela 4). *P. crassa* apresentou I.S. médio. Os demais microrganismos foram classificados como baixa solubilização.

Os resultados encontrados, os quais apontaram baixa capacidade de solubilização para a fonte TCP (1,36 e 1,7) para as espécies de *Bacillus* diferem do reportado pela literatura, onde geralmente estes são classificados como alto índice de solubilização (I.S. > 4) (MATOS *et al.*, 2017; SAEID *et al.*, 2018; SWAIN *et al.*, 2018).

TABELA 8-ÍNDICE DE SOLUBILIZAÇÃO (IS) DOS MICRORGANISMOS PARA DIFERENTES FONTES DE P

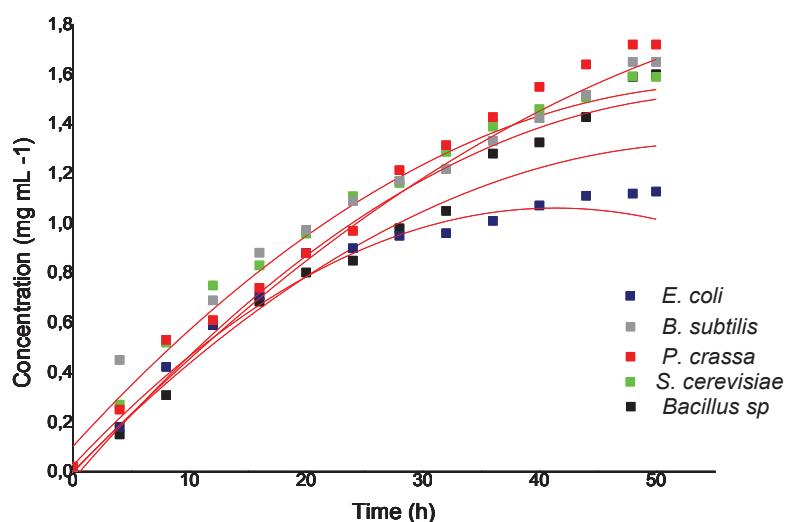
Cepas	D.O	UFC mL ⁻¹	TPC			GT+P		
			\bar{X}	σ	C.V	\bar{X}	σ	C.V
<i>P. crassa</i>	0,0018	6 x 10 ⁻⁶	2,80	0,14	9,88	--	--	--
<i>Bacillus sp</i>	0,0025	5,1x10 ⁻⁶	1,7	0,15	8,42	--	--	--
<i>B. subtilis</i>	0,0017	8x10 ⁻⁵	1,36	0,14	10,41	--	--	--
<i>S. cerevisiae</i>	0,0017	5 x 10 ⁻⁶	1,9	0,14	8,78	--	--	--
<i>E. coli</i>	0,0017	8x10 ⁻⁶	1,1	0,13	7,98	--	--	--
Controle	Nd-	--	--	--	--	--	--	--

TPC: Trifosfato de Cálcio GT+P: Goethita saturada com Fósforo

4.9.2.3 Eficiência na dessorção do P da goethita por sideróforos

O crescimento dos microrganismos foi monitorados durante o experimento, objetivando a seleção de microrganismo que mantivesse velocidade de crescimento e produção de biomassa satisfatória, mesmo sob condições de limitantes de P e Fe, além de monitorar a viabilidade do inóculo durante a avaliação. Após 48 h, *P. crassa* alcançou um crescimento exponencial de $1,72 \text{ mg mL}^{-1}$. As espécies de *Bacillus*, obtiveram produção de biomassa de 1,65 e $1,60 \text{ mg mL}^{-1}$, atingindo a fase estacionária após este período (Figura 17).

FIGURA 17-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD17 - CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS NO EXPERIMENTO DE PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS NA PRESENÇA DE GOETHITA. CADA PONTO REPRESENTA A MÉDIA DAS CINCO DETERMINAÇÕES REALIZADAS DURANTE O CRESCIMENTO NO MEIO CAS-BLUE



FONTE: A autora (2021)

O percentual de sideróforos produzidos pelos microrganismos foi monitorado até a fase estacionária de crescimento (48 h). Após este período, a concentração de biomassa se manteve estável, assim como a produção de sideróforos e o experimento foi então interrompido.

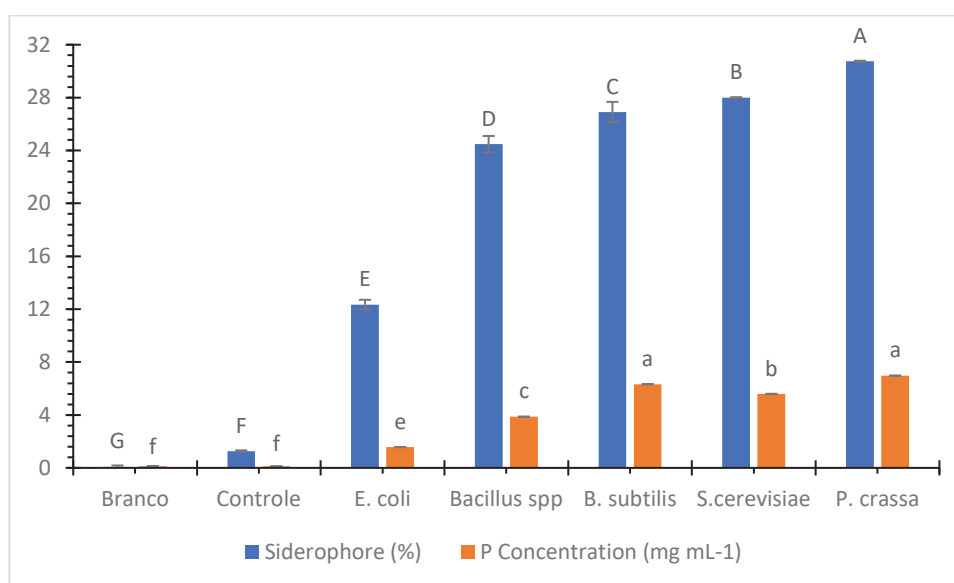
Foi realizado um screening para avaliar a eficiência de cada microrganismos em produzir sideróforos. Os dados foram apresentados e discutidos no capítulo 2.

Aplicando-se o teste de comparação de médias ($p < 0,05$), os microrganismos apresentaram diferenças entre si em relação a produção de sideróforos. Os fungos leveduriformes *P. crassa* e *S. cerevisiae* destacaram-se em relação à produção de sideróforos (30,74 e 28,00%, respectivamente). Dentre as bactérias, *E. coli*

apresentou a menor produção de sideróforos e também a menor dessorção de P da goethita ($1,57 \text{ mg mL}^{-1}$) (Figura 18).

Em relação à dessorção do P do mineral, apesar da elevada produção de sideróforos por *P. crassa*, não houve diferença entre a concentração de P dessorvido, quando comparado à *B. subtilis* ($6,972$ e $6,328 \text{ mg mL}^{-1}$).

FIGURA 18-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD18 - PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS E CONCENTRAÇÃO DE P DESSORVIDO DA GOETHITA PELOS MICRORGANISMOS AVALIADAS EM MEIO COM PRIVAÇÃO DE Fe.



* Controle – com goethita e sem inoculação; Branco – sem goethita e sem inoculação.

FONTE: A autora (2021)

A dessorção de P da goethita pelo *Bacillus subtilis*, mesmo com menor percentual de produção de sideróforos que os fungos leveduriformes, pode estar associada a produção de outros metabólitos secundários, como ácidos orgânicos, ou ainda pela característica química dos sideróforos produzidos pela espécie (FLORES-GALLEGOS; NAVA-REYNA, 2018; KALAYU, 2019; ZHU; LI; WHELAN, 2018). A característica do ligante de alguns sideróforos permite a estes uma maior grau de pré-organização o que aumenta em contrapartida a estabilidade da constante de ligação para as reações entre o ligante e o Fe. Além disso, dependendo da classe a que pertence os sideróforos, os grupos funcionais podem se coordenar ao Fe formando complexos mono ou multidentados, influenciando na cinética da reação (BOUKHALFA, et al., 2000).

Alguns estudos sugerem que o impacto dos sideróforos na solubilização do P pode ser mais efetiva que a dos ácidos orgânicos, uma vez que estes formam complexos mais estáveis com o Fe. Os sideróforos podem formar constantes de estabilidade como a do complexo Fe-EDTA (10^{30} M) ou 10^{52} M, enquanto as constantes, por exemplo, entre Fe-ác. oxálico ou Fe-ác. cítrico podem apresentar constantes de 10^8 M e 10^{12} M, respectivamente (AHMED; HOLMSTRÖM, 2014; KALAYU, 2019). Contudo, esses dados devem ser olhados com cautela, pois nesses experimentos avaliou-se apenas a estabilidade de complexos com o Fe solúvel. No presente estudo trata-se da avaliação de um mineral altamente estável no meio (goethita).

A produção de sideróforos pelos microrganismos é fortemente influenciada pelo pH e a eficiência de sua produção aumenta à medida que a densidade de células se eleva (KESSLER et al., 2020; LIERMANN et al., 2000).

A diminuição do pH pode ocorrer em função, por exemplo da dissociação dos ácidos orgânicos, fazendo com que estes, atuem portanto, em sinergismo com os sideróforos (REICHARD et al., 2007).

A protonação da superfície dos óxidos de Fe (Figura16) gera cargas positivas nos grupos ferróis e favorece a adsorção por esfera externa dos grupos funcionais dos sideróforos carregados negativamente (principalmente grupos carboxilas). O Fe liberado pela dissolução dos óxidos de Fe pelos ácidos orgânicos é complexado pelos sideróforos, o que reduz a atividade desse produto da reação e desloca o equilíbrio químico em favor da dissolução da goethita, liberando mais P para a solução (COBAN, 2020; FARHAT; BOUKHRIS; CHOUAYEKH, 2015; KOSMAN, 2013; NEILANDS, 1995).

4.9.2.4 Eficiência na dessorção do P da goethita por ácidos orgânicos

Os dados dos ácidos orgânicos referem-se à média dos três experimentos (três repetições para cada experimento) (Figuras 19-28).

A concentração 0 μ M dos ácidos não mostrou nenhum efeito sobre a dessorção do P ($p < 0,005$) para nenhum dos ácidos e tempos avaliados (0, 5, 7, 10, 20, 40 e 60 min) (Figuras 19-26). Não houve diferenças significativas nos valores de pH para esta concentração entre os ácidos orgânicos (média de pH 6,8) (Figuras 19-26).

As menores concentrações do ácido malônico apresentaram maior efeito sobre a dessorção do P ($5 \mu\text{M} = 7,00 \text{ mg L}^{-1}$, pH 6.0) nos menores tempos 5-10 min. O pH para estes tempos, na concentração de $5 \mu\text{M}$, não apresentou diferenças estatísticas dos demais tempos avaliados ($p < 0,05$). Para o tempo de 5 min, o qual apresentou maior concentração de P, houve um pico de redução de potencial redox (474 Eh) quando comparado ao tempo de 60 min, que apresentou potencial de 534,33 Eh (Figura 19). Quanto maior a atividade de elétrons no meio, menor o potencial redox e melhor a condição de redução do Fe^{3+} para Fe^{2+} . Esse processo de redução diminui a estabilidade da goethita e a remoção do Fe reduzido da superfície da goethita implica na dessorção do P. As variações no Eh na zona de interação da superfície do óxido de Fe e o envoltório celular do microrganismo podem ser mais um mecanismo importante na dissolução dos minerais: solos com óxidos de Fe - valores críticos de Eh para a redução do Fe^{3+} são de 300 mV em pH 5, entre 300 e 100 mV em pH 6 e 7, e -100 mV em pH 8 (ANN et al., 1999). As reações 12 - 17 do capítulo 1 mostram as reações de redução e dissolução dos óxidos de Fe na presença de elétrons livres. Características dos ácidos, como grupos funcionais, pkas, grau de oxidação do ácido orgânico influenciam no seu potencial redox (KIM et al., 2010; LAZO et al., 2017; IBRAHIM et al., 2018; SHAFIGH et al., 2019). Contudo, devido à similaridade de oscilações entre as curvas de Eh na concentração de $0 \mu\text{M}$ e as demais concentrações do ácido malônico sugere que as inflexões nas curvas de Eh se devem a outros mecanismos de crescimento dos microrganismos, que variam de condições de maior oxidação e redução, e não à produção de ácido orgânico.

A alta capacidade de tamponamento da acidez da solução pela goethita pode explicar a manutenção nos valores de pH com o aumento das concentrações do ácido malônico (Figura 19). Devido aos mecanismos de equilíbrio químico, o aumento da acidez na solução promove a entrada de prótons nos compartimentos de adsorção de esfera externa (dupla camada difusa e Camada de Stern – Figura 1, capítulo 1). Com isso, paulatinamente, os íons H^+ protonam os grupos ferróis, que passam de $-\text{FeO}^{-1,5}$ para $-\text{FeOH}^{-0,5}$ e finalmente $-\text{FeOH}_2^{+0,5}$ (Figura 16). Esse processo de protonação consome o H^+ produzido pela dissociação do ácido orgânico e mantém o pH do meio. Com a protonação de grupos ferróis adjacentes aos sítios de adsorção de P por esfera

interna, o excesso de H^+ promove a hidrólise da ligação Fe-O-P, resultando na dessorção do P mesmo sem alterar o pH do meio (Figura 19).

Possivelmente, a redução na dessorção de P com o tempo para uma mesma concentração do ácido pode ser atribuído à degradação progressiva do ácido orgânico. Os ácidos orgânicos exsudados das células têm uma vida útil muito curta (SHEN et al., 1996), e, portanto, as reações precisam acontecer imediatamente após a sua exsudação. Aparentemente, quanto maior a concentração do ácido, maior sua facilidade de degradação. Esse comportamento explicaria a redução na dessorção de P com o aumento da concentração do ácido malônico, comparando um mesmo tempo de contato (Figura 19).

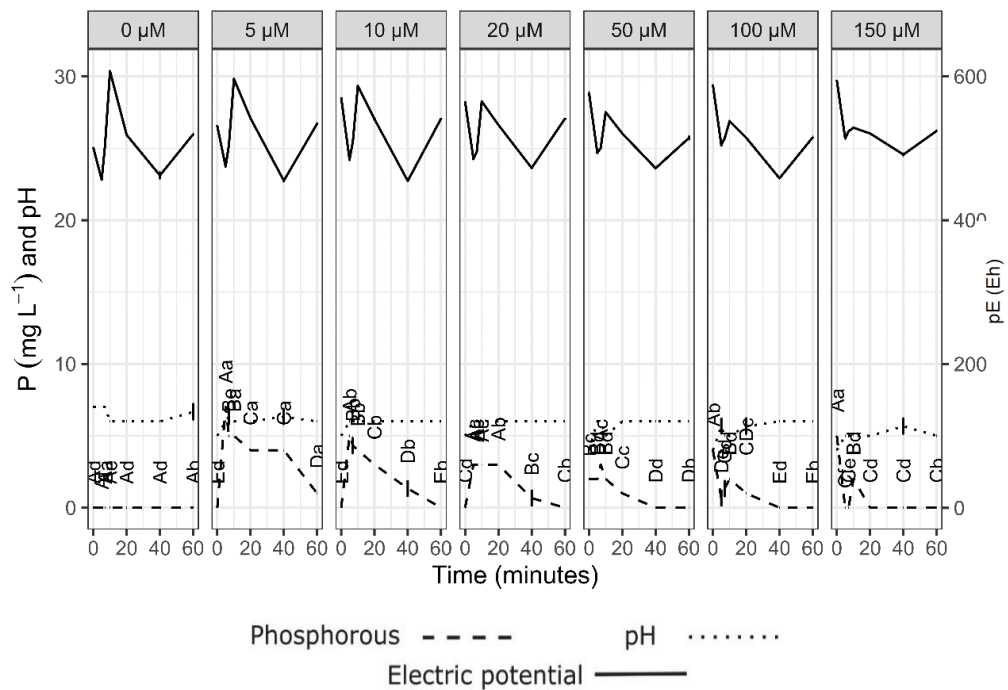
Uma outra possibilidade bastante viável para esse comportamento atípico é a passagem do P dessorvido para formas orgânicas não detectadas pelo ICP-OES por processos de interação com os ácidos orgânicos desprotonados. Dessa forma, quanto maior a concentração do ácido, maior a presença do P em frações orgânicas. Partindo dessa premissa, quanto maior a concentração do ácido, maior a dessorção de P da goethita, contudo, pelo método analítico usado, houve uma subestimativa desse P dessorvido. Em estudo realizado com MUSTAFA et al. (2006), utilizaram ácido oxálico para dessorção de Cd da superfície da goethita, concluíram que a dessorção do metal foi mais eficiente nos tempos iniciais e em concentrações também mais elevadas do ácido, foram considerados no experimento fatores que influenciaram a dessorção: longo período, histerese e aumento do pH da solução.

Além da acidificação promovida pela dissociação dos ácidos orgânicos, outro efeito na dessorção do P que não pode ser negligenciado é troca de ligantes. Os ácidos orgânicos desprotonados (Figura 2, capítulo 1) apresentam elevada eletronegatividade e elevado potencial de promover a troca de ligantes na superfície da goethita: $H_2PO_4^-$ adsorvido por esfera interna pelo ácido orgânico desprotonado, com isso o ácido orgânico passa a ficar adsorvido por esfera interna (Figura 29). Esses eventos são similares à adsorção de esfera interna do $H_2PO_4^-$: perda a água de hidratação do oxiânion e passagem da camada Stern para a superfície do mineral, com ruptura da ligação Fe-OH e $FeOH_2$ e liberação de OH^- ou H_2O para o meio. Muito provavelmente, adsorção dos ácidos orgânicos por esfera interna os protege da degradação e aumenta suas vidas úteis.

Em relação aos comportamentos discutidos para o ácido malônico, destacam-se as seguintes similaridades e diferenças para os demais ácidos orgânicos

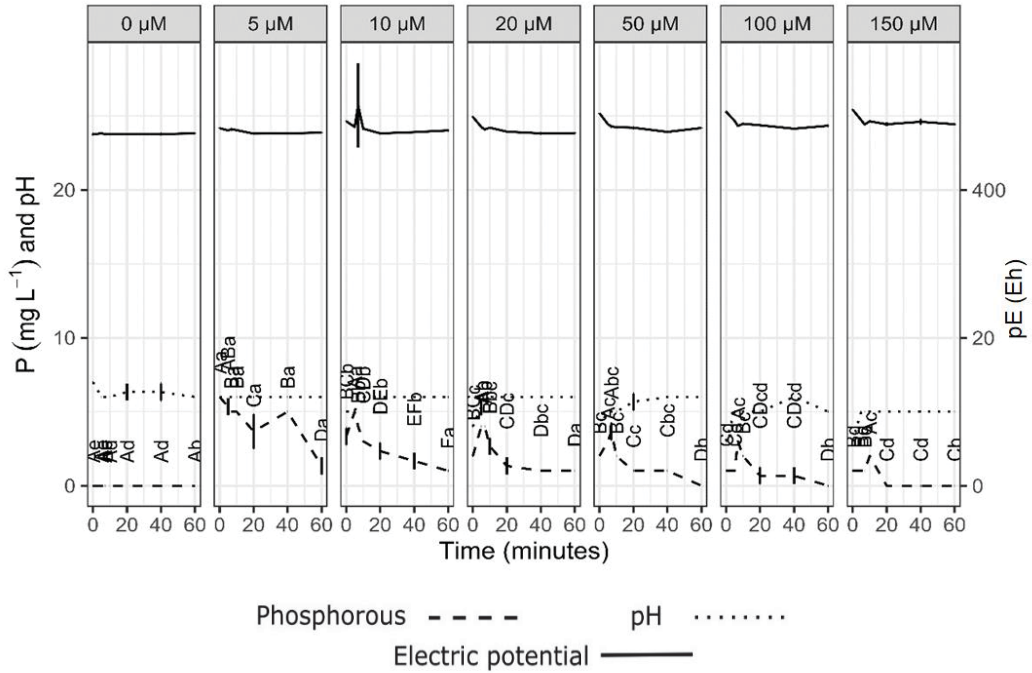
(Figuras 19 a 26): 1) houve redução da quantidade de P desorvido com o aumento da concentração do ácido orgânico e com o tempo de contato com a goethita; 2) as curvas de Eh dos tratamentos com diferentes concentrações de ácido orgânico foram similares ao tratamento com dose zero; 3) de maneira geral, não houve variações expressivas de pH com o tempo de contato e com aumento da concentração dos ácidos; 4) as reduções mais intensas de pH foram nas seguintes situações: ácido láctico, concentração de 150 μM e tempo de 0 min (pH 3,2); 5) Ácido Fumárico, concentração de 150 μM e tempo de 0 min (pH 3,2); 6) mix, concentração de 150 μM e tempo de 0 minutos (pH 3,2)

FIGURA 19-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD19 - DESSORÇÃO DO P ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA À GOETHITA, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO MALÔNICO.



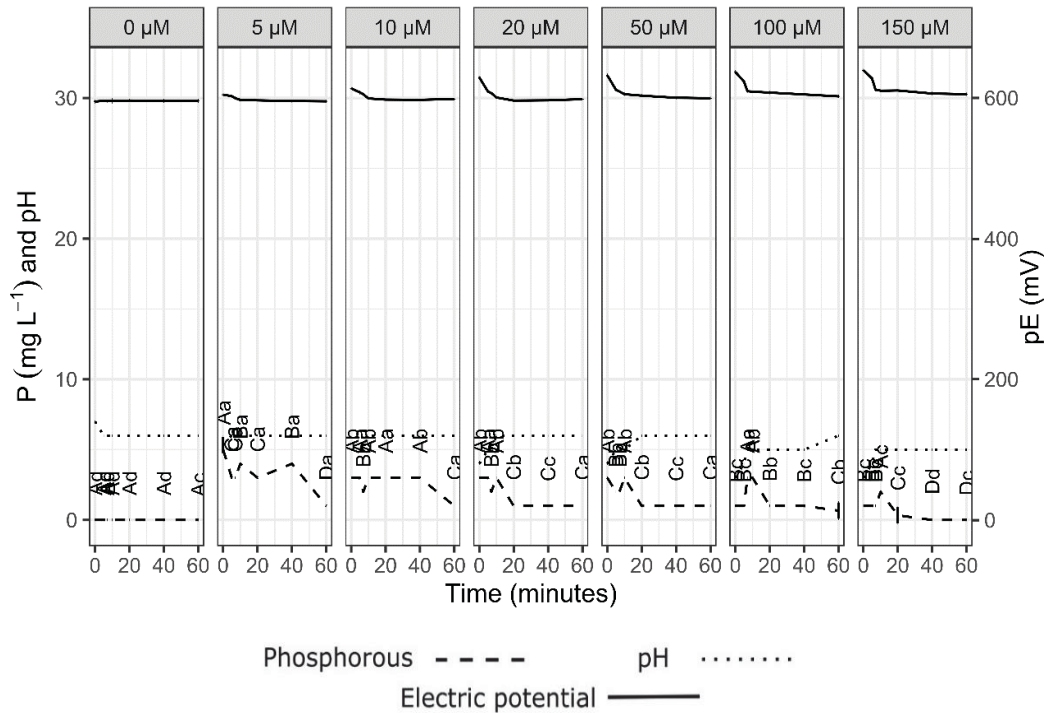
FONTE: A autora (2021)

FIGURA 20-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD20 - DESSORÇÃO DO P ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA À GOETHITA, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO OXÁLICO.



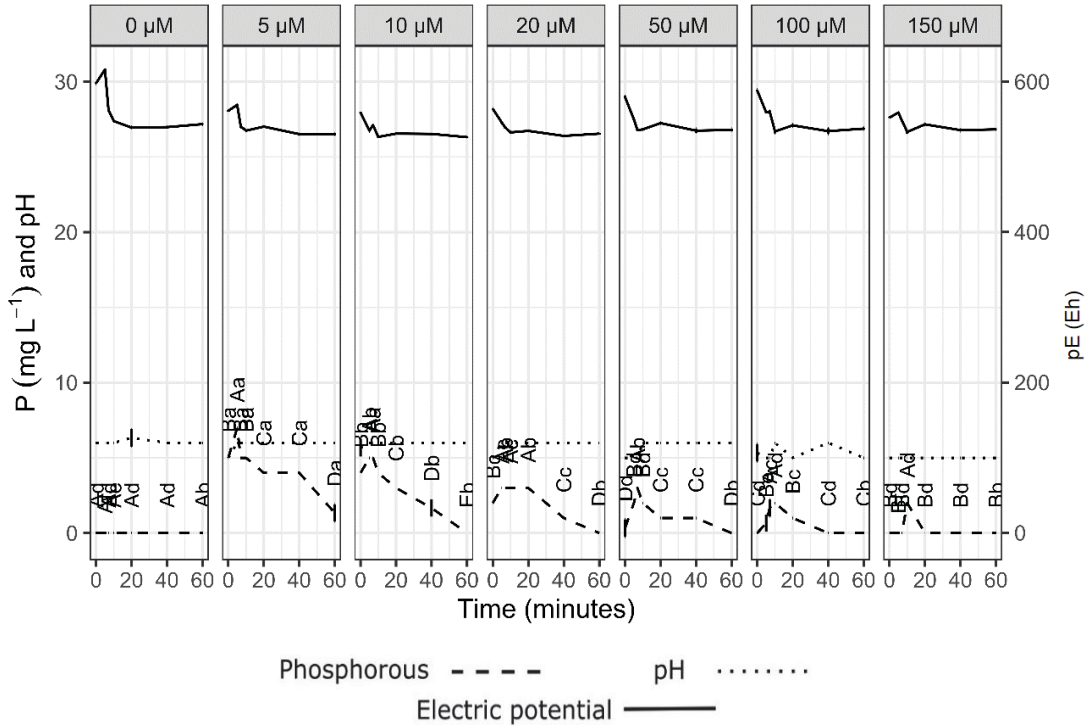
FONTE: A autora (2021)

FIGURA 21-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD21 - DESSORÇÃO DO P ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA À GOETHITA, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO LÁCTICO



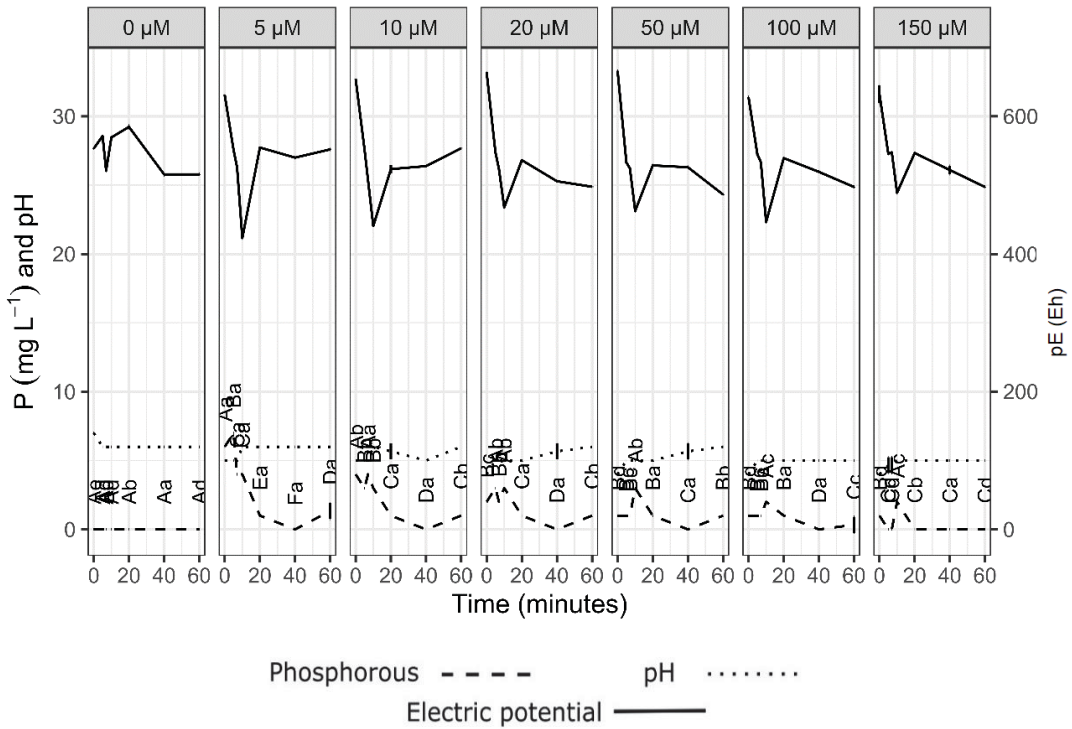
FONTE: A autora (2021)

FIGURA 22-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD22 - DESSORÇÃO DO P ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA À GOETHITA, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO MÁLICO



FONTE: A autora (2021)

FIGURA 23-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD23 - DESSORÇÃO DO P ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA À GOETHITA, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO SUCCÍNICO



FONTE: A autora (2021)

FIGURA 24 - DESSORÇÃO DO P ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA À GOETHITA, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO TARTÁRICO

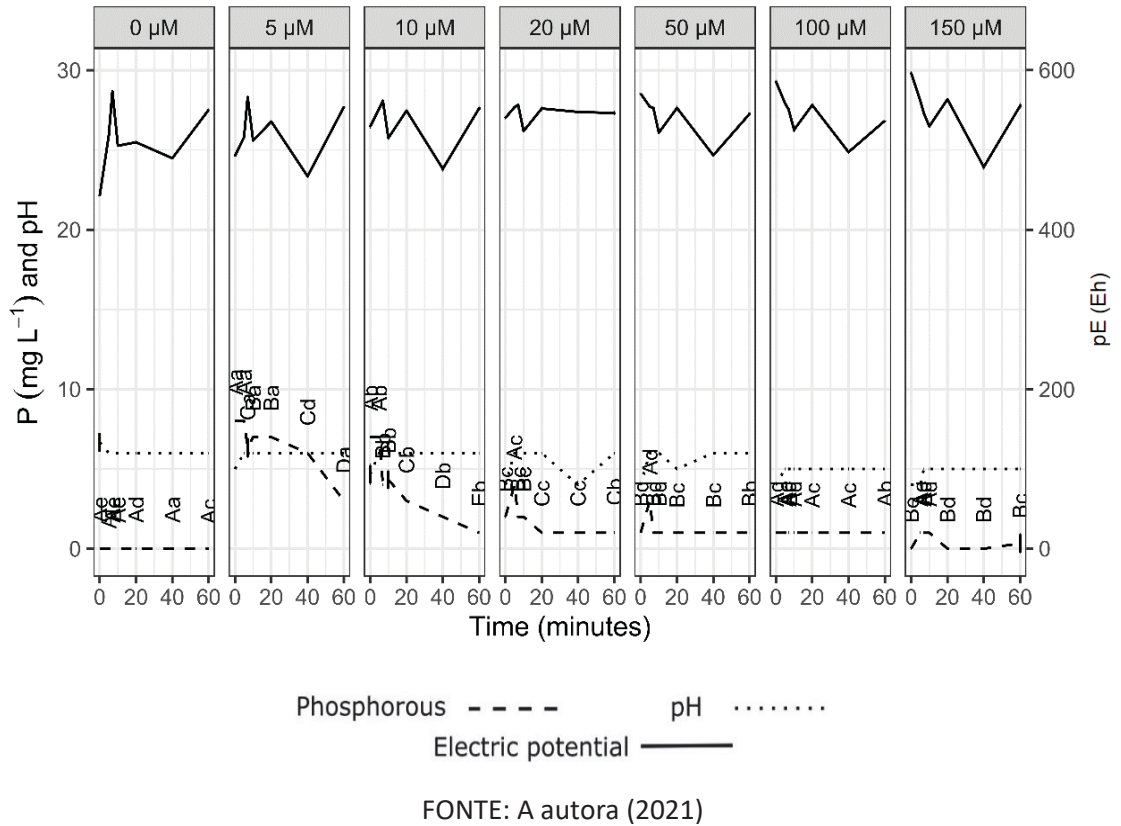


FIGURA 25-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD24 - DESSORÇÃO DO P ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA À GOETHITA, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO CÍTRICO

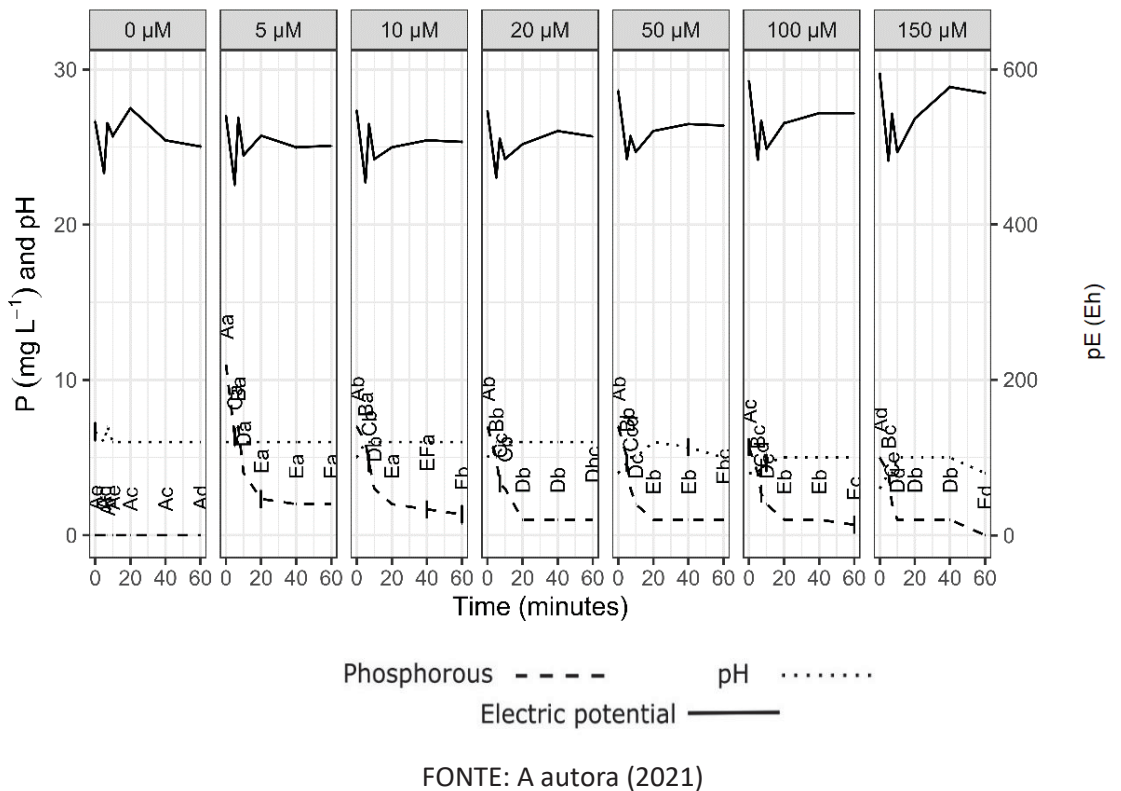
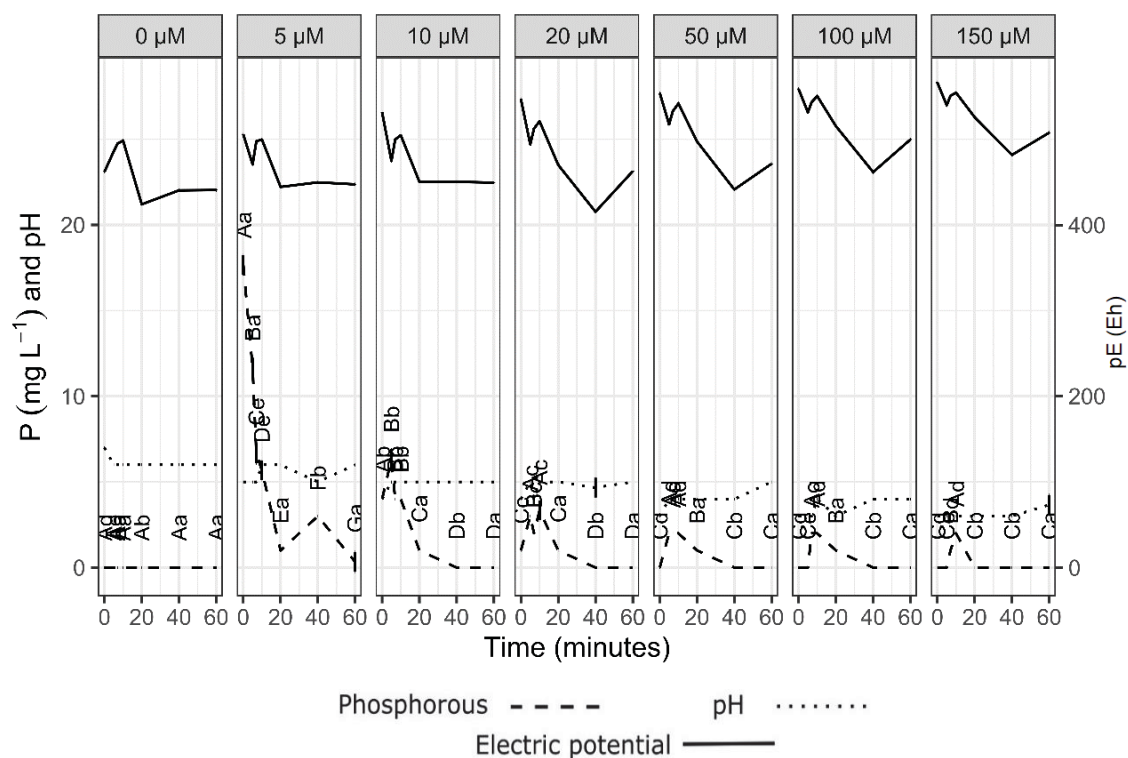


FIGURA 26-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD25 - DESSORÇÃO DO P ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA À GOETHITA, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO FUMÁRICO

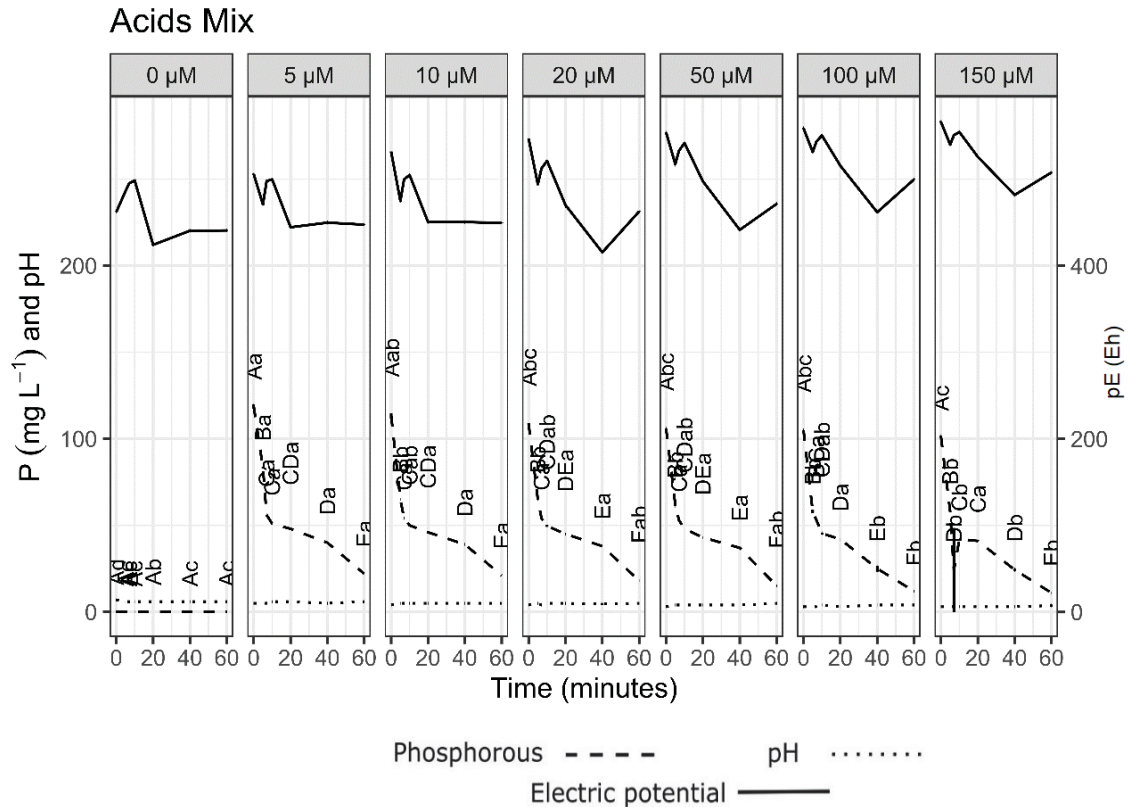


FONTE: A autora (2021)

Para o MIX com todos os ácidos (Figura 26) verifica-se que a ação sinérgica dos ácidos orgânicos promoveram substancialmente a dessorção do P adsorvido por esfera interna na Goethita. A ação sinérgica dos ácidos potencializaram as reações de dessorção nos tempos de 0 - 5 min em todas as concentrações do MIX.

A maior dessorção de P ocorreu para o tempo de 0 min, com a menor concentração dos ácidos 5 μM (119,3 mg L^{-1}). Nesse tratamento, no tempo zero o pH foi de 5,4. Comparando com a concentração de 5 μM do ácido fumárico, a ação do MIX chegou a ser 6 vezes maior sobre a dessorção do P. Também não houve variações de pH com as concentrações do mix e com o tempo de contato, mostrando, mais uma vez, a elevada capacidade de tamponamento do pH do meio da goethita.

FIGURA 27-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD26- DESSORÇÃO DO P ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA À GOÊTHITA, SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO MIX DE ÁCIDOS



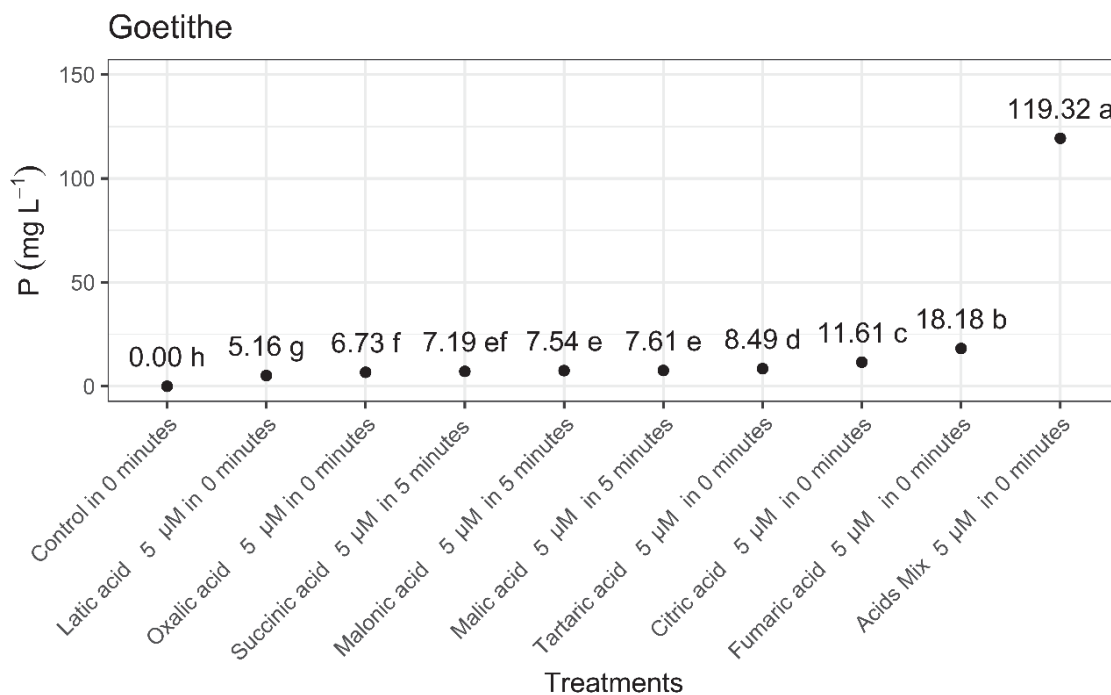
FONTE: A autora (2021)

Na melhor condição de dessorção para todos os ácidos (Figura 28), a dessorção de P pelo mix de ácidos orgânicos (5 μM e tempo 0) foi 6,6 vezes à situação individual de maior dessorção (ácido fumárico, 5 μM , tempo 0).

O ácido fumárico maior eficiência isolada na dessorção do P da goethita, é dicarboxílico e apresenta dois valores de pKa (3,0 e 4,5) (Figura 24, capítulo 2).

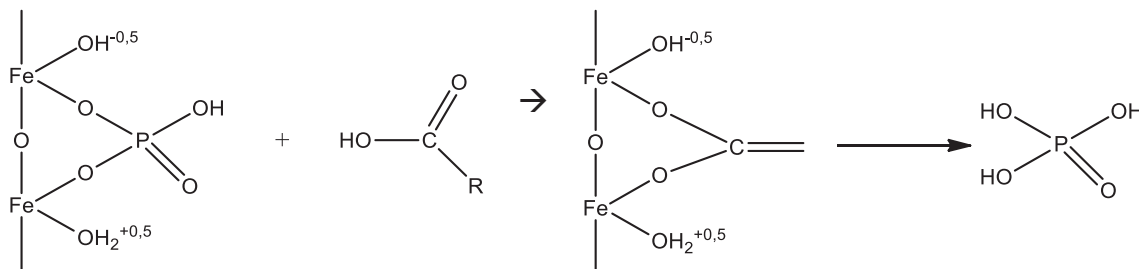
De modo geral, os ácidos demonstraram melhor eficiência em promover a dessorção do P da superfície do mineral em suas menores concentrações 5 μM , para tempos entre 0 - 10 minutos.

FIGURA 28-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD27 - COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DAS SITUAÇÕES EM QUE OS ÁCIDOS APRESENTARAM MELHOR EFICIÊNCIA EM PROMOVER A DESSORÇÃO DO P DA GOETHITA



FONTE: A autora (2021)

FIGURA 29-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AD28 - AÇÃO DO ÁCIDO ORGÂNICO NA TROCA DE LIGANTE E DESSORÇÃO DO P ADSORVIDO POR ESFERA INTERNA NA GOETHITA



FONTE: A autora (2021)

5 CONCLUSÕES

A preparação da goethita sintética assegurou a presença de apenas formas de P adsorvidas por esfera interna, etapa fundamental para testar as hipóteses do trabalho.

Verificou-se eficiência na dessorção de P da goethita pela ação dos microrganismos em meio líquido. Quanto maior a eficiência na dessorção de P, maior foi o crescimento dos microrganismos. A dessorção do P adsorvido foi dependente do tempo de contato com a goethita e da acidificação do meio, promovida pela atividade dos microrganismos. Não ocorreu dessorção do P da goethita pelos microrganismos em meio sólido.

Os microrganismos apresentaram diferenças entre si em relação a produção de sideróforos quanto se usou a goethita como fonte de P. Os fungos leveduriformes *P. crassa* e *S. cerevisiae* destacaram-se em relação à produção de sideróforos (30,74 e 28,00%, respectivamente). Contudo, a espécie que promoveu maior dessorção do P (*Bacillus subtilis*) apresentou menor produção de sideróforos que os fungos leveduriformes (*S. cerevisiae* e *P. crassa*).

As menores concentrações e tempo de contato dos ácidos orgânicos foram mais eficientes na dessorção do P da goethita. A mistura de todos os ácidos orgânicos foi mais eficiente na dessorção do P (efeito sinérgico). Individualmente, o ácido fumárico apresentou os melhores resultados. Definiu uma hipótese combinada da ação dos ácidos orgânicos na dessorção do P da goethita: efeito de protonação da superfície do mineral e troca de ligantes entre o ácido orgânico dissociado e o fosfato adsorvido por esfera interna.

Os microrganismos devem ser selecionados de acordo com o tipo de solo a que se pretende promover a dessorção de P para a solução, uma vez que esse processo deve ocorrer por mecanismos muito específicos. Futuros experimentos devem avaliar a característica química de cada sideróforo a fim de selecionar o grupo com mais afinidade para minerais como óxidos de Fe a fim de promover de forma eficiente a dessorção do P.

REFERÊNCIAS

ADILSON DOS SANTOS HARA, F.; ANTONIO DE OLIVEIRA, L. **Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas***. [s.l.: s.n.].

AHMED, A. A. et al. Molecular level picture of the interplay between pH and phosphate binding at the goethite-water interface. **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, v. 22, n. 45, p. 26509–26524, 2020.

AHMED, E.; HOLMSTRÖM, S. J. M. Siderophores in environmental research: Roles and applications. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 196–208, 2014.

AHMED, M. F.; KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A. Effects of bacterial inoculants and sources of phosphorus on yield and phosphorus uptake of wheat. **Journal of Plant Nutrition**, v. 39, n. 4, p. 508–522, 2016.

ALORI, E. T.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–8, 2017.

ANDA, M. et al. Mineralogy and factors controlling charge development of three Oxisols developed from different parent materials. **Geoderma**, v. 143, n. 1–2, p. 153–167, 2008.

ASOMANING, S. K. Processes and Factors Affecting Phosphorus Sorption in Soils. In: RUANO, P. et al. (Eds.). **Sorption in 2020s**. 1. ed. United Kingdom: Intechopen, 2020. p. 13.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 43, n. 4, p. 529–535, 2008.

BARROW, N. (DIVISION OF A. P. C. W. A. Reactions with variable charge soils. In: **Developments in plant and soil science**. [s.l.: s.n.]. p. 6–15.

BASHAN, Y.; KAMNEV, A. A.; DE-BASHAN, L. E. A proposal for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 1, p. 1–2, 2013.

BIGHAM, JM; FITZPATRICK, RW; SCHULZE D. Iron Oxides. Soil Mineral with **Environ Appl**. p. 323–366, 2002

BORGGAARD, O. K. *et al.* Influence of organic matter on phosphate adsorption by aluminium and iron oxides in sandy soils. **Journal of Soil Science**, v. 41, n. 3, p. 443–449, 1990.

BROWNING, T. J. *et al.* Iron limitation of microbial phosphorus acquisition in the tropical North Atlantic. **Nature Communications**, v. 8, n. May, p. 15465, 2017.

ÇAKMAKCI R.; ERAT M.; ERDOGAN U.; DÖNMEZ M. F. The influence of plant growth-promoting rhizobacteria on growth and enzyme activities in wheat and spinach plants. **Plant Nutrition Soil Science**, v. 170, p. 288–295, 2007.

CHHABRA, S. *et al.* Characterization of mineral phosphate solubilization traits from a barley rhizosphere soil functional metagenome. **Microbiology Open**, v. 2, n. 5, p. 717–724, 2013.

COBAN, H. B. Organic acids as antimicrobial food agents: applications and microbial productions. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 4, p. 569–591, 2020.

CORNELL, R. M.; SCHWERTMANN, U. **The Iron Oxides: Structure, Reaction, Occurrence and Uses**. 2^a ed. Verlag: Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA, 2003.

DE OLIVEIRA-LONGATTI, S. M. *et al.* The culture medium volume and the inoculation method should be considered in semi-quantitative screening of calcium phosphate solubilization by bacteria. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 42, p. 1–5, 2020.

EBERHARDT, D. N. *et al.* Influência da granulometria e da mineralogia sobre a retenção do fósforo em latossolos sob pastagens no cerrado. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 32, n. 3, p. 1009–1016, 2008.

FARHAT, M. BEN; BOUKHRIS, I.; CHOUAYEKH, H. Mineral phosphate solubilization by *Streptomyces* sp . CTM396 involves the excretion of gluconic acid and is stimulated by humic acids. **Microbiology Letters-FEMS**. n. October 2014, p. 1–8, 2015.

FINK, J. *et al.* Iron oxides and organic matter on soil phosphorus availability. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 4, p. 369–379, 2016.

FLORES-GALLEGOS, A. C.; NAVA-REYNA, E. Plant growth-promoting microbial enzymes. In: **Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 521–534.

FONTES, M. P. F.; WEED, S. B. Phosphate adsorption by clays from Brazilian Oxisols: Relationships with specific surface area and mineralogy. **Geoderma**, v. 72, n. 1–2, p. 37–51, 1996.

FOX, A. *et al.* The role of sulfur- and phosphorus-mobilizing bacteria in biochar-induced growth promotion of *Lolium perenne*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 90, n. 1, p. 78–91, 2014.

GÉRARD F. Clay minerals, iron/aluminum oxides, and their contribution to phosphate sorption in soils - A myth revisited. **Geoderma**. Elsevier B.V.; ;262:213–226, 2016.

GUEDES, R. S. *et al.* Adsorption and desorption kinetics and phosphorus hysteresis in highly weathered soil by stirred flow chamber experiments. **Soil and Tillage Research**, v. 162, p. 46–54, 2016.

IVANOVA, R.; BOJINOVA, D.; NEDIALKOVA, K. Rock Phosphate Solubilization By Soil Bacteria. **Chemical Technology**, p. 297–302, 2006.

JAISWAL, A. *et al.* Synthesis, characterization and application of goethite mineral as an adsorbent. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 1, n. 3, p. 281–289, 2013.

JOE, M. M. *et al.* Soil extract calcium phosphate media for screening of phosphate-solubilizing bacteria. **Agriculture and Natural Resources**, v. 52, n. 3, p. 305–308, 1 jun. 2018.

JONES, C. *et al.* Iron oxides, divalent cations, silica, and the early earth phosphorus crisis. **Geology**, v. 43, n. 2, p. 135–138, 2015.

KALAYU, G. Phosphate solubilizing microorganisms: Promising approach as biofertilizers. **International Journal of Agronomy**, v. 2019, 2019.

KESSLER, N. *et al.* Investigation of Siderophore-Promoted and Reductive Dissolution of Dust in Marine Microenvironments Such as Trichodesmium Colonies. **Frontiers in Marine Science**, v. 7, n. March, p. 1–15, 2020.

KOSMAN, D. J. Iron metabolism in aerobes: Managing ferric iron hydrolysis and ferrous iron autoxidation. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 257, n. 1, p. 210–217, 2013.

LIERMANN, L. J. *et al.* Role of bacterial siderophores in dissolution of hornblende. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 64, n. 4, p. 587–602, 2000.

LIU, H.; CHEN, T.; FROST, R. L. An overview of the role of goethite surfaces in the environment. **Chemosphere**, v. 103, p. 1–11, 2014.

MATOS, A.D., I.C. GOMES, S. NIETSCHKE, A.A. XAVIER, W.S. GOMES, J.A. DOS SANTOS NETO AND M.C. PEREIRA. Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v89, n4: 2945-2954, 2017.

McKEAGUE, J.A., DAY, J.H. Dithionite- and oxalate-extractable Fe and Al as aids in differentiating various classes of soils. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 46, p.13–22, 1966.

MCKEAN, S. J., WARREN, G. P. Determination of phosphate desorption characteristics in soils using successive resin extractions. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 27, n. 9–10, p. 2397–2417, 1996.

MEHTA, S.; NAUTIYAL, C. S. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. **Current Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 51–56, 2001.

MENEZES-BLACKBURN, D. *et al.* Organic Acids REgulation of Chemical-Microbial Phosphorus Transformations in Soil. **Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 21, p. 11521–11531, 2016.

MUSTAFA, G., KOOKANA, R.S., SINGH, B. Desorption of cadmium from goethite: effects of pH, temperature and aging. **Chemosphere** 64, 856–865, 2006

NEGASSA, W. *et al.* Influence of Specific Organic Compounds on Phosphorus Sorption and Distribution in a Tropical Soil. **Soil Science**, v. 173, n. 9, p. 587–601, 2008.

NEILANDS, J. B. Siderophores : Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds Siderophores : Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds *. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 45, p. 26723–26726, 1995.

OFOEGBU, S. U. Technological Challenges of Phosphorus Removal in High-Phosphorus Ores: Sustainability Implications and Possibilities for Greener Ore Processing. 2019.

PARDO, MT; GUADALIX, ME; GARCIA-GONZALES, M. Effect of pH and background electrolyte on P sorption by variable charge soil. **Geoderma**, v. 54, p. 275–284, 1992.

PARFITT, R. L. Infrared study of phosphate adsorption on goethite. **Journal of the Chemical Society Faraday Transactions 1**, v. 70, n. January, 2019.

PUENTE, M.E.; LI, C.Y.; BASHAN, Y. Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. **Environ Exp Bot**, v66, 3:389–401, 2009.

PUENTE ME, BASHAN Y, LI CY, L. V. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. **Plant biology**, v. 6, p. 629–642, 2004.

REICHARD, P. U.; KRETZSCHMAR, R.; KRAEMER, S. M. Dissolution mechanisms of goethite in the presence of siderophores and organic acids. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 71, n. 23, p. 5635–5650, 2007.

RHEINHEIMER, D. S., ANGHINONI, I., KAMINSKI, J. Depletion of Inorganic Phosphorus Fractions By Successive Extraction With Resin in Different Soils and Management Systems. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 24, n. 1, p. 345–354, 2000.

RODRIGUEZ, H. ; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotech Adv.**, v. 17, p. 319–359, 2000.

RODRÍGUES, H; FRAGA, R.; BASHAN Y. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. **Dev plant Soil Sci**. Springer; p. 15–21, 2007.

ROLIM NETO, FC; SCHAEFER, CEGR; COSTA, LM; CORRÊA, MM; FERNANDES FILHO, EI; IBRAIMO M. Adsorção de fósforo, superfície específica e atributos

mineralógicos em solos desenvolvidos de rochas vulcânicas do Alto Paranaíba (MG). **Rev Bras Cienc do Solo**. v.28:953–964, 2004.

RUAN, H. D.; FROST, R. L.; KLOPROGGE, J. T.; DUONG, L. Infrared spectroscopy of goethite dehydroxylation : III . FT-IR microscopy of in situ study of the thermal transformation of goethite to hematite. **Spectrochimica Acta Par**, v. 58, p. 967–981, 2002.

SAEID, A.; PROCHOWNIK, E.; DOBROWOLSKA-IWANEK, Phosphorus Solubilization by Bacillus Species. **J. Molecules**, v23, n11,p. 2897-2915, 2018.

SASHIDHAR, B.; PODILE, A. R. Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 1, p. 1–12, 2010.

SCHWERTMANN, U.; CARLSON, L.; MURAD, E. Properties of iron oxides in two finnish lakes in relation to the e n v i r o n m e n t of their formation. **Clays and Clay Minerals**, v. 35, n. 4, p. 297–304, 1987.

SHARMA, S. B. et al. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 587, 2013.

SHI, X. K.; MA, J. J.; LIU, L. J. Effects of phosphate-solubilizing bacteria application on soil phosphorus availability in coal mining subsidence area in shanxi. **Journal of Plant Interactions**, v. 12, n. 1, p. 137–142, 2017.

SINGH, D. P.; SINGH, H. B.; PRABHA, R. Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity: Vol. 1: Research perspectives. **Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 1: Research Perspectives**, n. February, p. 1–343, 2016.

SRIVIDYA, A. R.; KATTA, R.; VISHNUVARTHAN, V. J. Original Research Article Isolation , identification , bioprocessing and characterization of secondary metabolites for its antimicrobial and genotoxicity from the soil screened microorganism. v. 3, n. 4, p. 694–708, 2014.

SUSILOWATI, L. E.; KUSUMO, B. H.; ARIFIN, Z. Screening of the drought tolerant phosphate solubilizing bacteria in dissolving P-inorganic. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1402, n. 5, 2019.

SWAIN, M. R.; LAXMINARAYANA, • K; RAY, R. C. Phosphorus Solubilization by Thermotolerant *Bacillus subtilis* Isolated from Cow Dung Microflora. [s.d.].

TORRENT, J; BARRON, V; SCHWERTMANN, U. Phosphate adsorption and desorption by goethites differing in crystal morphology. **Soil Science**, v. 54, p. 1007–1012, 1990.

USEPA. SW-846 EPA method 3051A. Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils and oils. In: **Test methods for evaluating solid waste**, 3rd Update. Washington: US Environmental Protection Agency, 1998.

WEBER, K. A.; ACHENBACH, L. A.; COATES, J. D. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. **Nature Reviews**, v. 4, n. iii, p. 752–764, 2006.

WEI, S. Y. *et al.* Surface properties and phosphate adsorption of binary systems containing goethite and kaolinite. **Geoderma**, v. 213, p. 478–484, 2014.

WU, H. *et al.* The role of organic acids on microbial deterioration in the *Radix pseudostellariae* rhizosphere under continuous monoculture regimes. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

ZHANG, Y. *et al.* Isolation and characterization of two phosphate-solubilizing fungi from rhizosphere soil of moso bamboo and their functional capacities when exposed to different phosphorus sources and pH environments. p. 1–14, 2018.

ZHU, J.; LI, M.; WHELAN, M. Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. **Science of the Total Environment**, v. 612, n. December, p. 522–537, 2018.

REFERÊNCIAS

ADCOCK, C.T., HAUSRATH, E.M., FORSTER, P.M., Readily available phosphate from minerals in early aqueous environments on Mars. **Nat. Geosci.**, vol. 6, 2013

ADELEKE, R.; NWANGBURUKA, C.; OBOIRIEN, B. Origins, roles, and fate of organic acids in soils: A review. **South African Journal of Botany**, v. 108, p. 393–406, 2017.

ADILSON DOS SANTOS HARA, F.; ANTONIO DE OLIVEIRA, L. **Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas***. [s.l: s.n.].

AFIF, E.; BARRON, V.; TORRENT J. Organic matter delays but does not prevent phosphate sorption by Cerrado soils from Brazil. **Soil Science**. 159:207–211, 1995

AGNELLO AC. Potential of alfalfa for use in chemically and biologically assisted phytoremediation of soil co-contaminated with petroleum hydrocarbons and metals ;249, 2014

AHMED, A. A. et al. Molecular level picture of the interplay between pH and phosphate binding at the goethite-water interface. **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, v. 22, n. 45, p. 26509–26524, 2020.

AHMED, E.; HOLMSTRÖM, S. J. M. Siderophores in environmental research: Roles and applications. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 196–208, 2014.

AHMED, M. F.; KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A. Effects of bacterial inoculants and sources of phosphorus on yield and phosphorus uptake of wheat. **Journal of Plant Nutrition**, v. 39, n. 4, p. 508–522, 2016.

ALORI, E. T.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–8, 2017.

ANDA, M. et al. Mineralogy and factors controlling charge development of three Oxisols developed from different parent materials. **Geoderma**, v. 143, n. 1–2, p. 153–167, 2008.

ANDRADE, A. et al. The iron uptake mechanisms of enteroinvasive *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 200–205, 2000.

ANN, Y.; REDDY, K. R.; DELFINO, J. J. Influence of redox potential on phosphorus solubility in chemically amended wetland organic soils. **Ecological Engineering**, v. 14, n. 1–2, p. 169–180, 1999.

ANTELO, J. et al. Effects of pH and ionic strength on the adsorption of phosphate and arsenate at the goethite-water interface. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 285, n. 2, p. 476–486, 2005.

ARAÚJO, J. C. DE; DULCE, G.; SOARES, D. A. Síntese da hidroxiapatita e refinamento estrutural por difração de raios-x. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1853–1859, 2007.

ASH, C. et al. Different low-molecular-mass organic acids specifically control leaching of arsenic and lead from contaminated soil. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 187, p. 18–30, 2016.

ASOMANING, S. K. Processes and Factors Affecting Phosphorus Sorption in Soils. In: RUANO, P. et al. (Eds.). . **Sorption in 2020s**. 1. ed. United Kingdom: Intechopen, 2020. p. 13.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 43, n. 4, p. 529–535, 2008.

BARROW, N. (DIVISION OF A. P. C. W. A. Reactions with variable charge soils. In: **Developments in plant and soil science**. [s.l.: s.n.]. p. 6–15.

BASHAN, Y.; KAMNEV, A. A.; DE-BASHAN, L. E. A proposal for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 1, p. 1–2, 2013.

BEHERA, B. C. *et al.* Alkaline phosphatase activity of a phosphate solubilizing *Alcaligenes faecalis*, isolated from Mangrove soil. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, n. 1, p. 101–111, 2017

BELELLI, P. G.; FUENTE, S. A.; CASTELLANI, N. J. Phosphate adsorption on goethite and Al-rich goethite. **Computational Materials Science**, v. 85, p. 59–66, 2014.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. DE P.; MACHADO, B. DA C. Sideróforos: uma resposta dos microorganismos. **Química Nova**, v. 25, n. 6b, p. 1155–1164, 2002.

BENSALAH, H. *et al.* Azo dye adsorption on an industrial waste-transformed hydroxyapatite adsorbent: Kinetics, isotherms, mechanism, and regeneration studies. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 3, p. 103807, 2020.

BHAT, N. A. *et al.* Soil biological activity contributing to phosphorus availability in vertisols under long-term organic and conventional agricultural management. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. September, p. 1–11, 2017.

BERRAQUERO, F.R.; BAYA, A.M.; CORMENZANA, A.R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, 17(4):399-406, 1976.

BERTAZZO, S., BERTRAN, C.A. Morphological and dimensional characteristics of bone mineral crystals. **Key Eng. Mater.** 309, 3–6, 2006.

BERTRAND, N.; DOZOIS, C. M. The Pho regulon and the pathogenesis of *Escherichia coli*. v. 153, p. 82–88, 2011.

BERTRAN, C.A. Hydroxyapatite surface solubility and effect on cell adhesion. **J. Colloids Surf. B** 78, 177–184, 2010.

BERTRAN, C.A., BERTAZZO, S., FARIA, L.P., 2006. Surface charge of hydroxyapatite and bone mineral. **Key Eng. Mater.** 330, 713–716, 2006.

BIGHAM, JM; FITZPATRICK, RW; SCHULZE D. Iron Oxides. Soil Mineral with **Environ Appl.** p. 323–366, 2002

BILLAH, M. *et al.* Phosphorus and phosphate solubilizing bacteria: Keys for sustainable agriculture. **Geomicrobiology Journal**, v. 36, n. 10, p. 904–916, 2019.

BISWAS, P. P. *et al.* Systematic changes of bone hydroxyapatite along a charring temperature gradient: An integrative study with dissolution behavior. **Science of the Total Environment**, n. 21, p. 142601, 2020.

BLEAM, W. Surface Chemistry and Adsorption. In: **Soil and Environmental Chemistry**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. p. 385–443.

BORGGAARD, O. K. *et al.* Influence of organic matter on phosphate adsorption by aluminium and iron oxides in sandy soils. **Journal of Soil Science**, v. 41, n. 3, p. 443–449, 1990.

BOUDIA, S. *et al.* Mineralogical transformation during hydroxyapatite dissolution in simple aqueous solutions. **Chemical Geology**, v. 477, n. December 2017, p. 85–91, 2018.

BRAY, R.H. AND KURTZ, L.T. Determination of Total Organic and Available Forms of Phosphorus in Soils. **Soil Science**, 59, 39-45, 1945.

BROWN, S. *et al.* Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 67, p. 313–336, 2013.

BROWNING, T. J. *et al.* Iron limitation of microbial phosphorus acquisition in the tropical North Atlantic. **Nature Communications**, v. 8, n. May, p. 15465, 2017.

BRUCKER, E.; SPOHN, M. Formation of soil phosphorus fractions along a climate and vegetation gradient in the Coastal Cordillera of Chile. **Catena**, v. 180, n. November 2018, p. 203–211, 2019.

BÜNEMANN, E. K. Assessment of gross and net mineralization rates of soil organic phosphorus - A review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 89, p. 82–98, 2015.

BUTLER, A.; THEISEN, R. M. Iron(III)-siderophore coordination chemistry: Reactivity of marine siderophores. 2009.

ÇAKMAKCI R.; ERAT M.; ERDOGAN U.; DÖNMEZ M. F. The influence of plant growth-promoting rhizobacteria on growth and enzyme activities in wheat and spinach plants. **Plant Nutrition Soil Science**, v. 170, p. 288–295, 2007.

CHHABRA, S. *et al.* Characterization of mineral phosphate solubilization traits from a barley rhizosphere soil functional metagenome. **Microbiology Open**, v. 2, n. 5, p. 717–724, 2013.

CHAÏRAT, C., SCHOTT, J., OELKERS, E.H., LARTIGUE, J.E., HAROUIYA, N., Kinetics and mechanism of natural fluorapatite dissolution at 25 C and pH from 3 to 12. **Geochim. Cosmochim. Acta** 71, 5901–5912, 2007.

CHAHAL, H. K.; OUTTEN, F. W. Separate FeS scaffold and carrier functions for SufB2C 2 and SufA during in vitro maturation of [2Fe2S] Fdx. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 116, p. 126–134, 2012.

CAMACHO, M. E. *et al.* Morphology and characteristics of eight Oxisols in contrasting landscapes of Costa Rica. **Catena**, v. 197, p. 104992, 1 fev. 2021.

CELI, L.; BARBERIS, E.; MARSAN, F. A. Sorption of Phosphate on Goethite At High Concentrations. **Soil Science**, v. 165, n. 8, p. 657–664, 2000.

CHITRAKAR, R. *et al.* Phosphate adsorption on synthetic goethite and akaganeite. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 298, n. 2, p. 602–608, 2006.

CHRISTOFFERSEN, J.; CHRISTOFFERSEN, M. R.; KJAERGAARD, N. The kinetics of dissolution of calcium hydroxyapatite in water at constant pH. **Journal of Crystal Growth**, v. 43, n. 4, p. 501–511, 1978.

COBAN, H. B. Organic acids as antimicrobial food agents: applications and microbial productions. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 4, p. 569–591, 2020.

COHEN-OFRI, I.; WEINER, L.; BOARETTO, E.; MINTS, G.; WEINER, S. ; Modern-fossil charcoal: aspects of structure and diagenesis. **Journal of Archaeological Science**, v. 33, p. 428–439, 2006.

CONZ, M. B.; GRANJEIRO, J.M.; SOARES, G. A. Commercial hydroxyapatites for medical- dental applications as bone graft. **J Appl Oral Sci**, v. 13, n. 2, p. 136–140, 2005.

CORDELL, D.; DRANGERT, J.O.; WHITE, S. The story of phosphorus: global food security and food for thought. **Global Environmental Changes**, v.19, p.292-305, 2009.

CORNELL, R. M.; SCHWERTMANN, U. **The Iron Oxides: Structure, Reaction, Occurrence and Uses**. 2^a ed. Verlag: Wiley-VCH GmbH &Co. KGaA, 2003.

CULMAN, S. W. *et al.* Calibration of Mehlich-3 with Bray P1 and Ammonium Acetate in the Tri-State Region of Ohio, Indiana and Michigan. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 51, n. 1, p. 86–97, 2020.

CUNHA, G.M.; GAMA-RODRIGUES, A.C.; COSTA, G.S.; VELLOSO, A. C. X. ; Fosforo orgânico em solos sob florestas montanas, pastagens e eucalipto no Norte Fluminense. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 31, p. 667–671, 2007.

DEGUILLAUME, L. *et al.* Effect of iron dissolution on cloud chemistry: From laboratory measurements to model results. **Atmospheric Pollution Research**, v. 1, n. 4, p. 220–228, 2010.

DE OLIVEIRA-LONGATTI, S. M. *et al.* The culture medium volume and the inoculation method should be considered in semi-quantitative screening of calcium phosphate solubilization by bacteria. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 42, p. 1–5, 2020.

DIPAK, P.; SANKAR, N. S. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential from river Ganga, India. **Annals of Agrarian Science**, v. 15, n. 1, p. 130–136, 1 mar. 2017.

DOROZHKIN, S. V. Surface reactions of apatite dissolution. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 191, n. 2, p. 489–497, 1997.

_____. Dissolution mechanism of calcium apatites in acids: A review of literature. **World Journal of Methodology**, v. 2, n. 1, p. 1, 2012.

DOS REIS, J. V. *et al.* Interpretation of soil phosphorus availability by mehlich-3 in soils with contrasting phosphorus buffering capacity. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 44, p. 1–21, 2020.

DREVER, J. I.; STILLINGS, L. L. The role of organic acids in mineral weathering. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 120, n. 1–3, p. 167–181, 1997.

DUCKWORTH, O. W.; MARTIN, S. T. Surface complexation and dissolution of hematite by C1-C6 dicarboxylic acids at pH = 5.0. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 65, n. 23, p. 4289–4301, 2001

EL-AZOUNI, I. M. Effect of phosphate solubilizing fungi on growth and nutrient uptake of soybean (*Glycine Max L.*) plants. **Journal of Applied Sciences Research**, Ma'an, v. 4, n. 6, p. 592-598, June 2008.

ESWARAN H, REICH P.; BEINROTH, F. Global distribution of soils with acidity. In *Plant -Soil Interactions at Low pH*. Ed. Moniz et al. pp. 159–164. Brazilian Soil Science Society, Belo Horizonte, 1997.

FAGERIA, N. K.; NASCENTE, A. S. **Management of soil acidity of South American soils for sustainable crop production**. [s.l.] Elsevier, 2014. v. 128

FAN, H.; Cui, Z.; He, G.; Huang, L.; Chen, M. Phosphorus adsorption onto clay minerals and iron oxide with consideration of heterogeneous particle morphology. **Science of the Total Environment**, v.605–606, p.357–367, 2017.

FERNÁNDEZ, R. I. E.; NOVAIS, R.F; NOVAIS-NUNES, F.; KER, J. C. Reversibilidade Do Fósforo Não-Lábil Em Solos Submetidos À Redução Microbiana E Química . **Rev. Bras. Ci. Solo**, v. 32, n. 1, p. 2307–2317, 2008.

FERREIRA, C. M. H. *et al.* Comparison of five bacterial strains producing siderophores with ability to chelate iron under alkaline conditions. **AMB Express**, v. 9, n. 1, 2019.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs (Portugues)**. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/ExpDes.pt/ExpDes.pt.pdf>>. Acesso em: 7 jan. 2021.

FIHRI, A. *et al.* Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 347, p. 48–76, 2017.

FILIPPELLI, G.M. The global phosphorous cycle. **Reviews in Mineralogy**. 48. pp. 391–425, 2002.

FILHO, G. N. S.; VIDOR, C. Solubilização de fostatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Rev. Bras. Ci. Solo** n. 1, p. 311–319, 2000.

FINK, J. *et al.* Iron oxides and organic matter on soil phosphorus availability. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 4, p. 369–379, 2016.

FLORES-GALLEGOS, A. C.; NAVA-REYNA, E. Plant growth-promoting microbial enzymes. In: **Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 521–534.

FONTES, M. P. F.; WEED, S. B. Phosphate adsorption by clays from Brazilian Oxisols: Relationships with specific surface area and mineralogy. **Geoderma**, v. 72, n. 1–2, p. 37–51, 1996.

FOX, J. L. *et al.* A new two-site model for hydroxyapatite dissolution in acidic media. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 67, n. 2, p. 312–330, 1978.

GABRIELIAN, L. *et al.* Antibacterial effects of iron oxide (Fe₃O₄) nanoparticles: distinguishing concentration-dependent effects with different bacterial cells growth and membrane-associated mechanisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 6, p. 2773–2782, 2019.

GATIBONI, L. C. *et al.* Quantificação do fósforo disponível por extrações sucessivas com diferentes extratores em Latossolo Vermelho distroférico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, n. 4, p. 1023–1029, 2002.

GATIBONI, L. C.; KAMINSKI, J. Solo após extrações sucessivas com mehlich-1, mehlich-3 e resina trocadora de ânions (1). v. 29, n. 3, p. 363–371, 2005.

GAXIOLA, R.A.; EDWARDS, M.; ELSER, J.J. A transgenic approach to enhance phosphorus use efficiency in crops as part of a comprehensive strategy for sustainable agriculture. **Chemosphere**, v.84, p.840-845, 2011.

GÉRARD, F. Clay minerals, iron/aluminum oxides, and their contribution to phosphate sorption in soils — A myth revisited. **Geoderma**, v. 262, p.213–226, 2016.

GU, B. *et al.* Adsorption and Desorption of Natural Organic Matter on Iron Oxide: Mechanisms and Models. **Environmental Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 38–46, 1994.

GUEDES, R. S. *et al.* Adsorption and desorption kinetics and phosphorus hysteresis in highly weathered soil by stirred flow chamber experiments. **Soil and Tillage Research**, v. 162, p. 46–54, 2016.

GUIDRY, M. W. Apatite Dissolution Kinetics and the Long-Term Phosphorus Cycle. n. December 2002, 2002.

GRAY, J.A., FRANCIS, M.D., GRIEBSTEIN, W.J., 1962. Chemistry of enamel dissolution. In: Sognnaes, R.F. (Ed.), **Chemistry and Prevention of Dental**. 1962.

GYANESHWAR, P., KUMAR, N. J., PAREKA, L. J., & PODLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving nutrition of plants. **Plant & Soil**, 245, 83---93, 2002.

HAM, B. K. *et al.* Insights into plant phosphate sensing and signaling. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 1–9, 2018.

HARDING, I. S.; RASHID, N.; HING, K. A. Surface charge and the effect of excess calcium ions on the hydroxyapatite surface. **Biomaterials**, v. 26, n. 34, p. 6818–6826, 1 dez. 2005.

HERNÁNDEZ, R. D. Z. **Química de los procesos pedogenéticos**. Medellín: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Escuela de Geociencias, 2006. 358 p

HEUER, S.; GAXIOLA, R.; SCHILLING, R.; HERRERA-ESTRELLA, L.; LÓPEZ-ARREDONDO, D.; WISSUWA, M.; DALHAIZE, E.; ROUACHED, H. Improving phosphorus use efficiency: a complex trait with emerging opportunities. **The Plant Journal**, v.90, p.868-885, 2017.

HING, K. A.; BEST, S. M.; BONFIELD, W. Characterization of porous hydroxyapatite. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 10, n. 3, p. 135–145, 1999.

HOLMEN, B. A.; CASEY, W. H. Hydroxamate ligands, surface chemistry, and the mechanism of ligand-promoted dissolution of goethite α -FeOOH(s). **Geochim. Cosmochim. Acta**, 13,1297-1307,1996.

HOTHORN, T. *et al.* **multcomp: Simultaneous Inference in General Parametric Models**. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/multcomp/multcomp.pdf>>. Acesso em: 7 jan. 2021.

HUSSON, O. Redox potential (Eh) and pH as drivers of soil /plant / microorganism systems: A transdisciplinary overview pointing to integrative opportunities for agronomy. **Plant and Soil**, v. 362, n. 1–2, p. 389–417, 2013.

IBRAHIM, I. *et al.* Kinetics and mechanism of the redox reaction of N,N'-phenylenebis-(salicylideneiminato)iron(III) with oxalic acid in mixed aqueous medium. **Transition Metal Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 269–273, 2019.

INDA JUNIOR, A. V. *et al.* Cinética da dissolução redutiva da goethita e hematita em solos poligenéticos. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 553–561, 2005.

IVANOVA, R.; BOJINOVA, D.; NEDIALKOVA, K. Rock Phosphate Solubilization By Soil Bacteria. **Chemical Technology**, p. 297–302, 2006.

JACOBY, R. *et al.* The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition—current knowledge and future directions. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. September, p. 1–19, 2017.

JAISWAL, A. *et al.* Synthesis, characterization, and application of goethite mineral as an adsorbent. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 1, n. 3, p. 281–289, 2013.

JEMAL, M. Thermochemistry and Kinetics of the Reactions of Apatite Phosphates with Acid Solutions (II). In: VALDEZ, ICHAEL S. W. AND B. (Ed.). . **Phosphoric Acid Industry - Problems and Solutions**. 1. ed. United Kingdom: Intechopen, 2017. v. 1p. 38.

JOE, M. M. *et al.* Soil extract calcium phosphate media for screening of phosphate-solubilizing bacteria. **Agriculture and Natural Resources**, v. 52, n. 3, p. 305–308, 1 jun. 2018.

JOHNSON, S. E.; LOEPPERT, R. H. Role of Organic Acids in Phosphate Mobilization from Iron Oxide. **Soil Science Society of America Journal**, v. 70, n. 1, p. 222–234, 2006.

JONES, D. L. *et al.* Organic acid behavior in soils - Misconceptions and knowledge gaps. **Plant and Soil**, v. 248, n. 1–2, p. 31–41, 2003.

JONES, D. L. Organic acids in the rhizosphere - a critical review. **Plant and soil**, v. 205, n. 1, p. 25–44, 2016.

JORDAN, K. Y. K. G. A. M. D. Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. **Biol Fertil Soils**, v. 24, p. 347–352, 1997.

KALAYU, G. Phosphate solubilizing microorganisms: Promising approach as biofertilizers. **International Journal of Agronomy**, v. 2019, 2019.

KAPLAN, J. *et al.* Iron-dependent metabolic remodeling in *S. cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 7, p. 646–651, 2006.

KANNAHI, M.; SENBAGAM, N. Studies on siderophore production by microbial isolates obtained from rhizosphere soil and its antibacterial activity. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 4, p. 1142–1145, 2014.

KAMPRATH, E.J.; WATSON, M.E. Conventional soil and tissue tests for assessing the phosphorus status of soils. In: KHASAWNEH, F.E.; SAMPLES, E.C.;

KAMPRATH, E.J. (Coords.). **The role of phosphorus in agriculture**. Madison: American Society of Agronomy, 1980. p.433-469

KAUFMAN, H.W., KLEINBERG, I., 1979. Studies on the incongruent solubility of hydroxyapatite. **Calcif. Tissue Int.** 27, 143–151

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; MUSARRAT, J. **Phosphate Solubilizing Microorganisms**. 1^a ed. New York: Springer, 2014.

KIM, J. H. *et al.* Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 62, n. 4, p. 600–612, 2002.

KIM, K. *et al.* Effects of organic acids as reducing agents in the synthesis of LiFePO₄. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 504, n. 1, p. 166–170, 2010.

KOSTOV-KYTIN, V. V. *et al.* Powder X-ray diffraction studies of hydroxyapatite and β -TCP mixtures processed by high energy dry milling. **Ceramics International**, v. 44, n. 7, p. 8664–8671, 2018.

KRAEMER, S. M. Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. **Aquatic Sciences**, v. 66, n. 1, p. 3–18, 2004.

KREWULAK, K. D.; VOGEL, H. J. Structural biology of bacterial iron uptake. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1778, n. 9, p. 1781–1804, 2008.

KRISHNA, M. Phosphate Solubilizers. p. 103–111, 2011a.

KRUMINA, L. *et al.* Desorption mechanisms of phosphate from ferrihydrite and goethite surfaces. **Chemical Geology**, v. 427, p. 54–64, 2016.

KUMAR, R. *et al.* Temperature Driven Morphological Changes of Chemically Precipitated Hydroxyapatite Nanoparticles. **Langmuir**, v. 8, n. 18, p. 5196–5200, 2004.

LA MER, V.K. The solubility behavior of hydroxylapatites. **J. Phys. Chem.** 66, 973–978, 1962.

LARSEN, O.; POSTMA, D.; JAKOBSEN, R. The reactivity of iron oxides towards reductive dissolution with ascorbic acid in a shallow sandy aquifer (Rømø, Denmark). **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 70, n. 19, p. 4827–4835, 2006.

LAZO, D. E.; DYER, L. G.; ALORRO, R. D. Silicate, phosphate and carbonate mineral dissolution behaviour in the presence of organic acids: A review. **Minerals Engineering**, v. 100, p. 115–123, 2017.

LATATI, M.; AOUICHE, A.; TELLAH, S.; LARIBI, A.; BENLAHRECH, S.; KACI, G.; OUAREM, F.; OUNANE, S.M. Intercropping maize and common bean enhances microbial carbon and nitrogen availability in low phosphorus soil under Mediterranean conditions. **European Journal of Soil Biology**, v. 80, p.9-18, 2017.

LEMANOWICZ, J. Dynamics of phosphorus content and the activity of phosphatase in forest soil in the sustained nitrogen compounds emissions zone. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 33, p. 33773–33782, 2018.

LENTH, R. v. *et al.* **emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means**. Disponível em: <<https://github.com/rvlenth/emmeans>>. Acesso em: 7 jan. 2021.

LESLIE, A. D.; DANESHFAR, R.; VOLMER, D. A. Infrared Multiphoton Dissociation of the Siderophore Enterobactin and its Fe(III) Complex. Influence of Fe(III) Binding on Dissociation Kinetics and Relative Energetics. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 18, n. 4, p. 632–641, 2007.

LI, G. X. *et al.* Characteristics of Organic Acid Secretion Associated with the Interaction between Burkholderia multivorans WS-FJ9 and Poplar Root System. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

LIERMANN, L. J. *et al.* Role of bacterial siderophores in dissolution of hornblende. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 64, n. 4, p. 587–602, 2000.

LINDSAY, W.L. Phosphates and Sulfur. 168, 281. In: **Chemical Equilibria in Soils**. A Wiley-Interscience publication, 1979.

LIU, H. *et al.* The effect of hydroxyl groups and surface area of hematite derived from annealing goethite for phosphate removal. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 398, p. 88–94, 2013.

LIU, H.; CHEN, T.; FROST, R. L. An overview of the role of goethite surfaces in the environment. **Chemosphere**, v. 103, p. 1–11, 2014.

LOPEZ-ARREDONDO, A.E.; LEYVA-GONZALEZ, M.A.; GONZALEZ-MORALES, S.I.; LOPEZ-BUCIO, J. Phosphate Nutrition : Improving Low-Phosphate Tolerance in Crops. **Ann Rev Plant Biol**, v. 65, p. 95–123, 2014.

LU, C.; TIAN, H. Global nitrogen and phosphorus fertilizer use for agriculture production in the past half century: shifted hot spots and nutrient imbalance. **Earth Syst. Sci. Data Discuss**. p. 181–192, 2017.

MAFE, S., MANZANARES, J.A., REISS, H., THOMANN, J.M., GRAMAIN, P. Model for the dissolution of calcium hydroxyapatite powder. **J. Phys. Chem.**, v. 96, p. 861–866, 1992.

MAHESWAR, N.; SATHIYAVANI, G. Solubilization of phosphate by *Bacillus* Sps, from groundnut rhizosphere (*Arachis hypogaea* L). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 8, p. 4007–4011, 2012

MARGOLIS, H.C.; MORENO, E. C. Kinetics of Hydroxyapatite Dissolution in Acetic, Lactic, and Phosphoric Acid Solutions. **Calcified Tissue International**, v. 50, p. 137–143, 1992.

MARTINO, E. *et al.* Physical and biochemical interactions of soil fungi with asbestos fibers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 938–944, 2004.

MASSENSINI, A. M. *et al.* Solubilização Potencial de Fosfatos Mediada pela Microbiota Rizosférica de Eucalipto Cultivado em Topossequência Típica da Zona da Mata Mineira. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 39, n. 1, p. 692–700, 2015.

MATOS, A.D., I.C. GOMES, S. NIETSCH, A.A. XAVIER, W.S. GOMES, J.A. DOS SANTOS NETO AND M.C. PEREIRA. Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v89, n4: 2945-2954, 2017.

MCLAUCHLAN, K. The nature and longevity of agricultural impacts on soil carbon and nutrients: A review. **Ecosystems**, v. 9, n. 8, p. 1364–1382, 2006.

MEHTA, S.; NAUTIYAL, C. S. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. **Current Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 51–56, 2001.

MENDIBURU, F. de. agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/agricolae/agricolae.pdf>>. Acesso em: 7 jan. 2021.

MENDOZA-CÓZATL, D.G./ GOKUL, A.; CARELSE, M.F.; JOBE, T.O.; LONG, T.A.; KEYSTER, M. Keep talking: crosstalk between iron and sulfur networks fine-tunes growth and development to promote survival under iron limitation. **Experimental Biology**, p. 1–31, 2019.

MEYER, G. *et al.* *Pseudomonas protegens* CHA0 does not increase phosphorus uptake from ³³P labeled synthetic hydroxyapatite by wheat grown on calcareous soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 131, n. July 2018, p. 217–228, 2019.

MIKUTTA, C.; KRETZSCHMAR, R. Synthetic coprecipitates of exopolysaccharides and ferrihydrite. Part II: Siderophore-promoted dissolution. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 72, n. 4, p. 1128–1142, 2008.

MILTON, J. A. *et al.* Hydroxamate Siderophores: Occurrence and Importance in the Atlantic Ocean. v. 42, n. 23, p. 8675–8680, 2008.

MORENO, E. C.; GREGORY, T. M.; BROWN, W. E. Preparation and solubility of hydroxyapatite. **Journal of Research of the National Bureau of Standards Section A: Physics and Chemistry**, v. 72A, n. 6, p. 773, 1968.

MUKHTAR, S. *et al.* Assessment of two carrier materials for phosphate solubilizing biofertilizers and their effect on growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Microbiological Research**, v. 205, n. August, p. 107–117, 2017.

MUSTAFA, G., KOOKANA, R.S., SINGH, B. Desorption of cadmium from goethite: effects of pH, temperature and aging. **Chemosphere** 64, 856–865, 2006

NARSIAN, V.; ABU, A.; PATEL, S. S. M. H. H. Rock phosphate dissolution by specific yeast. n8. March, p. 57–62, 2010.

NAYAK, A. K. Hydroxyapatite synthesis methodologies: An overview. **International Journal of ChemTech Research**, v. 2, n. 2, p. 903–907, 2010.

NEGASSA, W. *et al.* Influence of Specific Organic Compounds on Phosphorus Sorption and Distribution in a Tropical Soil. **Soil Science**, v. 173, n. 9, p. 587–601, 2008.

NEILANDS, J. B. Siderophores : Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds Siderophores : Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds *. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 45, p. 26723–26726, 1995.

NEUMAN, W.F., BAREHAM, B.J.. Evidence for the presence of secondary calcium phosphate in bone and its stabilization by acid production. **Calcif. Tissue Res.** 18, 161–172, 1975.

NEZAT, C. A. *et al.* Mineral Sources of Calcium and Phosphorus in Soils of the Northeastern United States. **Soil Science Society of America Journal**, v. 72, n. 6, p. 1786–1794, 2008.

OBERSON, A.; JONER, E.O. Microbial Turnover of Phosphorus in Soil, Chapter 7. In: **Organic phosphorus in the environment. Organic phosphorus in the environment**. 1^a ed. Australia: CABI publishing, 2005.

OFOEGBU, S. U. Technological Challenges of Phosphorus Removal in High-Phosphorus Ores: Sustainability Implications and Possibilities for Greener Ore Processing. 2019.

OKTYABRSKII, O. N.; SMIRNOVA, G. V. Redox potential changes in bacterial cultures under stress conditions. **Microbiology**, v. 81, n. 2, p. 131–142, 2012.

OTERO-FARIÑA, A. *et al.* Effects of natural organic matter on the binding of arsenate and copper onto goethite. **Chemical Geology**, v. 459, n. February, p. 119–128, 2017.

PATEL, S. *et al.* Transmission electron microscopy analysis of hydroxyapatite nanocrystals from cattle bones. **Materials Characterization**, v. 109, p. 73–78, 2015.

PANHWAR, Q. A.; OTHMAN, R.; MEON, S. Solubilization of Different Phosphate Forms by Solubilizing Bacteria Isolated from Aerobic Rice. **International Journal of Agriculture and Biology**, n. May 2014, 2009.

PARDO, MT; GUADALIX, ME; GARCIA-GONZALES, M. Effect of pH and background electrolyte on P sorption by variable charge soil. **Geoderma**, v. 54, p. 275–284, 1992.

PARIKH, S. J.; MUKOME, F. N. D.; ZHANG, X. ATR-FTIR spectroscopic evidence for biomolecular phosphorus and carboxyl groups facilitating bacterial adhesion to iron oxides. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 119, p. 38–46, 2014.

PARFITT, R. L. Infrared study of phosphate adsorption on goethite. **Journal of the Chemical Society Faraday Transactions 1**, v. 70, n. January, 2019.

PASTORE, G. et al. Microbial release of apatite- and goethite-bound phosphate in acidic forest soils. **Geoderma**, v. 370, n. March, p. 114360, 2020.

PENN, C. J.; CAMBERATO, J. J. A critical review on soil chemical processes that control how soil pH affects phosphorus availability to plants. **Agriculture (Switzerland)**, v. 9, n. 6, p. 1–18, 2019

PERET, B.; DESNOS, T.; JOST, R.; KANNO, S.; BERKOWITZ, O.; NUSSAUME, L. Root architecture responses: in search of phosphate. **Plant Physiol.**, v.166, p.1713-1723, 2014.

PHAM MINH, D. *et al.* Synthesis of calcium hydroxyapatite from calcium carbonate and different orthophosphate sources: A comparative study. **Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology**, v. 177, n. 13, p. 1080–1089, 2012.

PIASECKI, W.; SZYMANEK, K.; CHARMAS, R. Fe²⁺ adsorption on iron oxide: the importance of the redox potential of the adsorption system. **Adsorption**, v. 25, n. 3, p. 613–619, 2019.

PII, Y. *et al.* Plant-microorganism-soil interactions influence the Fe availability in the rhizosphere of cucumber plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 87, n. 1, p. 45–52, 2015.

PLANTE, A. F.; STONE, M. M.; MCGILL, W. B. The Metabolic Physiology of Soil Microorganisms. In: ELDOR, E. P. : **Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry** (pp.245-272), Elsevier Inc.: 4ed, Colorado-USA, 2015.

POSNER, A. M.; NUTRITION, P. Desorption of phosphate from goethite. n. 1977, p. 697–707, 1979.

PRIYADHARSINI, P.; MUTHUKUMAR, T. The root endophytic fungus *Curvularia geniculata* from *Parthenium hysterophorus* roots improves plant growth through phosphate solubilization and phytohormone production. **Fungal Ecology**, v. 27, p.69-77, 2017.

PUENTE, M.E.; LI, C.Y.; BASHAN, Y. Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. **Environ Exp Bot**, v66, 3:389–401, 2009.

PUENTE ME, BASHAN Y, LI CY, L. V. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. **Plant biology**, v. 6, p. 629–642, 2004

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing** Vienna R Foundation for Statistical Computing, , 2021. . Disponível em: <<https://cran.r-project.org/>>.

RAKOVAN, J., HUGHES, J.M. (Eds.), Phosphates: Geochemical, Geobiological, and Materials Importance Mineralogical Society of America, **Reviews in Mineralogy**. 48. pp. 391–425, 2002.

RAMOS, M. E. et al. Effect of lactate, glycine, and citrate on the kinetics of montmorillonite dissolution. **American Mineralogist**, v. 96, n. 5–6, p. 768–780, 2011.

RASUL, M. et al. Phosphate solubilizers as antagonists for bacterial leaf blight with improved rice growth in phosphorus deficit soil. **Biological Control**, v. 136, n. May, p. 103997, 2019.

RAGHOTHAMA, K. G.; KARTHIKEYAN, A. S. Phosphate acquisition. **Plant and soil**, v. 274, p. 37–49, 2005.

REHMAN, I.; BONFIELD, W. Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1–4, 1997.

REICHARD, P. U.; KRETZSCHMAR, R.; KRAEMER, S. M. Dissolution mechanisms of goethite in the presence of siderophores and organic acids. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 71, n. 23, p. 5635–5650, 2007.

RHEINHEIMER, D. S., ANGHINONI, I., KAMINSKI, J. Depletion of Inorganic Phosphorus Fractions By Successive Extraction With Resin in Different Soils and Management Systems. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 24, n. 1, p. 345–354, 2000.

RENELLA, G.; LANDI, L.; NANNIPIERI, P. Degradation of low molecular weight organic acids complexed with heavy metals in soil. **Geoderma**, v. 122, n. 2- 4 SPEC. IIS., p. 311–315, 2004.

REYES, I.; VALERY, A.; VALDUZ, Z. Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. **Plant and Soil**, v. 287, n. 1–2, p. 69–75, 2006.

RITA, J. C. O. et al. Mineralization of organic phosphorus in soil size fractions under different vegetation covers in the north of Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 37, n. 5, p. 1207–1215, 2013.

RODRIGUEZ, H. ; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotech Adv.**, v. 17, p. 319–359, 2000.

RODRÍGUES, H; FRAGA, R.; BASHAN Y. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. **Dev plant Soil Sci**. Springer; p. 15–21, 2007.

ROLFE, M. D. *et al.* Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 3, p. 686–701, 2012.

ROLIM NETO, FC; SCHAEFER, CEGR; COSTA, LM; CORRÊA, MM; FERNANDES FILHO, EI; IBRAIMO M. Adsorção de fósforo, superfície específica e atributos mineralógicos em solos desenvolvidos de rochas vulcânicas do Alto Paranaíba (MG). **Rev Bras Cienc do Solo**. v.28:953–964, 2004.

ROOTARE, F. H.M., DEITZ, V.R., CARPENTER, F.G. Solubility product phenomena in hydroxyapatite water systems. **J. Colloid Sci**. 17, 179–206, 1962.

RUAN, H. D.; FROST, R. L.; KLOPROGGE, J. T.; DUONG, L. Infrared spectroscopy of goethite dehydroxylation : III . FT-IR microscopy of in situ study of the thermal transformation of goethite to hematite. **Spectrochimica Acta Par**, v. 58, p. 967–981, 2002.

SABATÉ, D. C. et al. Decrease in the incidence of charcoal root rot in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Bacillus amyloliquefaciens* B14, a strain with PGPR properties. **Biological Control**, v. 113, p. 1–8, 2017.

SADEGHALVAD, B. et al. Sorption, mechanism, and behavior of sulfate on various adsorbents: A critical review. **Chemosphere**, v. 263, 2021.

SAEID, A.; PROCHOWNIK, E.; DOBROWOLSKA-IWANIEK, Phosphorus Solubilization by *Bacillus* Species. *J. molecules*, v.23, n11, p2897-2915, 2018

SANTOS, M. L. *et al.* Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. **Ecl.Quimica**, v. 30, p. 29–35, 2005.

SHAFIGH, M.; HAMIDPOUR, M.; FURRER, G. Zinc release from Zn-Mg-Fe(III)-LDH intercalated with nitrate, phosphate and carbonate: The effects of low molecular weight organic acids. **Applied Clay Science**, v. 170, n. August 2018, p. 135–142, 2019.

SHARMA, K.; GARG, V. K. **Solid-State Fermentation for Vermicomposting**. [s.l.] Elsevier B.V., 2018.

SASHIDHAR, B.; PODILE, A. R. Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 1, p. 1–12, 2010.

SCHAETZL, R.; ANDERSON, S. *Soils. Genesis and Geomorphology*. Cambridge University Press, New York, 818 p., 2005

SCHLESINGER, W. H.; BERNHARDT, E. S. *The Lithosphere*. **Biogeochemistry**, n. x, p. 93–133, 2013.

SCHMITT, D. E. et al. Formation of ternary organic acids-Fe-P complexes on the growth of wheat (*Triticum aestivum*). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 22, n. 10, p. 702–706, 2018.

SCHRODER, J.J.; CORDELL, D., SMIT, A.L., ROSEMARIN, A. **Sustainable Use of Phosphorus**. 1. ed. Wageningen: DLO Foundation, 2010.

SCHWERTMANN, U. Solubility and dissolution of iron oxides. **Plant and Soil**, v. 130, n. 1–2, p. 1–25, 1991.

SCHWERTMANN, U.; MURAD, E. Effect of pH on the formation of goethite and time. **Clay and Clay mineralogy**. v. 31, n. 4, p. 277–284, 1983.

SCHWERTMANN, U.; TAYLOR, R. M. Chapter 8: : Minerals in Soil Environments In **The Iron Oxides: Structure, Reaction, Occurrence and Uses**. 2^a ed. Verlag: Wiley-VCH GmbH &Co. KGaA, 2003.

SCHWERTMANN, U.; CARLSON, L.; MURAD, E. Properties of iron oxides in two finnish lakes in relation to the e n v i r o n m e n t of their formation. **Clays and Clay Minerals**, v. 35, n. 4, p. 297–304, 1987.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal CAS assay for the detection and determination of siderophores. **Anal. Biochem.**, v. 160, p. 47–60, 1987.

SHEN, Y. et al. Low-molecular organic acids in the rhizosphere soil solution of beech forest (*Fagus sylvatica* L.) Cambisols determined by ion chromatography using supported liquid membrane enrichment technique. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, n. 9, p. 1163–1169, 1996.

SHI, X. K.; MA, J. J.; LIU, L. J. Effects of phosphate-solubilizing bacteria application on soil phosphorus availability in coal mining subsidence area in shanxi. **Journal of Plant Interactions**, v. 12, n. 1, p. 137–142, 2017.

SINGH, D. P.; SINGH, H. B.; PRABHA, R. Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity: Vol. 1: Research perspectives. **Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 1: Research Perspectives**, n. February, p. 1–343, 2016.

SØNDERGAARD, M. **Redox Potential**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2009. v. 12
SPOHN, M.; KUZUYAKOV, Y. Phosphorus mineralization can be driven by microbial need for carbon. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 61, p. 69–75, 2013

SOUCHIE, E. L. *et al.* Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido. **Pesq. Agropec. Bras.** v.40 n.11, p. 1149–1152, 2005.

SRIDEVI, M.; MALLAIAH, K. V. Phosphate solubilization by Rhizobium strains. **Indian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 98–102, 2009.

SRINIVASAMURTHY, R.; DAYAMANI, K. J. Characterization of Mineral Phosphate Solubilizing. **Int Journal of Scientific And Research Pub**, v. 4, n. 8, p. 8–11, 2014.

SRIVIDYA, A. R.; KATTA, R.; VISHNUVARTHAN, V. J. Original Research Article Isolation , identification , bioprocessing and characterization of secondary metabolites for its antimicrobial and genotoxicity from the soil screened microorganism. v. 3, n. 4, p. 694–708, 2014.

STUMM, W.; FURRER, G. The dissolution of oxides and aluminum silicates, examples of surface -coordination-Controlled kinetics. In: **Aquatic Surface chemistry**. 1. ed. New York: Wiley & Sons, 2000. p. 230.

ŠTUMPF, S. *et al.* Generation Times of E. coli Prolong with Increasing Tannin Concentration while the Lag Phase Extends Exponentially. **Plants**, v. 9, n. 12, p. 1680, 1 dez. 2020.

SUSILOWATI, L. E.; KUSUMO, B. H.; ARIFIN, Z. Screening of the drought tolerant phosphate solubilizing bacteria in dissolving P-inorganic. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1402, n. 5, 2019.

SVERDRUP, H. Chemical weathering of soil minerals and the role of biological processes. **Fungal Biology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 94–100, 2009.

SWAIN, M. R.; LAXMINARAYANA, • K; RAY, R. C. Phosphorus Solubilization by Thermotolerant Bacillus subtilis Isolated from Cow Dung Microflora. [s.d.].

SWINNEN, I. A. M. *et al.* Predictive modelling of the microbial lag phase: A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 2, p. 137–159, 15 jul. 2004.

SYLVESTER-BRADLEY, R. *et al.* Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 12, n. 1, p. 15–22, 1982.

TADANIER, C. J.; EICK, M. J. Formulating the Charge-distribution Multisite Surface Complexation Model Using FITEQL. **Soil Science Society of America Journal**, v. 66, n. 5, p. 1505, 2002.

TEAM RSTUDIO. **RStudio: Integrated Development for R** BostonRStudio, , 2021. .
Disponível em: <<http://www.rstudio.com/>>.

THOMANN, J.M., VOEGEL, J.C., GRAMAIN, P., 1993. Kinetics of dissolution of calcium hydroxyapatite powder IV. Interfacial calcium diffusion-controlled process. **J. Colloid Interface Sci.** 157, 369–374.

TORRENT, J; BARRON, V; SCHWERTMANN, U. Phosphate adsorption and desorption by goethites differing in crystal morphology. **Soil Science**, v. 54, p. 1007–1012, 1990.

TURNER, B.L.; CONDRON, L.M.; RICHARDSON, S.J.; PELTZER, D.A.; ALLISON, V.J. Soil organic phosphorus transformations during pedogenesis. **Ecosystems**, v.10, p.1166-118, 2007.

TURNER, B.L.; LALIBERTE, E. Soil development and nutrient availability along a 2 million-year coastal dune chronosequence in Southwestern Australia. **Ecosystems**, v.18, p.287-309, 2015.

USEPA. SW-846 EPA method 3051A. Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils and oils. In: **Test methods for evaluating solid waste**, 3rd Update. Washington: US Environmental Protection Agency, 1998.

VALSAMI-JONES, E. *et al.* The dissolution of apatite in the presence of aqueous metal cations at pH 2-7. **Chemical Geology**, v. 151, n. 1–4, p. 215–233, 1998.

VAN HEES, P. A. W. *et al.* Low molecular weight organic acid adsorption in forest soils: Effects on soil solution concentrations and biodegradation rates. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, n. 8, p. 1015–1026, 2003.

VARANDA, L. C. *et al.* Monodispersed spindle-type goethite nanoparticles from Fe(III) solutions Monodispersed spindle-type goethite nanoparticles from Fe(III) solutions. n. November, 2002.

VARGAS, S. *et al.* Dynamic light scattering: A fast and reliable method to analyze bacterial growth during the lag phase. **Journal of Microbiological Methods**, v. 137, p. 34–39, 1 jun. 2017.

VILLACÍS-GARCÍA, M. *et al.* Laboratory synthesis of goethite and ferrihydrite of controlled particle sizes. n. lli, 2015.

VILLALOBOS, M.; TROTZ, M. A.; LECKIE, J. O. Variability in goethite surface site density : evidence from proton and carbonate sorption. v. 268, p. 273–287, 2003.

WALPOLA, B. C., AND YOON, M.-H. Phosphate solubilising bacteria: assessment of their effect on growth promotion and phosphorus uptake of mung bean (*Vigna radiata* L.). **Chil. J. Agric. Res.** 73, 275–281, 2013.

WANG, D. *et al.* Effects of low-molecular-weight organic acids on the dissolution of hydroxyapatite nanoparticles. **Environmental Science: Nano**, v. 3, n. 4, p. 768–779, 2016.

WANG, D. *et al.* Effects of low-molecular-weight organic acids on the dissolution of hydroxyapatite nanoparticles. **Environmental Science: Nano**, v. 3, n. 4, p. 768–779, 2016c.

WANG, Z. *et al.* Ligand-Promoted Photoreductive Dissolution of Goethite by Atmospheric Low-Molecular Dicarboxylates. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 121, n. 8, p. 1647–1656, 2017.

WANG, Y. Y. *et al.* Identification of phosphate-solubilizing microorganisms and determination of their phosphate-solubilizing activity and growth-promoting capability. **BioResources**, v. 15, n. 2, p. 2560–2578, 2020.

WEBER, K. A.; ACHENBACH, L. A.; COATES, J. D. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. **Nature Reviews**, v. 4, n. iii, p. 752–764, 2006.

WELCH, S. A.; TAUNTON, A. E.; BANFIELD, J. F. Effect of microorganisms and microbial metabolites on apatite dissolution. **Geomicrobiology Journal**, v. 19, n. 3, p. 343–367, 2002.

WENG, L.; VAN RIEMSDIJK, W. H.; HIEMSTRA, T. Factors Controlling Phosphate Interaction with Iron Oxides. **Journal of Environmental Quality**, v. 41, n. 3, p. 628–635, 2012.

WEI, S. Y. *et al.* Surface properties and phosphate adsorption of binary systems containing goethite and kaolinite. **Geoderma**, v. 213, p. 478–484, 2014.

WEI, W. *et al.* Interaction between low molecular weight organic acids and hydroxyapatite with different degrees of crystallinity. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 392, n. 1, p. 67–75, 2011.

WEI, Y. *et al.* Effect of organic acids production and bacterial community on the possible mechanism of phosphorus solubilization during composting with enriched phosphate-solubilizing bacteria inoculation. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 190–199, 2018.

WU, Q.; BISHOP, P. L.; KEENER, T. C. Biological Phosphate Uptake and Release: Effect of pH and Magnesium Ions. v. 78, n. 2, 1999

XIAO, C. Q. *et al.* Optimization for rock phosphate solubilization by phosphate-solubilizing fungi isolated from phosphate mines. **Ecological Engineering**, v. 33, n. 2, p. 187–193, 3 jun. 2008.

XU, C. *et al.* Immobilization of heavy metals in vegetable-growing soils using nano zero-valent iron modified attapulgite clay. **Science of the Total Environment**, v. 686, p. 476–483, 10 out. 2019.

YAN, L. G. *et al.* Adsorption of phosphate from aqueous solution by hydroxy-aluminum, hydroxy-iron and hydroxy-iron-aluminum pillared bentonites. **Journal of Hazardous Materials**, v. 179, n. 1–3, p. 244–250, 2010.

YAN, Z. *et al.* Effect of different Bacillus strains on the profile of organic acids in a liquid culture of Daqu. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 119, n. 1–2, p. 78–83, 2013.

ZAPATA-HERNÁNDEZ, R. **Química De Los Procesos Pedogeneticos**. 1. ed. Medellín: UNAL-Medellin, 2002.

ZHANG, H.; LI, S.; YAN, Y. Dissolution behavior of hydroxyapatite powder in hydrothermal solution. **Ceramics International**, v. 27, n. 4, p. 451–454, 2001.

ZHANG, X. *et al.* Goethite dispersed corn straw-derived biochar for phosphate recovery from synthetic urine and its potential as a slow-release fertilizer. **Chemosphere**, v. 262, p. 127861, 2020.

ZHANG, B. *et al.* Phosphorus mediates soil prokaryote distribution pattern along a small-scale elevation gradient in Noijin Kangsang Peak, Tibetan Plateau. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 95, n. 6, p. 1–12, 2019.

ZHAO, X. *et al.* Elucidating the sources of activity and stability of Fe-P electrocatalyst for hydrogen evolution reactions in acidic and alkaline media. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 260, n. August 2019, p. 118156, 2020.

ZHONG, B. *et al.* Proton interaction in phosphate adsorption onto goethite. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 308, n. 1, p. 40–48, 2007a.

ZHU, J.; LI, M.; WHELAN, M. Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. **Science of the Total Environment**, v. 612, n. December, p. 522–537, 2018.

ZÚÑIGA-SILGADO, D. *et al.* Soil type affects organic acid production and phosphorus solubilization efficiency mediated by several native fungal strains from Mexico. **Microrganisms**, v. 8, n. 9, p. 1–17, 2020.