



Universidade Federal  
de São João del-Rei

**CAROLINE DOS SANTOS MARTINS GUIEIRO**

**EFICIÊNCIA DE MICRORGANISMOS PARA BIODISSOLUBILIZAÇÃO  
DE AGROMINERAIS SILICÁTICOS *IN VITRO***

**SETE LAGOAS  
2022**

**CAROLINE DOS SANTOS MARTINS GUIEIRO**

**EFICIÊNCIA DE MICRORGANISMOS PARA BIODISSOLUBILIZAÇÃO  
DE AGROMINERAIS SILICÁTICOS *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias, da Universidade Federal de São João del-Rei, *Campus* Sete Lagoas, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre, em Ciências Agrárias, na área de concentração em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Ivanildo Evódio Marriel  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Vera Maria Alves

**SETE LAGOAS  
2022**

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)  
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

292e Guieiro, Caroline dos Santos Martins.  
EFICIÊNCIA DE MICRORGANISMOS PARA  
BIOSOLUBILIZAÇÃO DE AGROMINERAIS SILICÁTICOS IN  
VITRO / Caroline dos Santos Martins Guieiro ;  
orientador Ivanildo Evódio Marriel; coorientadora  
Vera Maria Alves . -- Sete Lagoas, 2022.  
70 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Agrárias) -- Universidade Federal de São  
João del-Rei, 2022.

1. Minerais silicáticos. 2. Potássio. 3.  
Solubilização. I. Evódio Marriel, Ivanildo , orient.  
II. Maria Alves , Vera , co-orient. III. Título.

**CAROLINE DOS SANTOS MARTINS GUIEIRO**

**EFICIÊNCIA DE MICRORGANISMOS PARA BIOSOLUBILIZAÇÃO  
DE AGROMINERAIS SILICÁTICOS *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias, da Universidade Federal de São João del-Rei, *Campus* Sete Lagoas, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre, em Ciências Agrárias, na área de concentração em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Ivanildo Evódio Marriel  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Vera Maria Alves

Sete Lagoas, 22 de julho de 2022.

Banca examinadora:

Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia Ferreira Simeone - EMBRAPA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Alcantara dos Santos - UFSJ

---

Prof. Dr. Ivanildo Evódio Marriel  
Orientador - EMBRAPA

## **EPÍGRAFE**

“ Ama-se mais o que se conquista com esforço”.

Benjamin Disraeli

## DEDICATÓRIA

À Deus, que me deu força e sabedoria, para concluir essa etapa, e ao meu filho Benício, aos meus pais Washington e Claudia, e, ao meu marido Rafael, os amores da minha vida.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

À Deus, criador perfeito, responsável por tudo.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias (PPGCA), pela oportunidade de realização do mestrado.

À UFSJ, pela concessão da bolsa de estudos.

À EMBRAPA - Milho e Sorgo, por permitir que eu utilizasse sua estrutura física, para a realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Ivanildo Evódio Marriel, meu orientador, pela especial orientação, pela disponibilidade em ensinar, pela paciência e por todo incentivo e confiança.

À minha coorientadora, Dr<sup>a</sup>. Vera Maria Alves, a quem tenho profunda admiração, pela imensa colaboração, pelo acompanhamento e pelo apoio no desenvolvimento da pesquisa. Sobretudo, pelos valiosos ensinamentos e confiança.

À equipe do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo, pela troca de experiências e por todo auxílio, em várias etapas do trabalho.

À Fabiane, pelo auxílio nas análises de Potássio, e principalmente, pela amizade.

À equipe do Núcleo de Biologia Aplicada, pelo suporte nas análises moleculares, em especial ao Dr. Ubiraci e à Ariana.

À Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia Ferreira Simeone e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane, pelo auxílio com as análises de ácidos orgânicos, pela disponibilidade de participação, na banca examinadora da defesa de minha Dissertação e ainda, pela valorosa contribuição dada.

Às pessoas mais importantes da minha vida: Deus, Benício, meu pingô de ouro, meus pais e meu marido, por todo amor, pela paciência e pelo apoio.

À todos que estiveram presentes, nessa etapa da minha vida, e contribuíram para elaboração desse trabalho, de diferentes formas, minha gratidão.

## SUMÁRIO

RESUMO: .....	I
ABSTRACT: .....	II
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 O Solo como Habitat dos microrganismos .....	13
2.2 Potássio no sistema solo e planta.....	14
2.3 Minerais silicáticos como fonte de potássio .....	15
2.4 Microrganismos solubilizadores de potássio e mecanismos envolvidos.....	17
2.5 Identificação molecular dos microrganismos .....	19
3. OBJETIVO GERAL.....	20
3.1 Objetivos Específicos .....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 <i>Screening</i> preliminar, para seleção de microrganismos, solubilizadores de potássio .....	20
4.2 Solubilização de potássio, em meio sólido, contendo duas rochas silicáticas.....	21
4.3 Eficiência de biossolubilização de potássio, em meio líquido, por bactérias e por fungos. .....	22
4.4 Influência de concentrações e de tipos de fontes de carbono, na biossolubilização de Verdete de Abaeté .....	22
4.5 Eficiência de biossolubilização de K, em meio líquido, com teor de 2% glicose, por bactérias e por fungos .....	23
4.6 Produção de biofilme, por bactérias e por fungos, em meio líquido .....	23
4.7 Produção de exopolissacarídeos (EPS), por bactérias e por fungos .....	24
4.8 Produção de auxinas (AIA), por bactérias e por fungos.....	25
4.9 Quantificação de ácidos orgânicos, produzidos por fungos e bactérias .....	26
4.10 Extração de DNA e Sequenciamento de Bactérias e de Fungos .....	26
4.10.1 Extração de DNA das Bactérias .....	26
4.10.2 Extração do DNA dos Fungos.....	27
4.10.3 Identificação molecular das estirpes .....	28
4.11 Análises Estatísticas .....	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
5.1 <i>Screening</i> preliminar, para seleção de microrganismos, solubilizadores de potássio.....	29
5.2 Solubilização de potássio, em meio sólido, a partir de Verdete Abaeté e de Biotita Xisto.. .....	30
5.3 Eficiência de biossolubilização, de potássio, em meio líquido .....	32

5.4 Influência de concentrações e de tipos de fontes de carbono, na biossolubilização de Verdete de Abaeté .....	36
5.5 Solubilização de potássio, em meio líquido, com Verdete de Abaeté e com Biotita Xisto, com teor de 2% glicose.....	41
5.6 Produção de exopolissacarídeos (EPS), por bactérias e por fungos .....	44
5.7 Avaliação qualitativa da produção de biofilme, por bactérias e por fungos.....	45
5.8 Produção de AIA - Ácido Indol-acético, por bactérias e por fungos .....	47
5.9 Produção de ácidos orgânicos, por bactérias e por fungos .....	49
5.10 Identificação molecular em bactérias e em fungos.....	58
6. CONCLUSÕES .....	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62

## EFICIÊNCIA DE MICRORGANISMOS PARA BIOSOLUBILIZAÇÃO DE AGROMINERAIS SILICÁTICOS *IN VITRO*

**RESUMO:** A demanda de potássio (K), para a produção agrícola brasileira, é elevada e grandes doses desse fertilizante, devem ser adicionadas ao solo, em particular no cerrado, para a obtenção de altas produtividades. O suprimento desta demanda depende em sua totalidade, de insumos importados, que vem onerando os custos de produção. Como alternativas promissoras de fonte deste nutriente, destaca-se a biossolubilização de agrominerais, do território brasileiro. Nesse trabalho, procurou-se avaliar, selecionar e identificar microrganismos eficientes, na biossolubilização das rochas silicáticas Verdete de Abaeté e Biotita Xisto, *in vitro*. Inicialmente, foram avaliados 150 microrganismos isolados, sendo 75 de bactérias, e 75 de fungos, pertencentes à Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) - Milho e Sorgo, quanto à capacidade de solubilização de K, em meio de cultura sólido, contendo silicato de alumínio e K, como fonte de K. Em seguida, a eficiência de solubilização, de 22 estirpes de microrganismos, compostas de fungos e de bactérias, pré-selecionadas, foram avaliadas em meios de culturas líquidos, utilizando-se duas rochas silicáticas, como fonte de K, variando fontes de carbono, em alguns casos. Analisaram-se ainda metabólitos, associados à promoção de crescimento vegetal, produção de AIA (ácido indolacético), de EPS (exopolissacarídeos), de biofilme e de ácidos orgânicos, como mecanismos envolvidos. Como resultados, observou-se que a eficiência de biossolubilização de rochas silicáticas e demais parâmetros analisados variaram em função do tipo de rocha e do genótipo de microrganismos. Para índice de biossolubilização, em meio sólido, encontrou-se valores entre 0 e 6,33 para a rocha Verdete de Abaeté, e de 0 e 8,17, para Biotita Xisto. Em meio líquido, a eficiência de biossolubilização oscilou ( $p < 0,05$ ) entre 1,2 e 11,53 mg L<sup>-1</sup> e 0 e 53,73 mg L<sup>-1</sup>, para bactéria, na presença das rochas Verdete e Biotita, respectivamente. Enquanto que, para fungos, observou-se valores variando de 0 a 70,13 mg L<sup>-1</sup> e de 1,27 a 87,73, para Verdete e para Biotita, respectivamente. Para bactéria, a identificação molecular dos isolados, revelou predominância dos gêneros *Burkholderia* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp., *Azospirillum* sp. e *Stenotrophomonas* sp., e os gêneros *Aspergillus* sp., *Talaromyces* sp. e *Penicillium* sp., entre fungos. Entre bactérias, as estirpes B30 e B116 (*Burkholderia* sp.), B2096 e B1931 (*Pantoea* sp.) e B1485 (*Pseudomonas* sp.) foram as mais eficientes, na presença das rochas Verdete e Biotita, respectivamente. Entre os fungos, os isolados F22 e F18 (*Aspergillus* sp.), apresentaram maior eficiência na solubilização, independente do tipo de rocha. A detecção dos metabólitos analisados foi observada, na maioria dos microrganismos testados, sendo que sua produção variou em função do tipo de rocha. Dentre os ácidos orgânicos, encontrou-se a seguinte ordem na produção de ácido cítrico > ácido oxálico > gluconico > acético. Concluiu-se ainda, que a eficiência de solubilização de K. varia em função de cada isolado, e da mineralogia da rocha utilizada, sendo a Biotita superior, em relação ao suprimento de K. Dentre os microrganismos analisados, as bactérias dos gêneros *Burkholderia* sp. (B30 e B116) e *Pantoea* sp (B2096 e B1931) e B1485 (*Pseudomonas* sp.), e os fungos, do gênero *Aspergillus* (F22 e F18), foram considerados como promissores.

**Palavras chaves:** Minerais silicático. Potássio. Solubilização.

## EFFICIENCY OF MICROORGANISMS FOR BIOSOLUBILIZATION OF SILICATE AGROMINERALS *IN VITRO*

**ABSTRACT:** The demand for potassium (K) for Brazilian agricultural production is high and doses of this fertilizer must be added to the soil, particularly in the Cerrado, to obtain high yields. The supply of this demand depends entirely on imported inputs, which have been increasing production costs. As a promising alternative source of this nutrient, the biosolubilization of agrominerals in the Brazilian territory stands out. In this work, we tried to evaluate, select and identify efficient microorganisms in the biosolubilization of the silica rock Verdete de Abaeté and Biotita Xisto, *in vitro*. Initially, 75 isolates of bacteria and 75 of fungi, belonging to the Collection of Multifunctional Microorganisms of Embrapa Corn and Sorghum, were evaluated for their ability to solubilize K in solid culture medium containing aluminum silicate and K as a source of K. Then, the efficiency of 22 pre-selected strains of microorganisms, fungi and bacteria were evaluated in liquid culture media, using two silica rocks as K source, varying carbon sources, in some cases. Metabolites associated with the promotion of plant growth, production of AIA (indole-acetic acid), EPS (exopolysaccharides), biofilm, organic acids, were also analyzed as mechanisms involved. As a result, it was observed that the efficiency of biosolubilization of silicate rocks and other parameters analyzed varied according to the type of rock and the genotype of microorganisms. For the biosolubilization index in solid medium, values between 0 and 6.33 were found for verdete rock and between 0 and 8.17 for Biotite Xisto. In liquid medium, the biosolubilization efficiency ranged ( $p < 0.05$ ) between 1.2 and 11.53 mg L<sup>-1</sup> and 0 and 53.73 mg L<sup>-1</sup>, for bacteria in the presence of Verdete and Biotite rocks, respectively. While for fungi, values ranging from 0 to 70.13 mg L<sup>-1</sup> and from 1.27 to 87.73 were observed for Verdete and Biotita, respectively. For bacteria, the molecular identification of the isolates indicated a predominance of the genera *Burkholderia* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp., *Azospirillum* sp. and *Stenotrophomonas* sp. and the genera *Aspergillus* sp., *Talaromyces* sp. and *Penicillium* sp. among fungi. Among bacteria, strains B30 and B116 (*Burkholderia* sp.), B2096 and B1931 (*Pantoea* sp.) and B1485 (*Pseudomonas* sp.) were the most efficient, in the presence of Verdete and Biotita rocks, respectively. Among the fungi, isolates F22 and F18 (*Aspergillus* sp.) showed greater efficiency in solubilization, regardless of the type of rock. The detection of the analyzed metabolites was observed in most of the tested microorganisms, and their production varied according to the type of rock. Among the organic acids, the following order was found in the production of citric acid > oxalic acid > gluconic > acetic acid. It is also concluded that the efficiency of K solubilization varies according to each isolate and the mineralogy of the rock used, with Biotite being superior in relation to the supply of K. Among the microorganisms, the bacteria of the *Burkholderia* sp. (B30 and B116) and *Pantoea* sp (B2096 and B1931) and B1485 (*Pseudomonas* sp.) and the fungi of the genus *Aspergillus* (F22 and F18) were considered promising.

**Key words:** Silicate minerals. Potassium. Solubilization.

## 1. INTRODUÇÃO

O agronegócio brasileiro, tem apresentado crescimento contínuo na produção de alimentos, sendo o Brasil, o 4º maior produtor de grãos (arroz, cevada, soja, milho e trigo) do mundo, atrás apenas da China, dos Estados Unidos e da Índia, além de ser o responsável por 7,8% da produção mundial, se tornando uma superpotência agrícola, devido à abundância de terras, às condições edafoclimáticas e à tecnologia agrícola disponível (EMBRAPA, 2021).

Para atender à elevada demanda de nutrientes, para a produção agrícola brasileira, altas doses de fertilizantes devem ser adicionadas ao solo, em particular aos de cerrado, que são ácidos e pobres em nutrientes (OLIVEIRA et al. 2019). O Brasil ocupa a posição de quarto maior consumidor mundial de fertilizantes, atrás da China, da Índia e dos Estados Unidos, e importa 97% do potássio, 63% do fósforo e 70% dos nitrogenados (SAGA CONSULTORIA, 2021). Dessa forma, o país possui elevada dependência externa em relação a insumos agrícolas, o que além, de onerar os custos de produção, deixa a agricultura vulnerável às oscilações do mercado externo.

Em 2020, foram importados 29,4 milhões de toneladas de fertilizantes, desse total, 11,4 milhões de toneladas, foram de cloreto de potássio (KCl), levando a um aumento de 12%, em relação ao ano de 2019 (ALVES et al. 2021). Isso compromete a sustentabilidade, da produção agrícola nacional, acentuada por crises geopolíticas, como o conflito entre Rússia e Ucrânia, que vem afetando a disponibilidade de insumos e a oferta de alimentos, em termos globais. Assim, torna-se estratégico, a prospecção de novas fontes de potássio, provenientes de rochas nacionais, que contribuam para o aumento do suprimento interno, deste nutriente.

Estudos sobre o uso de fontes alternativas de K, vem evidenciando, desde as décadas de 70 e de 80, a ocorrência de diferentes classes de rochas, contendo quantidades razoáveis de nutrientes, e que podem ser promissoras, como fontes alternativas de K, para o uso agrícola (COELHO, 2005, MARTINS et al. 2015, ALVES et al. 2021).

Também, outros estudos demonstram que o uso de microrganismos é capaz de promover a solubilização de agrominerais, disponibilizando nutrientes às plantas (MARTINS et al. 2015), e que diferentes grupos funcionais, incluindo bactérias e fungos, são propícios para agregar valor a rochas silicáticas (SILVA et al. 2015, LOPES-ASSAD et al. 2006).

A interação microrganismo-rocha, vem se constituindo numa das estratégias exploradas, para melhor aproveitamento destes minerais, na agricultura. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi selecionar e caracterizar, bactérias e fungos, solubilizadoras de K, *in vitro*, com

potencial para solubilização, de pó de rochas Verdete de Abaeté e Biotita Xisto, bem como, para avaliação dos mecanismos envolvidos.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 O Solo como Habitat dos microrganismos**

O habitat solo, abriga inúmeras populações de microrganismos (fungos, bactérias), e é considerado um reservatório importante, em termos de diversidade genética (CARDOSO et al. 1992).

Os solos são estruturados de maneira heterogênea, o que possibilita a ocorrência de micro-habitats, que irão variar entre si, em função das suas características físicas e químicas, e da disponibilidade de nutrientes (CARDOSO et al. 2016). Essa formação, dos micro-habitats, encontra-se associada com a formação de agregados de solo, que são formados por proporções de areia, de argila e de silte, que dão suporte físico para a aderência microbiana e que proporcionam condições diferenciadas de aeração e disponibilidade de nutrientes, permitindo a existência de microrganismos, com capacidades metabólicas diferentes (DUCHIELLA et al. 2013).

A abundância média de microrganismos, nos solos, varia entre  $10^7$  a  $10^9$ , células vivas por grama de solo (ALEXANDER, 1977). Cerca de 160.000 espécies de microrganismos são conhecidas e descritas na literatura e, em média, 1700 novas cepas, de fungos e 120 de bactérias, são descobertas e nomeadas anualmente. No entanto, estima-se que apenas cerca de 10%, das espécies microbianas existentes, tenham sido descobertas e identificadas (COUTINHO et al. 2001).

Os organismos que habitam o solo, possuem funções de suma importância para a estabilidade e para a sustentabilidade de ecossistemas, tais como a degradação de compostos orgânicos e a ciclagem de nutrientes (GILLER, 1996), e outras mais específicas, como a fixação biológica de nitrogênio (RAYMOND et al. 2004), a promoção de crescimento (FLIESSBACH et al. 2009), ou o auxílio na absorção de nutrientes, pelas plantas (CHAGNON et al. 2013).

A diversidade genética e funcional, de comunidades microbianas do solo, é diretamente relacionada com um conjunto de fatores abióticos (atmosfera, temperatura, água, pH, potencial

redox, fontes nutricionais, matéria orgânica) e bióticos (genética microbiana, interação entre os microrganismos, entre outros) (CARDOSO et al. 2016).

## 2.2 Potássio no sistema solo e planta

Dentre os macronutrientes, o potássio (K) é o segundo elemento consumido, em quantidade mais elevada pelas plantas, desempenhando função importante na ativação de mais de 60 enzimas, envolvidas em diversos processos metabólicos, como fotossíntese, síntese de proteínas, transporte e armazenamento de carboidratos, tendo influência direta no balanço hídrico, e sendo responsável por ativar a maturação e favorecer a formação dos grãos (DALCIN 2008). Além disso, o K está também envolvido, no metabolismo de carboidratos, de gorduras, de ácidos, de compostos nitrogenados, e na síntese de proteínas, melhorando a tolerância ao frio e a resistência, à seca das plantas (SATTAR et al. 2019). É absorvido pelas plantas na forma de ion  $K^+$ .

O K, está presente no solo, em diferentes formas: i) K solúvel em água: é o K presente na solução do solo, absorvido pelas plantas e pelos microrganismos, e corresponde apenas a 0,1% - 0,2% do K, total do solo; ii) K trocável: está em equilíbrio com o K solúvel, representa cerca de 1% a 2% do K no solo, e é tido como a reserva, prontamente, disponível às plantas. iii) K não trocável: retido nos sítios de troca, nas camadas dos argilominerais ou em minerais primários; IV) K estrutural: está presente em formas não trocáveis, em estrutura cristalina de minerais, como o feldspato e a mica. As formas estruturais e não trocáveis, são consideradas fontes de K, indisponíveis para plantas, podendo, entretanto, contribuir significativamente, para o abastecimento da planta, a longo prazo (ZORB et al. 2014).

De modo geral, a absorção de K, por via radicular, pode se dar por três diferentes processos: i) Interceptação radicular: ao se desenvolver, a raiz encontra o K, na solução do solo; ii) Fluxo de massa: o K é transportado no solo, por uma fase aquosa móvel, a favor do gradiente de umidade, de uma região mais úmida e distante da raiz, para outra mais seca e próxima da raiz; iii) Difusão: o K se movimenta no solo, dentro de uma fase aquosa estacionária, a mesma solução do solo, a favor do gradiente de concentração, de uma região de maior concentração, para uma região de menor concentração, na superfície da raiz, sendo esse, o processo dominante mais comum de absorção, de K, pelas plantas (MALAVOLTA, 2005).

Após ser absorvido pela raiz, o K chega ao xilema, via apoplasto (parede celular e espaços intercelulares), ou simplastos, conjunto de citoplasmas interligados pelos plasmodesmas. A redistribuição interna do K, ocorre do floema das folhas, para outros órgãos (regiões de crescimento e de armazenamento), e de tecidos mais velhos, para tecidos mais novos (MALAVOLTA, 2005).

Por não se ligar, a nenhum composto orgânico estrutural da planta, o K, torna-se facilmente perdido pelas folhas, por lavagem (COLA et al. 2012, MIRANDA 2016). Assim, as baixas concentrações de K solúvel, nos solos tropicais, tornam necessário o uso de fertilizantes potássicos, a fim de suprir as exigências nutricionais das plantas, e obter altas produtividades das culturas (LODI, 2020). Estes fatos, justificam a busca de novas fontes, que contribuirão também, para a redução da dependência externa.

### **2.3 Minerais silicáticos como fonte de potássio**

O atual cenário, político e econômico, do mercado internacional, associado aos altos custos das matérias-primas, têm alavancado a busca e o desenvolvimento, de novos produtos fertilizantes pela indústria, visando produtividade e manejo sustentável.

Assim, novas alternativas têm sido propostas, para o manejo da fertilidade dos solos, entre elas, a adição de compostos inorgânicos naturais, na forma de pó de rochas, como corretivos e como fertilizantes. A aplicação destas rochas moídas, ao solo, é também conhecida como rochagem (LEONARDOS et al. 1976).

Dentre os vários minerais, utilizados na rochagem, para remineralização dos solos, destacam-se as rochas silicáticas, que apresentam potencial de fornecer uma variedade de nutrientes, ao sistema solo-planta (MARTINS, 2016).

Estudos pioneiros, voltados à produção de fertilizantes potássicos, a partir de rochas silicáticas, tiveram início no período da 1ª Guerra Mundial, em países com baixas reservas convencionais de potássio, como EUA, Inglaterra, França e Suécia (SOUZA, 2014).

As rochas silicáticas, que vem sendo utilizadas, como fonte alternativa de K, são aquelas compostas por minerais, de maior solubilidade (feldspatóides, biotita-xisto, flogopitito, brecha vulcânica alcalina e carbonatito, glauconita). Essas fontes, são facilmente obtidas, devido à grande ocorrência na crosta terrestre, inclusive no Brasil, podendo reduzir os custos de produção

agrícola, por utilizar produtos alternativos, ou servir, como suplementação, aos adubos químicos solúveis industrializados (MARTINS, 2016, PÁDUA, 2012, RESENDE et al. 2006).

Dentre os diversos minerais silicáticos, a rocha sedimentar Verdete (glaucônita), do grupo das micas, oriunda do centro-oeste mineiro (CARA, 2015), apresentou teor de  $K_2O$ , variando entre 6% e 15%, além de cálcio, de magnésio, de manganês, de ferro e de silício (PEREIRA, 2019).

Piza et al. (2011), ao avaliarem sete amostras de Verdete, oriundas do município de Cedro de Abaeté-MG, observaram que, de maneira geral, as amostras continham entre 6,09 e 7,33%  $K_2O$ , e eram compostas de 37% de glaucônita, de 24% de quartzo, de 14% de matriz argilosa marrom-clara, de 7% de micas e de 7% de óxidos de ferro.

Como outro exemplo, a Biotita Xisto é um mineral comum, da classe dos silicatos, rocha sedimentar do grupo das micas, oriunda da região centro-oeste, que contém na sua composição entre 7 a 12% de  $K_2O$ , além de magnésio, de ferro e de alumínio (MARTINS et al. 2010).

Pádua (2012), avaliando a utilização de rochagem, com os agrominerais fosforito/zinnwaldita, fosforito/anfibolito, fosforito/micaxisto e fosforito/fonolito, em condições de campo, concluiu que os tratamentos com fosforito/anfibolito, fosforito/micaxisto e fosforito/fonolito, se mostraram eficientes, para a produção de girassol e de soja, seguindo uma estratégia de baixo uso de insumos, e apresentaram efeito residual de P, de K e de outros nutrientes. De modo similar, Lopes et al. (2016), avaliando o uso de tefrifonolito, de sienito e de biotita, no fornecimento de K, para a cultura da soja, concluíram que os agrominerais avaliados, são boa alternativa para o fornecimento de K, para a cultura da soja, e indicam a possibilidade de efeito residual, dos tratamentos no solo.

Em alguns casos, a falta de respostas positivas à aplicação de rocha, *in natura*, é por causa de: sua baixa solubilização; seus períodos curtos de avaliação; suas condições climáticas desfavoráveis ao intemperismo; e seus solos, com baixa atividade microbiana ou o próprio mineral (PÁDUA, 2012).

Como estratégias, para agregar valor de fertilizante, a estes agrominerais, estudos enfatizam o uso de microrganismos, como promissores, para promover sua solubilização, disponibilizando nutrientes, retidos nas estruturas destes materiais, no sistema solo-planta (MARTINS et al. 2015).

## 2.4 Microrganismos solubilizadores de potássio e mecanismos envolvidos

Os microrganismos desempenham um papel essencial no solo e em diversos grupos, como fungos e bactérias, e têm a capacidade de solubilizar minerais potássicos. (SARIKHANI et al. 2018). Uma ampla gama desses microrganismos, solubilizadores de K, são descritos em diversos trabalhos, e incluem bactérias, dos gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Ferroxidans*, *Acidithiobacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, e fungos, dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, dentre outros (MEENA et al. 2014).

Trabalhos diversos, disponíveis na literatura, evidenciam resultados favoráveis à utilização de minerais silicáticos, associados aos microrganismos. Segundo Marriel et al. (2006), a biodisponibilidade, *in vitro*, de K, presente em rochas silicáticas, pode aumentar em até 40 vezes, quando incubadas na presença de fungos filamentosos, pré-selecionados como eficientes.

Silva et al. (2015), avaliando a biossolubilização de K, em rocha fonolito, *in vitro*, por fungos e por bactérias, observaram que estes microrganismos podem incrementar a biodisponibilidade de K, a partir desta rocha, e concluíram que, uma estirpe de bactéria *Burkholderia* sp., e, uma de fungo *Aspergillus* sp. mostraram-se altamente promissoras. Paula et al. (2013), avaliando o potencial de biossolubilização de K, presente em rochas moídas de biotita-xisto e de fonolito, também verificaram ganho na biodisponibilidade de K, em função da inoculação com bactérias. Correa et al. (2019), em trabalho *in vitro*, com os agrominerais mica e feldspato, perceberam solubilização por bactérias endofíticas, em que ambas as fontes insolúveis de K, foram eficientes.

Ramos et al. (2016), trabalhando com fungos filamentosos, *in vitro*, notaram que a produção de ácidos orgânicos, principalmente o ácido cítrico, foi um dos mecanismos envolvidos na biodisponibilização de nutrientes, a partir de rochas silicáticas, e ainda, que a produção de ácidos orgânicos varia, em função da rocha e do isolado de fungo. De modo similar, Lopes-Assad et al. (2010), que avaliaram a influência do fungo, *Aspergillus niger*, na solubilização de rochas ultramáfica alcalina e flogopitito, verificaram que, a acidificação do meio, promovida pelo fungo, foi responsável pelo aumento na solubilização de K, dependendo do tipo de rocha. Barbosa (2011), em pesquisa com os minerais flogopito e glauconito, notou que, isolados de fungos filamentosos, foram eficientes na solubilização desses agrominerais. Os resultados relatados, demonstram potencial do uso de microrganismos, visando a melhoria no aproveitamento de K, pelas plantas, a partir de rochas silicáticas.

Em relação aos mecanismos envolvidos, poucas informações estão disponíveis na literatura, sobre biossolubilização de K por microrganismos, mas sabe-se que eles variam, de acordo com a natureza do mineral, do microrganismo e do ambiente (SATTAR et al. 2019). Dentre os mecanismos conhecidos, cita-se: exsudação de ácidos orgânicos, solubilização indireta, produção de EPS, formação de biofilme e produção do fitohormônio AIA.

O principal mecanismo de solubilização, de rochas potássicas, por microrganismos, ocorre por meio da exsudação de ácidos orgânicos, oriundos do metabolismo microbiano, e produzidos pela atividade biológica, alterando o pH e promovendo a liberação do nutriente, presente na rocha, para o meio, por meio da solubilização direta (DOURADO, 2018). Alguns ácidos orgânicos envolvidos, na solubilização de minerais potássicos, são os ácidos tartárico, acético, glicólico, láctico, ácidos propiônico, malônico e fumárico (MEENA et al. 2015).

Outro mecanismo conhecido, é a solubilização indireta, onde os microrganismos solubilizam minerais potássicos, por meio da quelação dos cátions. ligados a silicato, por processos rizosféricos, por reações troca, e por fixação direta, em superfícies minerais (SATTAR et al. 2019).

Produção de exopolissacarídeos capsulares (EPS), por microrganismos, é outro mecanismo potencial, pelo qual bactérias e fungos podem solubilizar, o K, dos minerais. Esses EPS são adsorvidos por ácidos orgânicos, ocorrendo assim, maior fixação à superfície mineral, resultando em alta concentração de ácidos orgânicos, em torno do minerais, favorecendo sua dissolução e aumentando a liberação de K (LIU et al. 2012).

Um mecanismo habilitado, contudo ainda pouco estudado, é a formação de biofilme, mecanismo em que as células são fixadas, dentro de uma matriz de polímeros extracelular, produzidas pelo próprio microrganismo, favorecendo as reações bioquímicas, devido à maior população microbiana, em biofilmes. Alguns microrganismos formam biofilme, nas superfícies minerais rizosféricas, e liberam ácidos orgânicos e metabólitos, que reduzem o pH, o que favorece o processo de solubilização de K, e a absorção pelas plantas (SATTAR et al. 2019).

Outro mecanismo, é a produção de ácido indol-acético (AIA), por microrganismos, o qual foi o primeiro hormônio descoberto em plantas, da classe das auxinas, sendo responsável por diversos efeitos fisiológicos na planta, entre eles: o alongamento do caule, a dominância apical, a formação da raiz e o desenvolvimento de frutos (TAIZ & ZEIGER, 2004). O AIA, pode ser sintetizado e excretado, por diferentes vias metabólicas, através dos microrganismos, sendo que a principal via, é a que utiliza o aminoácido L-triptofano como precursor fisiológico, na biossíntese de auxinas (KHALID et al. 2004). A compreensão dos mecanismos de

solubilização, de minerais potássicos, e a escolha do microrganismo solubilizador, são de extrema importância para se obter um processo eficiente (LODI, 2021).

## **2.5 Identificação molecular dos microrganismos**

Os microrganismos exibem grande diversidade genética e funcional, desempenhando funções únicas e fundamentais, na manutenção do equilíbrio de ecossistemas, e nos diversos ciclos biogeoquímicos existentes (CARA et al. 2012).

Sabe-se que menos de 5% das comunidades microbianas, no planeta, está caracterizada e descrita. Atualmente, as técnicas moleculares têm permitido avanços, nos estudos de diversidade dos microrganismos no solo, utilizando-se de marcadores moleculares, na determinação da estrutura genética, das populações fúngicas e bacterianas (CARDOSO, 2016).

A identificação molecular, desses microrganismos, é feita através de regiões de genes codificadores de rRNA. Estes genes, expressam áreas variáveis e conservadas, de uma bactéria para outra, por isso, podem ser utilizadas para identificação de microrganismos. O arranjo do DNA, permite que estas sequências sejam amplificadas, pelo método da reação em cadeia da polimerase (PCR) e depois, sequenciadas. As sequências escolhidas, para identificação, podem ser funcionais, que codificam proteínas, mas as 15 regiões, mais usadas para análises, são as que codificam a subunidade menor do RNA ribossomal, 16S rRNA para populações de bactérias e 18S rRNA, e regiões espaçadoras internas (ITS – internal transcribed spacer), para fungos (BRUNALE 2017). Essas regiões são ideais, por serem conservadas entre todas as bactérias ou fungos, facilitando o alinhamento das sequências, durante a etapa de comparação (PROSSER, 2002). Estas sequências são analisadas por softwares, para fazer alinhamentos com bancos de dados, e árvores filogenéticas, identificado-se assim, o microrganismo.

A análise de caracterização molecular, constitui-se uma fase fundamental, para a identificação e o estudo da diversidade de microrganismos.

### **3. OBJETIVO GERAL**

Avaliar, selecionar e identificar estirpes, de microrganismos (bactérias e fungos), eficientes na biossolubilização, “*in vitro*”, das rochas silicáticas Verdete de Abaeté e Biotita Xisto, bem como, os mecanismos envolvidos.

#### **3.1 Objetivos específicos**

- Reativar e avaliar a pureza de culturas de microrganismos, multifuncionais da Embrapa -Milho e Sorgo, pré-selecionados para solubilização de K;
- Avaliar e selecionar microrganismos, quanto à eficiência de solubilização de K, em meio sólido, contendo como fontes exclusivas de K, o silicato de alumínio e de potássio, e as rochas Verdete de Abaeté e Biotita Xisto;
- Avaliar e selecionar microrganismos, quanto à eficiência de solubilização de K, em meio líquido MISK, contendo como fonte exclusiva de K, as rochas Verdete de Abaeté e Biotita Xisto;
- Avaliar prováveis mecanismos envolvidos, na biossolubilização de rochas silicáticas;
- Identificar os microrganismos selecionados, por meio de métodos moleculares.

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

Em diferentes ensaios, foram avaliadas a eficiência de solubilização de K, de 10 isolados de bactérias, e 12 isolados, de fungos, de duas rochas silicáticas, pertencentes à Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa - Milho e Sorgo. O projeto foi desenvolvido nos laboratórios de Microbiologia e Bioquímica do Solo, de Agroquímica, de Fertilidade dos Solos e Núcleo de Biologia Molecular, desta unidade da Embrapa.

#### **4.1 *Screening* preliminar para seleção de microrganismos, solubilizadores de potássio**

Foram escolhidos alguns isolados, que já haviam sido pré-selecionados, com base em estudos desenvolvidos por Silva et al. (2015), e os demais, escolhidos de acordo com a área de origem (área de mineração, da multinacional brasileira - Vale S.A.), a fim de se obter um total

de 150 microrganismos, sendo 75 bactérias e 75 fungos, pertencentes à Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa - Milho e Sorgo. Estes microrganismos foram isolados de solo, de área minerada, e de cerrado, sob diferentes tipos de cobertura vegetal.

Os microrganismos foram reativados, a partir dos estoques em tubos inclinados, em placas de petri, contendo meio de cultura BDA - (batata (200 g L<sup>-1</sup>), dextrose (20 g L<sup>-1</sup>) e ágar (15 g L<sup>-1</sup>)) (FAHIM, 1966), para posterior avaliação, em meios sólido e líquido.

Na fase de *screening* preliminar, os microrganismos foram selecionados, por meio da formação de halo de solubilização, em meio sólido Aleksandrov (5 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,005 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,1 g L<sup>-1</sup> FeCl<sub>3</sub>, 2,0 g de CaCO<sub>3</sub>, 2,0 g L<sup>-1</sup> de fosfato de cálcio), contendo 3,0 g L<sup>-1</sup> de silicato de alumínio e K, como fonte única de K (mica natural - moscovita), e 20 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH do meio, foi ajustado para 7,0 (MEENA et al. 2015).

Em cada placa de petri, foi inoculada uma estirpe, com 3 repetições dentro da placa, e logo após, elas foram incubadas a 30 °C, por 10 dias. Foram realizadas as medições, dos halos e dos diâmetros das colônias, após o período de incubação, considerando-se a média de três repetições, para cada amostra. O resultado obtido, foi expresso pelo Índice de Solubilização (IS), por meio da fórmula proposta por Berraquero et al. (1976):

$$IS = \frac{\phi \text{ Halo (mm)}}{\phi \text{ Colônia (mm)}}$$

Com base nos índices de solubilização, os microrganismos foram classificados como estirpes, com baixa (IS < 2), com média (2 ≤ IS < 4) e com alta capacidade de solubilização de K (IS > 4).

#### **4.2 Solubilização de potássio em meio sólido contendo duas rochas silicáticas**

Após a fase de *screening* preliminar, a eficiência de solubilização de K, por diferentes estirpes de fungos e de bactérias, foi avaliada em meio de cultura sólido, contendo as rochas Verdete de Abaeté e Biotita Xisto, separadamente. As estirpes selecionadas, foram inoculadas em meio Aleksandrov sólido, como metodologia descrita na Seção 4.1. Após 10 dias de incubação, foram realizadas medições dos halos e dos diâmetros das colônias, de acordo com a metodologia de Berraquero et al. (1976).

#### **4.3 Eficiência de biossolubilização de potássio, em meio líquido, por bactérias e por fungos**

Foi avaliada, a eficiência de solubilização de K, da rocha Verdete de Abaeté, por bactérias e por fungos, em frascos erlemeyers, de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura líquido MISK (5 g L<sup>-1</sup> de sacarose; 5 mL L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub> H<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>; 2 mL L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>2H<sub>2</sub>O; 2mL L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1 mL L<sup>-1</sup> de FeCl<sub>3</sub>; 2 mL L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>2H<sub>2</sub>O; 50g L<sup>-1</sup> de Verdete de Abaeté), com pH ajustado a 6,5. Para as bactérias, em cada frasco foram inoculadas 100 µL de suspensão bacteriana, com densidade ótica (OD) = 1. Os tratamentos foram dispostos com 10 bactérias (B30, B116, B1485, B2096, B1509, B1479, B2179, B1931, B1434 e B1433), e o tratamento controle (meio MISK, com rocha sem adição da bactéria), em triplicata. Para os fungos, cada frasco foi inoculado com quatro discos de micélio, de 8mm de diâmetro de cada. Os tratamentos foram constituídos por 12 fungos (CMSV414, F18, F22, F2179, CMSV 528, F3, CMSV408, CMSV14, CMSV05, F2844, F56 e F4), e o tratamento controle (meio MISK, com rocha sem adição do fungo), realizado em triplicata.

Após 6, 12 e 18 dias, de incubação para bactérias e para fungos, respectivamente, sob agitação constante, a120 rpm, e temperatura de 28 °C, uma alíquota de 10 mL, do meio de cultura, foi retirada e centrifugada, a 8.000 rpm. No sobrenadante, foi avaliado o teor de K, por espectrofotometria de chama, e o pH, por potenciometria. O K biodisponibilizado, por cada microrganismo, foi calculado com base na diferença entre o teor de K (mg L<sup>-1</sup>), em cada amostra inoculada, e o teor de K, no tratamento controle, sem inoculação.

#### **4.4 Influência de concentrações e de tipos de fontes de carbono, na biossolubilização de Verdete de Abaeté**

Após a triagem dos microrganismos, avaliou-se o efeito de duas fontes de carbono, glicose e sacarose, em quatro concentrações (0,5%, 1%, 2% e 5%; % m/v), sobre a solubilização da rocha potássica Verdete de Abaeté, por 2 bactérias selecionadas (B30 e B116), e 2 fungos (F22 e F18), e sobre a alteração de pH, em meio de cultura líquido, de acordo com a metodologia descrita na Seção 4.3. Após os períodos de incubação, de 12 e 18 dias, para bactérias e para fungos, respectivamente, alíquotas de 10 mL foram retiradas, filtradas e centrifugadas, por 10 minutos, a 8000 rpm. No sobrenadante, foram determinados o teor de K (espectrofotometria de chama), e o pH (potenciometria). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **4.5 Eficiência de biossolubilização de K, em meio líquido, com teor de 2% de glicose, por bactérias e por fungos**

Foi avaliada a eficiência de solubilização, de K, por bactérias e por fungos, separadamente, em meio líquido, com teor de 2% de glicose, e em frascos erlemeyers, de 250 mL, contendo 50 mL, de meio de cultura líquido MISK, com adição de pó de rocha Verdete de Abaeté (20 g L<sup>-1</sup> de glicose; 5 mL L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub> H<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>; 2 mL L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O; 2mL L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O; 1 mL L<sup>-1</sup> de FeCl<sub>3</sub>; 2 mL L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O; 50g L<sup>-1</sup> de Verdete de Abaeté ), e, MISK com adição de pó de rocha Biotita Xisto (20 g L<sup>-1</sup> de glicose, 5 mL L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub> H<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>, 2 mL L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O; 2mL L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O; 1 mL L<sup>-1</sup> de FeCl<sub>3</sub>; 2 mL L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, 50g L<sup>-1</sup> de Biotita Xisto), com pH ajustado a 6,5. Para as bactérias, em cada frasco, foram inoculadas 100 µL de suspensão bacteriana, com densidade ótica (OD) = 1. Os tratamentos foram dispostos, com 10 bactérias (B30, B116, B1485, B2096, B1509, B1479, B2179, B1931, B1434 e B1433), em dois meios diferentes (MISK, com adição de Verdete de Abaeté, e MISK, com adição de Biotita Xisto), e o tratamento controle (meio MISK, com rocha sem adição da bactéria), em triplicata. Para os fungos, cada frasco foi inoculado, com quatro discos de micélio, de 8mm de diâmetro de cada. Os tratamentos foram constituídos por 12 fungos (CMSV414, F18, F22, F2179, CMSV 528, F3, CMSV408, CMSV14, CMSV05, F2844, F56 e F4), em dois meios diferentes (MISK, com adição de Verdete de Abaeté, e MISK, com adição de Biotita Xisto), e o tratamento controle (meio MISK, com rocha sem adição do fungo), foram todos realizados em triplicata.

Após 12 e 18 dias de incubação, para bactérias e para fungos, respectivamente, sob agitação constante a 120 rpm, e à temperatura de 28 °C, uma alíquota de 10 mL, do meio de cultura, foi retirada e centrifugada, a 8.000 rpm. No sobrenadante, foi avaliado o teor de K, por espectrofotometria de chama, e o pH, por potenciometria. O K biodisponibilizado, por cada microrganismo, foi calculado com base na diferença entre o teor de K (mg L<sup>-1</sup>), em cada mostra inoculada, e o teor de K, no tratamento controle, sem inoculação.

#### **4.6 Produção de biofilme, por bactérias e por fungos, em meio líquido**

A capacidade de formação de biofilme, por fungos e por bactérias, em meio líquido, foi avaliada pelo método proposto por Stepanović et al. (2007), com modificações. Alíquotas de 10 µL, da cultura bacteriana, padronizada a 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, foram transferidas para 200µL de

meio de cultivo TSB, com 1% de glicose, em uma microplaca de poliestireno, em triplicata. Para fungos, utilizaram-se 20  $\mu\text{L}$  da cultura, enriquecida em meio líquido TSB. O controle negativo, continha apenas o meio de cultura. A microplaca foi incubada, a 30 °C, por 48 horas.

Após esse período, a cultura foi removida, os poços lavados 3 vezes, com 200 $\mu\text{L}$  de água destilada, e a placa, colocada invertida sobre papel toalha. Em seguida, foram adicionados 200 $\mu\text{L}$  de metanol, em cada poço, para fixar o biofilme, eventualmente presente, e incubando-o, por 20 minutos. Final a este tempo, procedeu-se a remoção do metanol, e a secagem à temperatura ambiente. Foram então, adicionados 200 $\mu\text{L}$ , de solução Cristal Violeta 0,5%, em cada poço, e, após 15 minutos de incubação, o corante foi removido, sendo a placa lavada com água destilada corrente, e deixada em temperatura ambiente, para a secagem. Adicionaram-se 200 $\mu\text{l}$  de álcool etílico PA, e, após 30 minutos, efetuou-se a leitura a 570 nm (espectrofotômetro UV/VIS; FLUOstar Omega, BMG LABTECH, Alemanha).

Os microrganismos foram categorizados, em quatro classes, em relação à produção de biofilme, em função da capacidade de retenção da coloração violeta, com base nos valores de densidade óptica (Stepanović et al. 2007): (i) não formadores ( $Doa \leq Docn$ ); (ii) fracamente formadores ( $Docn \leq doa \leq 2x Docn$ ); (iii) moderadamente formadores ( $2x Docn < Doa \leq 4x Docn$ ), e (iv) fortemente formadores ( $4x Docn < Doa$ ). Sendo, Doa = densidade óptica da absorbância e Docn = densidade óptica do controle negativo.

#### **4.7 Produção de exopolissacarídeos (EPS), por bactérias e por fungos**

A capacidade de produção de EPS, por isolados de bactérias, foi realizada de acordo com a metodologia, preconizada por Paulo et al. (2012). Utilizou-se meio de cultura sólido, composto por 50 g L<sup>-1</sup> de sacarose; 20 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura; 20 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>; 0.01 g L<sup>-1</sup> de NaCl; 0.01 g L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub>; 0.01 g L<sup>-1</sup> de Mn SO<sub>4</sub>; 0.02 g L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> e 20 g L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 15g de ágar, e o pH do meio, foi ajustado para 7,5 e, autoclavado, por 20 minutos, a 121 °C (GUIMARÃES et al. 1999). Discos, de 5 mm de diâmetro, de papel filtro (Whatman 42) esterilizados, foram transferidos para a superfície do meio, e tratados com 5  $\mu\text{L}$  da cultura bacteriana, enriquecida em TSB, 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. Após incubação, a 30°C, por 24 horas, a produção de EPS foi avaliada, pela ausência ou pela presença de colônia mucosa (material translúcido ou mucoso), ao redor dos discos.

Para a confirmação da produção de EPS, avaliou-se a presença de precipitado, formado pela adição de colônia, em etanol absoluto (resultado positivo), ou em presença de turbidez (resultado negativo).

Diferente das bactérias, para a produção de EPS dos fungos, utilizou-se metodologia de fermentação submersa (FONSECA, 2016), e frascos erlenmeyer, de 125 mL, contendo 50 mL de meio de cultura (27,5 g L<sup>-1</sup> de sacarose; 1,5 g L<sup>-1</sup> de peptona bacteriológica; 2 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 2 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>), pH do meio, ajustado para 7,0, e autoclavado por 20 minutos, a 121 °C. Em seguida, quatro discos de 8 mm, de cada fungo, foram transferidos para o meio de cultura, com três repetições, e incubados, sob agitação constante (150 rpm), a 28 °C, durante 96 horas. Após o período de fermentação, a cultura foi centrifugada à 8000 rpm, por 20 minutos, e o sobrenadante, foi misturado com 3 volumes de etanol 95% (v/v). Após 24 horas, em geladeira ( $\pm 5$  °C), avaliou-se a presença ou não de precipitado.

#### **4.8 Produção de auxinas (AIA), por bactérias e por fungos**

A quantificação da produção de auxinas - ácido indol acético (AIA), por bactérias e por fungos, foi realizada por metodologia, proposta por BRIC et al., (1991). As estirpes foram crescidas, em meio de cultura TSB líquido, suplementado com DL-triptofano, (PATTEN & GLICK, 1996).

Para as estirpes bacterianas, alíquotas de 10  $\mu$ L de inóculo, de cada cultura, enriquecido em meio TSB, durante cinco dias, à temperatura de 30 °C, e ajustadas para 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, a 540 nm, foram inoculadas, em erlenmeyers, de 50 mL, contendo 10 mL de TSB líquido, suplementado com DL-triptofano.

No caso dos fungos, foi utilizado um disco de 8mm, de cada estirpe, crescido em meio sólido, durante oito dias, inoculado em erlenmeyers, de 50 mL, contendo 10 mL de TSB líquido, suplementado com DL-triptofano. Em ambos os casos, após incubação, a 30°C, sob agitação, a 100 rpm, e na ausência de luz, por 5 dias, o meio de cultura foi centrifugado, por 10 minutos, a 6000 rpm, e o sobrenadante obtido, utilizado para a quantificação da produção de AIA.

A mistura de reação, de cada microrganismo, constituída de 100  $\mu$ L de sobrenadante da cultura, e 100  $\mu$ L da solução de Salkoviski (500  $\mu$ L, da solução aquosa de FeCl<sub>3</sub>6H<sub>2</sub>O, na concentração de 0,136 g/ml, e 24,5 ml de solução aquosa, de ácido perclórico 35% v/v), foi adicionada às microplacas de 96 poços, e mantidas à temperatura de 28°C, no escuro, em

triplicata. Como controle negativo, utilizou-se meio líquido estéril, sem inoculação. Após 20 minutos da aplicação, a absorbância foi determinada a 530 nm. A produção de AIA foi estimada, a partir de curva padrão de AIA, com as concentrações 0, 10, 20, 40, 80 e 100, e os resultados, expressos em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (GORDON & WEBER 1951).

#### **4.9 Quantificação de ácidos orgânicos, produzidos por fungos e por bactérias**

A quantificação de ácidos orgânicos, foi determinada no sobrenadante de culturas, enriquecidas com as rochas Verdete de Abaeté e Biotita Xisto, com fungos e com bactérias. Após 12 e 18 dias, para bactérias e para fungos, respectivamente, o sobrenadante de cada cultura, centrifugado e filtrado, em membrana PES de 0,22  $\mu\text{m}$ , foi analisado por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), a 210 nm e, temperatura, do detector, a 35 °C. A coluna utilizada foi AMINEX – HPX 87H – BioRad, eluída com uma fase móvel de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , com 5  $\text{mMol.L}^{-1}$ , em fluxo de 0,6  $\text{mL.min}^{-1}$ . Os picos correspondentes, a cada ácido, foram identificados pelo tempo de retenção, em relação aos respectivos padrões. Os padrões utilizados foram fumárico, glucônico, maleico, málico, acético, butírico, cítrico, fórmico, succínico, tartárico, láctico, malônico, oxálico, propiônico, pirúvico, galacturônico, gálico, 5-ceto-gluconico, 2-ceto-gluconico e glucurônico. A concentração obtida, foi expressa em  $\text{g L}^{-1}$  de ácido orgânico.

#### **4.10 Extração de DNA e Sequenciamento de bactérias e de fungos**

##### **4.10.1 Extração de DNA das Bactérias**

As bactérias foram reativadas e incubadas, à uma temperatura de 28°C, durante cinco dias, em placas de petri, contendo meio de cultura BDA – (200  $\text{g L}^{-1}$  batata, 20  $\text{g L}^{-1}$  dextrose e 15  $\text{g L}^{-1}$  ágar), utilizando-se o método de estrias, para obtenção de colônia pura, dos isolados. Após crescimento das colônias puras, estas foram inoculadas, em meio líquido TSB, e incubadas, sob agitação constante, a 120 rpm, temperatura de 28 °C, por 5 dias. Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 8000 rpm, para peletização das mesmas, e então, iniciou-se a extração do DNA genômico, das bactérias, utilizando o Kit de Purificação de DNA Genômico Wizard®.

O DNA genômico foi extraído, utilizando-se a metodologia descrita por Saghai Maroof et al (1984), adaptada. Para isolamento do DNA genômico, foram adicionados 30 µL de SDS 10% (m/v) e 3 µL de proteínas, e K 20 mg/mL. As amostras foram homogeneizadas e incubadas, a 37 °C, por 1 hora. Foram adicionados 100 µL de NaCl 5 M e 80 µL de solução de CTAB/NaCl (CTAB 100 mg/mL e NaCl 0,7 mol/L) e as amostras agitadas e incubadas a 65°C por 10 min. Em seguida, foram adicionados 600 µL de clorofórmio/octanol (24:1), as amostras homogeneizadas por 15 minutos, e centrifugadas, a 14.000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo, contendo 600 µL de isopropanol 99% (v/v) gelado. As amostras foram centrifugadas, e o precipitado, lavado com 1 ml de etanol 70% (v/v). Os tubos foram centrifugados, por 5 minutos, a 14.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o etanol residual, retirado em centrífuga, a vácuo por 5 minutos. Ao final, o precipitado foi ressuscitado, em 50 µL de tampão TE com RNase (Tris-HCl 10 mM; 1 mM EDTA, pH 8,0; 0,1 µg/µL RNase A).

#### **4.10.2 Extração do DNA Fungos**

Os fungos, foram previamente crescidos, em placas com meio BDA, por 8 dias e a seguir, com auxílio de uma espátula esterilizada, os fungos foram raspados, e transferidos para cadinhos, para iniciar a maceração.

Com auxílio de um pistilo, o material foi macerado com nitrogênio líquido, até completa pulverização, e homogeneização da amostra. Em seguida, aproximadamente 200 mg do macerado, foi transferido para um tubo de polipropileno, com 600 µL de tampão CTAB [CTAB 2% (m/v); NaCl 1,4 M; Tris- HCl 0,2 M (pH 7,5); EDTA 0,02 M (pH 8,0), mais 2% de β-mercaptoetanol (v/v)], e incubado em banho-maria, a 65 °C, por 60 minutos, sob agitação esporádica. Após a retirada, do banho-maria, deixou-se esfriar dentro da capela, por 10 minutos, efetuou-se uma lavagem com 600 µL clorofórmio-octanol, e homogeneizou-se em agitador por inversão, durante 5 minutos.

Em seguida, à centrifugação da suspensão, a 14.000 rpm, por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, onde foram adicionados 500 µL de isopropanol (-20 °C), e homogeneizado manualmente.

Na sequência, os tubos foram centrifugados novamente, e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado, com 100µL de etanol 70%, a -20 °C, mais uma vez centrifugado, por 10 minutos, a 14000 rpm, e o sobrenadante foi removido, com auxílio de uma pipeta. As amostras

peletizadas, foram deixadas a temperatura ambiente, até a completa evaporação do etanol residual.

Os *pellets* de DNA foram ressuspensos, em 50 µL de tampão TE, contendo 0,2 µL de RNase a 10mg/ml (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM). Posteriormente, a concentração e a pureza, das amostras de DNA, foram quantificadas em espectrofotômetro *NanoDrop*® ND-1000, e ajustadas para 10ng/µL. O DNA obtido foi estocado a -20 °C.

#### **4.10.3 Identificação molecular das estirpes**

Para identificação molecular, das estirpes de bactérias, a região 16S rDNA foi amplificada, utilizando os iniciadores 8F e 1496R. Para fungos, a região 18S rDNA foi amplificada, utilizando os iniciadores ITS4 e ITS5. As reações de sequenciamento, foram preparadas com o Kit Big Dye Terminator (Thermo Scientific, EUA), e purificadas, de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram injetadas, no sequenciador ABI 3500 XL (Thermo Scientific, EUA), as sequências alinhadas com o software Sequencher 5.4 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, EUA), e comparadas com o banco de dados público GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), por meio da ferramenta BlastN.

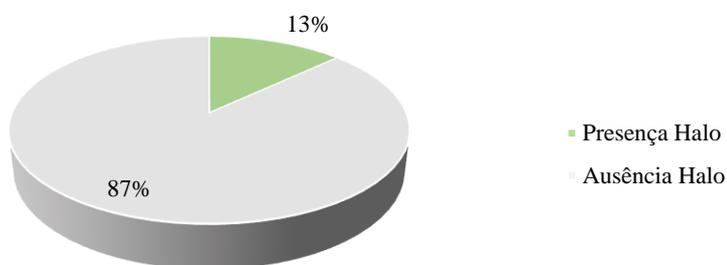
#### **4.11 Análises Estatísticas**

Os dados provenientes dos experimentos de solubilização, em meio líquido MISK, e avaliação de produção de AIA, foram avaliados por análise de variância ( $p < 0,05$ ), pelo teste Scott Knott ( $p \leq 0,05$ ), utilizando-se o aplicativo computacional Sisvar (FERREIRA 2011). Análise de correlação e sua significância, foram realizadas pelo programa Microsoft Excel®. Os resultados, de ácidos orgânicos, foram analisados por meio de agrupamento, cluster software R.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

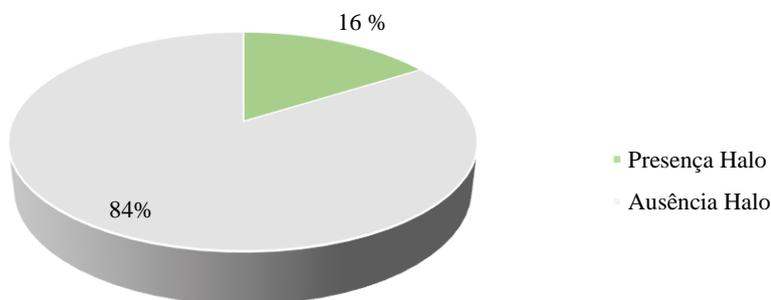
### 5.1 *Screening* preliminar, para seleção de microrganismos, solubilizadores de potássio

Em uma etapa preliminar, os resultados obtidos, a partir da avaliação 150 estirpes, 75 de bactérias e 75 de fungos, em meio sólido, contendo silicato de alumínio e K, como única fonte de K, estão apresentados nas Figuras 1 e 2. Observou-se que 13% dos isolados, de bactérias, foram considerados positivos para a solubilização, com base na presença de halo, após 10 dias de incubação.



**Figura 1.** Proporção de bactérias, capazes de liberar potássio, a partir de silicato de alumínio e K, em meio sólido, após dez dias de incubação.

Os demais 87% dos isolados, não mostraram capacidade de dissolução desse material (Figura 1). De modo similar, somente 16% dos fungos, apresentaram capacidade de solubilizar, essa fonte de K (Figura 2).



**Figura 2.** Proporção de fungos, capazes de liberar potássio, a partir de silicato de alumínio e K, em meio sólido, após dez dias de incubação.

Quando se avaliou, o Índice de Solubilização (IS), de bactérias e de fungos, no meio de cultura sólido, contendo silicato de Al e K, observou-se o IS variando de 2,50 a 6,50 e 1,61 a 4,09, respectivamente. As bactérias, B30, B116, B1931, B2096, B1479 e B2176, foram classificadas como altamente eficientes ( $IS > 4$ ), os demais isolados bacterianos, B1485, B1509, B1434 e B1433, moderadamente eficientes ( $2 \leq IS < 4$ ).

Os resultados do IS, dos fungos, mostraram que o isolado FCMSV528, foi classificado como altamente eficiente ( $IS > 4$ ), F18, F22, F2179, FCMSV528, F3, FCMSV408, FCMSV05, F2844 e F56, e F4, moderadamente eficientes.

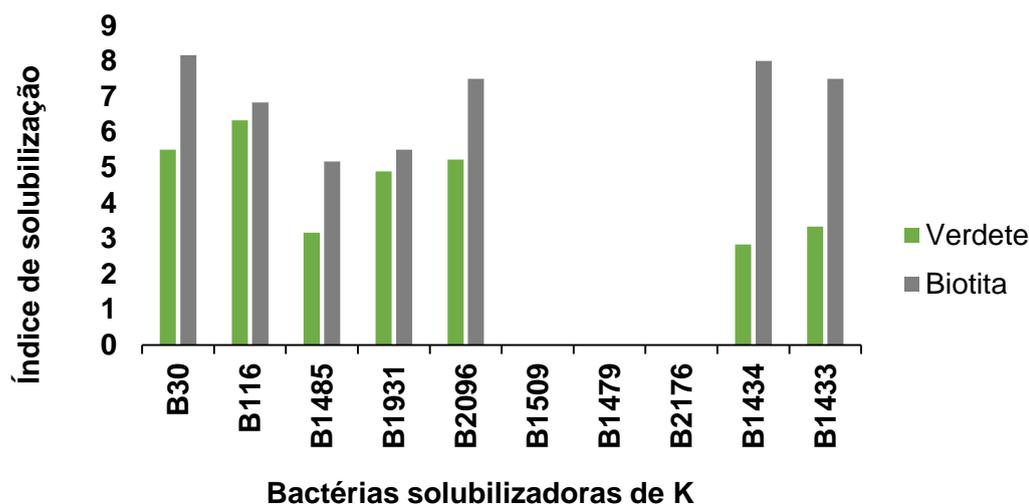
Assim, somente 10 isolados de bactérias (B30, B116, B1485, B2096, B1509, B1479, B2179, B1931, B1434 e B1433), e doze de fungos (FCMSV414, F18, F22, F2179, FCMSV528, F3, CMSV408, FCMSV14, FCMSV05, F2844, F56 e F4), foram selecionados para testes, com outras fontes de agrominerais silicáticos.

## **5.2 Solubilização de potássio, em meio sólido, a partir de Verdete Abaeté e de Biotita Xisto**

Quando se avaliou, a capacidade de biossolubilização de K, por bactérias, em meio sólido, contendo Verdete de Abaeté e Biotita Xisto, como fonte de potássio, verificou-se que os IS, oscilaram entre 0 a 6,33 e 0 a 8,17, respectivamente (Figura 3). As estirpes B30, B116 e B2096, foram classificadas como altamente eficientes ( $IS > 4$ ), B1485, B1434 e B1433, como moderadamente eficientes ( $2 \leq IS < 4$ ), e as estirpes B1509, B1479 e B2176, como não eficientes K ( $IS = 0$ ), como biossolubilizadoras da rocha Verdete de Abaeté.

Em relação à rocha Biotita Xisto, observou-se que sete estirpes, B30, B116, B2096, B1485, B1434, B1509 e B1433, apresentaram alta eficiência ( $IS > 4$ ), enquanto as estirpes B1509, B1479 e B2176, não apresentaram capacidade de liberação de K, nessa fonte.

De modo similar Sun et al. (2020), relataram IS, variando de 1,69 a 4,23 para diferentes estirpes de bactérias, solubilizadoras de Feldspato, de potássio. Corea et al. (2019), observaram que três isolados, de bactérias endofíticas, também apresentaram capacidade de solubilizar rocha, classificadas como Feldspato e como Mica, variando de 3,3 mm a 6,78 mm. Diferenças entre bactérias, com base no diâmetro do halo, também foram relatadas por Paula et al. (2013), em meio de cultura sólido, contendo rochas moídas, Fonolito e Biotita Xisto, com valores variando de 2 mm e 24 mm.

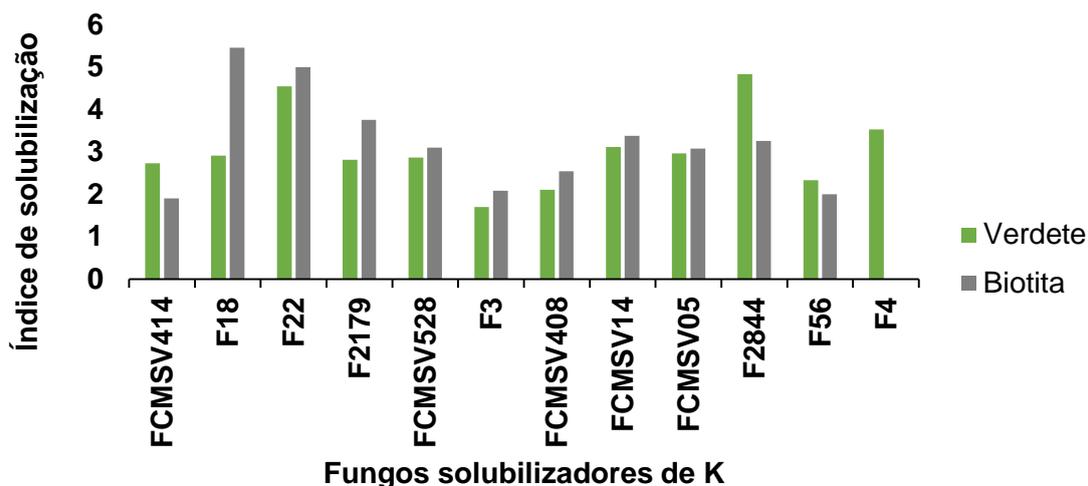


**Figura 3.** Índice de Solubilização (IS), de 10 isolados de bactérias, testados em meio sólido, com diferentes fontes de potássio (pó de rochas Verdete de Abaeté e Biotita Xisto).

Em relação aos fungos, em meio de cultura, com pó de rocha Verdete de Abaeté, os valores obtidos para IS, variaram de 1,69 a 4,83 (Figura 4). Os fungos, F22 e F2844, apresentaram os IS mais elevados, sendo classificados como altamente eficientes ( $IS > 4$ ), os isolados, FCMSV14, FCMSV05, F18, FCMSV408, F56, FCMSV414, apresentaram eficiência média de solubilização ( $2 \leq IS < 4$ ).

Na presença de rocha Biotita Xisto (Figura 4), as estirpes F22 e F18 apresentaram alto IS, sendo classificadas como altamente eficientes, e os fungos, FCMSV14, FCMSV05, FCMSV408, FCMSV528, F56, F3, F2844 e F2179 IS, apresentaram eficiência média de solubilização ( $2 \leq IS < 4$ ). O isolado F4 não apresentou formação de halo.

Esses resultados, indicaram que a capacidade de solubilização, de rocha silicática, depende do tipo de microrganismo, e da rocha analisada. Em alguns casos, a capacidade de solubilização de K, por bactérias, pode ser atribuída à produção de determinados metabólitos secundários. Esses resultados demonstraram, a existência de variabilidade genética, entre estirpes de fungos e de bactérias, para biossolubilização de rochas potássicas, em meio sólido.



**Figura 4.** Índice de Solubilização (IS), de 12 isolados fúngicos, testados em meio sólido, com diferentes fontes de potássio (pó de rochas Verdete de Abaeté e Biotita Xisto).

### 5.3 Eficiência de biossolubilização de potássio, em meio líquido

Os resultados de biossolubilização, da rocha Verdete de Abaeté, por estirpes de bactérias, e de pH do meio de cultura, após 6, 12 e 18 dias de incubação, são apresentados na Tabela 1. Observou-se diferença significativa, de liberação de K, do pó de rocha Verdete de Abaeté, no meio de cultura, em função da estirpe utilizada.

Após 6 dias de incubação, a liberação de K, no meio de cultura, variou de 1,48 a 8,86 mg L<sup>-1</sup>, sendo o maior valor observado, para o isolado B30 (8,86 mg L<sup>-1</sup>), seguido do B116 (6,33 mg L<sup>-1</sup>). Os isolados, B1434 e B1479, apresentaram os menores valores, 1,48 mg L<sup>-1</sup> e 2,09 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Observou-se aumento da solubilização de K, após 12 dias de incubação, com valores de liberação, variando de 1,50 a 10,91 mg L<sup>-1</sup>. Novamente, o isolado B30, apresentou o maior valor de liberação, 10,91 mg L<sup>-1</sup>, seguido pelos isolados B116 (9,0 mg L<sup>-1</sup>), B1485 (8,30 mg L<sup>-1</sup>), B1931 (7,75 mg L<sup>-1</sup>) e B2096 (7,30 mg L<sup>-1</sup>) (Tabela 1).

**Tabela 1** – Liberação de K, em relação ao controle, em meio líquido MISK, contendo pó de rocha Verdete de Abaeté, como fonte única de K, por 10 isolados de bactérias, e pH do meio, após 6, 12 e 18 dias de incubação.

Isolados de Bactérias	6 dias <sup>1</sup>		12 dias <sup>1</sup>		18 dias <sup>1</sup>	
	pH	K mg L <sup>-1</sup>	pH	K mg L <sup>-1</sup>	pH	K mg L <sup>-1</sup>
Controle	6,52 a	-	6,25 a	-	5,74 a	-
B30	3,64 e	8,86 a	3,55 d	10,91 a	3,36 c	7,73 a
B116	3,55 e	6,33 b	3,28 d	9,0 b	3,16 c	6,70 a
B1433	3,38 f	4,71 d	3,20 d	4,93 c	3,28 c	2,06 b
B1434	5,47 c	1,48 g	5,24 c	1,50 d	5,76 a	n.d c
B1479	6,10 b	2,09 g	5,72 b	4,70 c	4,37 b	n.d c
B1485	5,64 c	5,36 c	5,62 b	8,30 b	5,61 a	7,65 a
B1509	5,26 d	3,03 f	5,04 c	4,20 c	5,46 a	0,20 c
B1931	3,70 e	2,83 f	3,31 d	7,75 b	3,41 c	8,10 a
B2096	3,64 e	3,63 e	3,41 d	7,30 b	3,28 c	0,10 c
B2176	3,33 f	3,68 e	3,34 d	5,15 c	3,26 c	2,85 b
<b>CV(%)</b>	2,64	11,78	4,07	14,39	10,85	22,26

Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si, pelo teste Scott Knott ( $p \leq 0,05$ ).

n.d indica que não foi detectada, nenhuma taxa de liberação de K.

Aos 18 dias, de modo geral, observou-se queda, nas taxas de solubilização de K, com valores variando de 0 a 8,10 mg L<sup>-1</sup>. Os isolados, B30, B116, B1485 e B1931, apresentaram os maiores valores de liberação de K, no meio, sendo significativamente superiores, aos demais isolados (Tabela 1).

Os valores de pH, no meio de cultura, variaram de 3,33 a 6,52 após 6 dias de incubação, de 3,28 a 6,25, após 12 dias, e de 3,16 a 5,76, após 18 dias (Tabela 1). O controle, que contém apenas o meio de cultura, na presença do pó de rocha Verdete de Abaeté, apresentou o maior valor de pH, conforme o esperado. A bactéria B30, mais eficiente na liberação de K, da rocha, apresentou um baixo valor de pH (Tabela 1). Não houve correlação entre a solubilização de K, da rocha Verdete de Abaeté e o pH do meio de cultura, nas diferentes épocas avaliadas.

Os valores obtidos, nesse trabalho, são superiores aos relatados por Sun et al. (2020), que ao avaliarem a capacidade de liberação de K em meio líquido, suplementado com pó da rocha Feldspato, com dezoito cepas de bactérias, observaram liberação de K, variando de 0,07 mg L<sup>-1</sup> a 1,75 mg L<sup>-1</sup>. São também superiores, os valores observados por Zhang & Kong (2014), que encontraram liberação de K, variando de 0,59 a 4,4 mg L<sup>-1</sup>, ao final de sete dias de incubação, em estudos realizados, com isolados bacterianos e com a rocha Feldspato.

Como a liberação de K das rochas, por via microbiana, se dá, geralmente, pela ação dos produtos de seu metabolismo, ela está sujeita à limitações fisiológicas ou nutricionais, do meio de cultura, o que pode explicar a queda de solubilização, observada na quase totalidade das estirpes, aos 18 dias de incubação (CARA, 2016).

Os valores de pH obtidos, estão de acordo, com os encontrados por Silva et al. (2015) e Ramos et al. (2016), que também verificaram redução do pH do meio, em ensaios *in vitro*, com as rochas Fonolito e Verdete, inoculadas com fungos e com bactérias, isolados do solo.

A solubilização de minerais, inclui mecanismos de reações de oxirredução, de dissolução e de ação de agentes intemperizadores, tais como prótons, ácidos orgânicos, inorgânicos e quelantes (UROZ et al. 2009).

Os teores de K, solubilizado no meio líquido, pelos isolados fúngicos, apresentaram diferença estatística significativa (Tabela 2), variando de 0,0 mg L<sup>-1</sup> a 12,13 mg L<sup>-1</sup>, após 6 dias de incubação. Apenas os isolados, F22 (12,13 mg L<sup>-1</sup>), FCMSV528 (8,36 mg L<sup>-1</sup>) e F18 (1,20 mg L<sup>-1</sup>), apresentaram liberação de K. Os demais isolados, (FCMSV05, F56, FCMSV14, FCMSV414, FCMSV408, F3, F2179, F4 e F2844), apresentaram teores de K. menores que o controle, sugerindo uma provável imobilização de K.

Após 12 dias de incubação, além dessas estirpes, a F56 também apresentou liberação de K, em meio líquido, e aos 18 dias de incubação, as estirpes FCMSV05, F3, FCMSV414 e F4, que não haviam solubilizado K, apresentaram solubilização, com valores variando de 1,35 mg L<sup>-1</sup> a 5,67 mg L<sup>-1</sup>. Notou-se, que quanto maior o tempo de incubação, maior foi o número de isolados, que conseguiram solubilizar o K, presente no meio. Aos 6 dias de incubação, apenas 3 isolados fúngicos, conseguiram solubilizar o K, aos 12 dias, 4 isolados, e aos 18 dias, 8 isolados.

De modo geral, foi observado redução nos valores de pH, com diferença significativa entre os isolados, em relação ao tratamento não inoculado, nas diferentes épocas de incubação (Tabela 2). No entanto, não houve correlação entre pH e solubilização de K, nas diferentes épocas avaliadas.

**Tabela 2** - Liberação de K, em relação ao controle, em meio líquido MISK, contendo pó de rocha Verdete de Abaeté, como fonte única de K, por 12 isolados fúngicos e pH do meio, após 6, 12 e 18 dias de incubação.

Isolados de Fungos	6 dias <sup>1</sup>		12 dias <sup>1</sup>		18 dias <sup>1</sup>	
	pH	K mg L <sup>-1</sup>	pH	K mg L <sup>-1</sup>	pH	K mg L <sup>-1</sup>
Controle	6,97 a	-	6,93 a	-	7,18 a	-
F3	4,23 c	n.d c	4,72 d	n.d e	4,93 c	1,35 e
F18	3,57 d	1,2 c	4,03 d	7,37 b	4,13 d	24,17 a
F22	4,09 c	12,13 a	4,34 d	8,9 a	4,12 d	17,63 b
F56	4,92 b	n.d c	4,95 c	4,4 c	5,27 c	11,33 c
F4	4,31 c	n.d c	4,60 d	n.d e	4,31 d	5,9 d
F2179	4,40 c	n.d c	4,45 d	n.d e	4,50 d	n.d e
F2844	4,44 c	n.d c	4,61 d	n.d e	4,41 d	n.d e
FCMSV05	4,39 c	n.d c	4,50 d	n.d e	4,46 d	1,35 e
FCMSV14	4,87 b	n.d c	5,53 c	n.d e	6,55 b	n.d e
FCMSV414	4,21 c	n.d c	5,17 c	n.d e	5,48 c	5,67 d
FCMSV408	4,75 b	n.d c	6,44 b	n.d e	6,56 b	n.d e
FCMSV528	7,27 a	8,36 b	7,28 a	0,97 d	7,13 a	5,53 d
<b>CV (%)</b>	4,16	37,43	5,32	12,05	5,26	16,9

Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si, pelo teste Scott Knott ( $p \leq 0,05$ ).

n.d indica que não foi detectada, nenhuma taxa de liberação de K.

Os resultados encontrados, em relação a solubilização de K, são semelhantes a Silva et al. (2015) e Barbosa (2011), que observaram imobilização de K, pelos isolados fúngicos estudados, relatando que os teores de K dos isolados, também foram menores do que os de controle, sugerindo que possa ocorrer algum consumo, por parte do isolado, do potássio que está sendo liberado. No entanto, ao avaliar a capacidade de solubilização de K, de outros isolados fúngicos, com suplementação de K, por pó de rocha Fonolito, verificaram que eles apresentaram capacidade de solubilização, variando de 8 a 17 mg L<sup>-1</sup> de K.

Esses resultados, são superiores aos encontrados por Ramos (2016), aos 14 dias de incubação, que ao avaliar a capacidade de solubilização de K, a partir da rocha Verdete, por espécies fúngicas, verificou que a solubilização variou entre 0,67 a 6,72 mg L<sup>-1</sup>. E similares aos observados por Marriel et al. (2006), que ao avaliarem 40 isolados fúngicos, obtiveram teores de K, no meio de cultura suplementado, com Biotita Xisto, variando de 1,5 a 17,4 mg L<sup>-1</sup>, extraídos em água.

A literatura atribui a variação, nos teores de K solubilizado, a diferentes fatores, entre eles as propriedades mineralógicas das rochas utilizadas, a qualidade nutricional do meio de cultura, fonte de carbono, pH, temperatura, concentração de oxigênio, e período de incubação, além da

granulometria, da natureza dos minerais potássicos, e das características intrínsecas do isolado (ALVES et al. 2021, LOPES-ASSAD et al. 2006, SATTAR et al. 2019).

Os resultados de pH, encontrados nesse trabalho, estão de acordo com os obtidos por Silva et al. (2015) e Ramos et al. (2016), que também verificaram a redução dos valores de pH, em ensaio *in vitro*, com as rochas Fonolito e Verdete, inoculadas com fungos isolados de solos.

#### **5.4 Influência de concentrações e tipos de fontes de carbono na biossolubilização de Verdete de Abaeté**

Na tabela 3, estão apresentados os resultados, do efeito das diferentes fontes e doses de carbono, sobre a solubilização da rocha Verdete de Abaeté, para duas estipes de bactérias, B30 e B116. Perceberam-se diferenças estatísticas significativas, entre fonte e dose de carbono, bem como interação bactéria x dose x fonte. Para a glicose, notou-se maior eficiência de solubilização, na concentrações de 2%, independente da bactéria testada, com valores variando entre 10,16 e 11,77 mg L<sup>-1</sup>, superiores aos valores detectados para sacarose.

**Tabela 3** - Valores de K, solubilizados pelas bactérias B30 e B116, após 12 dias de incubação, em meio de cultura, suplementado com Verdete de Abaeté, com duas fontes de carbono, em quatro doses.

Bactérias	Solubilização de K mg L <sup>-1</sup>									
	Glicose				Média	Sacarose				Média
	0,5%	1%	2%	5%		0,5%	1%	2%	5%	
<b>B30</b>	1,2 d A	5,03 c D	11,66 a A	7,18 b A	6,26 A	3,09 a A	4,06 a A	3,07 a A	3,15 a A	3,34 A
<b>B116</b>	0,51 c A	10,17 a A	10,16 a A	6,45 b A	6,82 A	1,36 b A	2,20 b A	3,00 b A	7,10 a B	3,41 A
<b>Média</b>	0,85	10,17	10,91	6,82		2,14	3,13	3,04	5,13	

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, diferem entre si, pelo teste Scott Knott ( $p \leq 0,05$ ).

Esses resultados observados, são consubstanciados pelos relatados por Parmar e Sindhu (2013), Yadav et al. (2011) e Lodi 2020, e evidenciam que a utilização de glicose foi mais eficiente, para solubilização de rochas potássicas e fosfáticas, por bactérias, em meio líquido, sendo esses resultados, explicados pelo fato de que a glicose é facilmente assimilada, no metabolismo microbiano, por meio da glicólise e do ciclo de Krebs (MOAT et al. 2002).

Para os fungos (Tabela 4), observou-se também, diferença estatística significativa, entre fonte e dose de carbono, bem como interação significativa para fungos x dose x fonte de carbono utilizada, na solubilização com a rocha Verdete de Abaeté. No caso da glicose, o teor de K liberado no meio, variou de 17,35 a 96,43 mg L<sup>-1</sup>, sendo os melhores resultados obtidos, com as concentração de 2% e de 5%, para o isolado F22, e de 5%, para o isolado F18, entre as quatro concentrações testadas. Entretanto, verificaram-se valores similares, também na presença de sacarose (20,52 a 86,96 mg L<sup>-1</sup>), com maior taxa de solubilização, na presença das doses 2% e 5% de sacarose, dependendo do isolado de fungo.

Resultados semelhantes foram observados por Miranda (2016), que ao avaliar microrganismos para solubilização de K, em Fonolito, com as fontes de carbono, glicose e sacarose, concluiu que a taxa de solubilização está relacionada, com as propriedades do metabolismo microbiano, bem como com a fonte de carbono.

**Tabela 4** – Valores de K, solubilizado pelos fungos F22 e F18, após 18 dias de incubação, em meio de cultura suplementado, com Verdete de Abaeté, com duas fontes de carbono, em quatro doses.

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, diferem entre si, pelo teste Scott Knott ( $p \leq 0,05$ ).

Fungos	Solubilização de K mg L <sup>-1</sup>									
	Glicose				Média	Sacarose				Média
	0,5%	1%	2%	5%		0,5%	1%	2%	5%	
<b>F22</b>	17,35 c A	43,73 b A	54,43 a B	61,46 a B	44,24 b	20,52 d A	54,56 c A	74,30 b A	86,96 A a	56,54 a
<b>F18</b>	22,88 d A	47,53 c A	65,73 b A	96,43 a A	59,08 a	17,49 d A	58,26 b A	73,63 a A	76,80 A b	58,14 a
<b>Média</b>	20,11	45,63	60,08	78,94		19,05	56,41	73,96	81,83	

Os efeitos, de fonte e de dose, de carbono sobre a alteração de pH do meio de cultura, enriquecido com rocha Verdete de Abaeté, na presença de duas estirpes de bactérias, B30 e B166, e duas de fungos, F18 e 22, são apresentados nas Tabelas 5 e 6. Verificou-se a acidificação do meio, independente da estirpe e do grupo funcional, do microrganismo. Em todos os casos, nos meios de cultura, contendo glicose, como fonte de carbono, houve uma tendência de redução de pH, em função de aumento da concentração, com maior acidez observada na presença das concentrações de 2% e de 5%. Comportamentos similares, foram observados para sacarose (Tabela 5 e 6).

**Tabela 5** – pH final, do meio de cultura suplementado, com Verdete de Abaeté, com duas fontes de carbono, em quatro doses distintas, após 12 dias de incubação, com bactérias.

Bactérias	pH									
	Glicose				Média	Sacarose				Média
	0,5%	1%	2%	5%		0,5%	1%	2%	5%	
<b>Controle</b>	5,69 a A	5,69 a A	5,49 a A	5,20 b A	5,52 A	5,91 b A	6,37 a A	5,90 b A	5,87 b A	6,01 A
<b>B30</b>	5,07 a B	4,07 b B	2,21 c C	2,33 c B	3,41 B	4,83 a B	3,85 b B	4,02 b B	3,44 b B	4,03 B
<b>B116</b>	3,89 a C	3,04 b C	2,83 b B	2,24 c B	3,00 C	4,02 a C	3,94 a B	3,88 a B	3,13 b B	3,74 B
<b>Média</b>	5,21	4,26	3,51	3,25		4,92	4,72	4,60	4,13	

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, diferem entre si, pelo teste Scott Knott ( $p \leq 0,05$ ).

Diversos autores, relatam que a acidificação, do meio de cultura, constitui um dos principais mecanismos envolvidos na solubilização de rochas. Esse processo pode ser explicado: i - pelo efeito da concentração de ions de hidrogênio, exercido sobre a atividade do metabolismo microbiano; e, ii - pela disponibilidade de nutrientes (GAIND AND GAUR, 1989; MARRA et al. 2015). Os diferentes metabólitos, produzidos ao longo do cultivo microbiano, proporcionam um aumento da acidez total do meio, apresentando um maior ou um menor potencial, para promoção da solubilidade de minerais (SATTAR et al. 2019).

**Tabela 6** - pH final, do meio de cultura suplementado, com Verdete de Abaeté, com duas fontes de carbono e quatro doses distintas, após 18 dias de incubação com microrganismos fúngicos.

Fungos	pH									
	Glicose				Média	Sacarose				Média
	0,5%	1%	2%	5%		0,5%	1%	2%	5%	
<b>Controle</b>	5,69 a A	5,69 a A	5,49 a A	5,20 b A	5,52 A	5,91 b A	6,37 a A	5,90 b A	5,87 b A	6,01 A
<b>F22</b>	5,00 a B	3,87 b B	2,79 c B	2,31 b B	3,49 B	5,61 a B	4,06 b B	2,42 c B	1,93 d B	3,51 B
<b>F18</b>	5,10 a B	3,80 b B	2,72 c B	1,94 b C	3,39 B	5,63 a B	3,75 b C	2,60 c B	2,05 d B	3,51 B
<b>Média</b>	5,26	4,45	3,66	3,15		5,71	4,72	3,64	3,27	

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, diferem entre si, pelo teste Scott Knott ( $p \leq 0,05$ ).

Com base nesses resultados, a utilização de glicose, como fonte de carbono, na concentração de 2%, favoreceu maior eficiência no processo de solubilização biológica, de rochas silicáticas, por fungos e por bactérias.

### **5.5 Solubilização de potássio, em meio líquido, com Verdete de Abaeté e com Biotita Xisto, com teor de 2% glicose**

Na Tabela 7, estão apresentados os resultados da capacidade de biossolubilização e da alteração de pH do meio de cultura, com as rochas Verdete de Abaeté e Biotita Xisto, por 10 isolados bacterianos testados. Independente da rocha analisada, verificaram-se diferenças significativas, para o teor de potássio, liberado no meio de cultura, em função dos isolados, após 12 dias de incubação. Os teores de K, liberado no meio, na presença da rocha Verdete de Abaeté variaram de 0,89 a 11,53 mg L<sup>-1</sup>, sendo os valores mais elevados, detectados para as estirpes B30, B116 e B1485. Observou-se ainda, correlação negativa e significativa ( $r = -0,83$ ), entre a solubilização de K e a acidez do meio, com valor de pH 5,94 a 2,21.

Para o meio de cultura, suplementado com Biotita Xisto (Tabela 7), obteve-se resultados mais promissores, pelas estirpes B2096, B1931, B1485 e B30. Diferentemente da rocha Verdete, para Biotita Xisto, não foi possível identificar solubilização, na presença de algumas das estirpes testadas (B2176, B1509 e B1479). Também não foi observada correlação, entre pH e teores de solubilização da rocha.

Diversos autores relataram resultados similares, aos encontrados no presente trabalho, de solubilização de minerais silicáticos, por bactérias. Zhang e Kong (2014) obtiveram 4,4 mg L<sup>-1</sup> de K solubilizado; Setiawati e Mutmainnah (2016) até 18,17 mg L<sup>-1</sup> de K; e Schueler Ta et al. (2018) 13,78 mg L<sup>-1</sup> de K, trabalhando com a rocha Verdete. Vale salientar, que as taxas de solubilização, variam de acordo com o período de incubação.

**Tabela 7** - Solubilização de K (mg L<sup>-1</sup>) e alteração de pH do meio de cultura contendo pó de rocha Verdete de Abaeté e Biotita Xisto, por dez estirpes de bactérias, após 12 dias de incubação.

Isolados de Bactérias	Verdete			Biotita		
	pH	K mg L <sup>-1</sup>	I %	pH	K mg L <sup>-1</sup>	I %
Controle	5,94 a	-		6,87 a	-	
B30	2,21 i	11,53 a	139%	6,47 c	46,40 b	108%
B116	2,50 h	9,89 b	119%	6,60 b	44,40 c	104%
B1433	3,33 f	5,03 e	61%	3,68 e	43,90 c	102%
B1434	4,83 b	0,89 g	11%	6,27 c	5,50 d	13%
B1479	4,53 c	5,03 e	61%	6,84 a	n.d e	n.d
B1485	2,99 g	8,96 c	108%	6,21 c	47,53 b	111%
B1509	4,02 d	4,29 f	52%	5,40 d	n.d e	n.d
B1931	4,18 d	8,09 d	98%	3,45 e	47,67 b	112%
B2096	3,78 e	7,99 d	97%	3,58 e	53,73 a	125%
B2176	4,17 d	5,13 e	62%	6,87 a	n.d e	n.d
<b>CV(%)</b>	2,91	4,59		2,43	6,41	

Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste Scott Knott ( $p \leq 0,05$ ).

n.d indica que não foi detectada, nenhuma taxa de liberação de K.

I %= percentual de incremento de solubilização, em relação ao controle. Controle Verdete 8,26 mg L<sup>-1</sup>. Controle Biotita 42,73 mg L<sup>-1</sup>.

Verificou-se que a bactéria B30 foi mais eficiente, na solubilização de K, suplementado com Verdete de Abaeté, com incremento de 139% de K, em relação ao controle não inoculado. Com a rocha Biotita Xisto, observou-se que a bactéria B2096 foi mais eficiente, com incremento de 125%, em relação ao controle não inoculado.

Os teores de K solubilizado e a alteração de pH, do meio de cultura líquido, com as rochas Verdete de Abaeté e Biotita Xisto, por isolados fúngicos, estão apresentados na Tabela 8. Observa-se teores de K, variando de 0,0 mg L<sup>-1</sup> a 70,13 mg L<sup>-1</sup> para Verdete de Abaeté, e de 1,27 mg L<sup>-1</sup> a 87,73 mg L<sup>-1</sup>, para Biotita Xisto, após 18 dias de incubação. Os isolados, F22 e F18, apresentaram as maiores taxas de solubilização de K, no meio com a rocha Verdete. Os isolados, FCMSV414, FCMSV528, F2179, F4 e F2844, apresentaram teores de K menores que o controle, sugerindo uma provável imobilização de K. Notou-se a acidificação do meio, com pH variando de 5,69 a 1,83, observando-se correlação negativa significativa, entre pH e solubilização ( $r = -0,62$ ), com relação entre taxa de solubilização e a acidificação do meio.

De modo similar, os resultados com a rocha Biotita (Tabela 8), demonstraram alta taxa de solubilização, com os isolados fúngicos, F22 e F18. Em relação à acidificação do meio, foi

possível identificar, que o pH variou, de 6,21, a 1,72, com correlação não significativa, entre pH e solubilização.

Esses resultados são superiores aos relatados por Ramos (2016) e Duarte (2020), que obtiveram valores variando de 0,67 mg L<sup>-1</sup> a 6,72 mg L<sup>-1</sup>, na solubilização com a rocha Verdete. Teores relatados por Dalcin (2008), são semelhantes aos obtidos nesse trabalho, com a rocha Biotita, evidenciando teores de K variando de 0 mg L<sup>-1</sup> a 134 mg L<sup>-1</sup>, com fungos e com bactérias. Arbieto (2005) e Yuan et al. (2004), relatam que diferenças nos teores de solubilização de K, nas interações entre microrganismos e rochas, podem ser atribuídas aos diferentes mecanismos de solubilização, de cada microrganismo, e ainda, devido à propriedades dos minerais presentes nas rochas.

Verificou-se que os isolados fúngicos, F22 e F18, foram os mais eficientes na solubilização de K, com incremento de 1213% e de 1170%, respectivamente, na solubilização em relação ao controle não inoculado, com a rocha Biotita. Na solubilização, com a rocha Verdete, observou-se incremento de 757% e de 496%, respectivamente, para as estirpes F22 e F18, em relação ao controle não inoculado.

**Tabela 8** - Solubilização de K (mg L<sup>-1</sup>) e alteração do pH, do meio de cultura, contendo pós de rochas Verdete de Abaeté e Biotita, por 12 estirpes de fungos, após 12 dias de incubação.

Isolados de Fungos	Verdete			Biotita		
	pH	K mg L <sup>-1</sup>	I %	pH	K mg L <sup>-1</sup>	I %
Controle	5,69 a	-		6,21 a	-	
F3	3,56 d	8,03 e	87%	5,07 c	42,03 c	581%
F18	2,05 h	45,93 b	496%	1,91 i	84,57 b	1170%
F22	1,83 i	70,13 a	757%	1,72 k	87,73 a	1213%
F56	3,69 c	12,53 c	135%	5,37 b	38,47 d	532%
F4	3,22 e	n.d f	n.d	3,37 g	1,27 i	17,56
F2179	4,99 b	n.d f	n.d	3,93 d	8,65 g	120%
F2844	3,17 e	n.d f	n.d	3,09 h	6,90 h	95%
FCMSV05	3,45 d	1,19 f	13%	3,78 e	26,57 e	367%
FCMSV14	2,77 f	12,96 c	140%	3,04 h	37,23 d	515%
FCMSV414	3,70 c	n.d f	n.d	3,75 e	21,87 f	302%
FCMSV408	2,52 g	9,86 d	106%	2,91 i	41,01 c	567%
FCMSV528	3,14 e	n.d f	n.d	3,63 f	5,43 h	75%
<b>CV (%)</b>	2,90	7,09		1,33	2,95	

Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste Scott Knott ( $p \leq 0,05$ )

n.d indica que não foi detectada, nenhuma taxa de liberação de K.

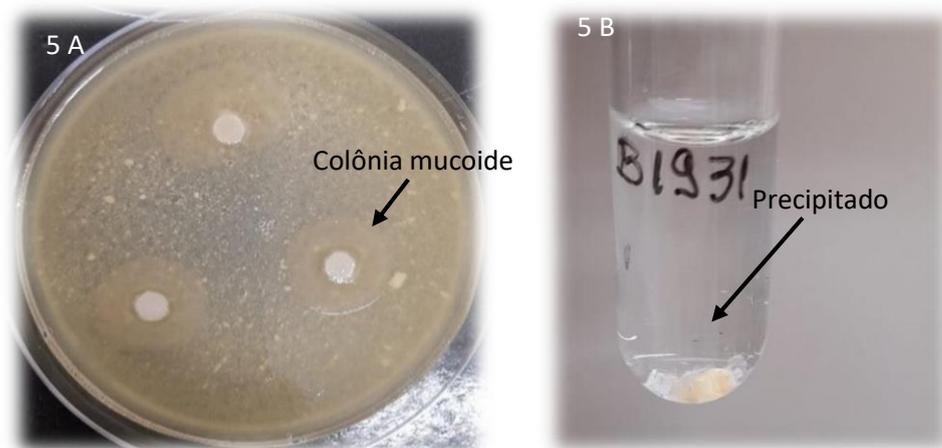
I % = percentual de incremento de solubilização em relação ao controle. Controle Verdete 9,26 mg L<sup>-1</sup>. Controle Biotita 7,23 mg L<sup>-1</sup>.

## 5.6 Produção de exopolissacarídeos (EPS) por bactérias e fungos

A capacidade de produção de EPS, de 10 isolados de bactérias e de 12 isolados de fungos, foi avaliada em meios sólido e líquido, respectivamente. Para bactérias, observou-se produção de EPS, em 90% dos isolados testados, que foi detectada pela presença de colônia mucoide, em torno do disco, distribuído na superfície do meio, (Figura 5 A), e confirmada, pela sua precipitação em etanol absoluto (Figura 6 B). Apenas o isolado B2176 não apresentou formação de colônia mucoide.

Esses resultados, demonstrando a produção de EPS, por bactérias, solubilizadoras de K, estão de acordo com os relatados por Anjanadevi et al. (2013) e Florentino et al. (2017), que observaram associação entre solubilização de K e produção de exopolissacarídeo, no meio de cultura.

O EPS, produzido por bactérias, é capaz de protegê-las contra o estresse ambiental, formando biofilme, e este microambiente, facilita a extração de nutrientes inorgânicos, de superfícies minerais (WARREN 2005).



**Figura 5.** (5A) Colônia mucoide em torno de disco indicando produção de EPS (5B) precipitação de colônia mucoide, em etanol.

No caso dos fungos, a produção de EPS, foi observada em 33% dos isolados testados, sendo considerados positivos, F2179, F2844, FCMSV14 e FCMSV528. Os demais isolados, F3, F18, F22, F56, F4 e FCMSV05, não demonstraram formação de EPS.

Evidenciou-se que os fungos, que produziram EPS, apresentavam uma maior viscosidade do meio de cultura, essa podendo estar associada com a produção de EPS. Esses

resultados corroboram com os de Anjanadevi et al. (2013), que sugeriram que a associação de viscosidade, do meio de cultura, está relacionada com a maior produção de EPS, pelo isolado.



**Figura 6.** (6A) Fermentação em meio líquido com isolados fúngicos, (6B) Centrifugação das amostras, (6C) Precipitação do sobrenadante em etanol para detecção de produção de EPS.

### 5.7 Avaliação qualitativa da produção de biofilme por bactérias e fungos

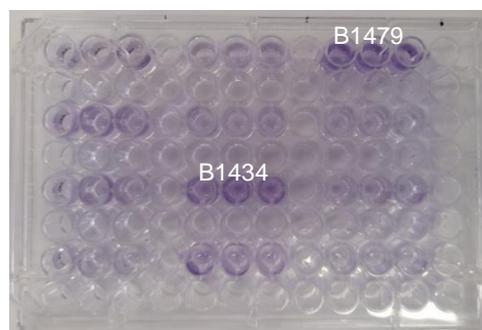
A produção de biofilme, por microrganismos, vem sendo associada na literatura à tolerância a estresses abióticos. Nesse trabalho, empregando-se a escala de Stepanovic et al. (2007), verificou-se que 90% dos isolados bacterianos, produziram biofilme, sendo 70%, classificados como fracamente produtores, 20%, moderadamente produtores, e 10%, não produtores (Tabela 9). Os isolados, B1434 e B1479, foram os mais promissores, sendo considerados como moderadamente produtores de biofilme, no entanto, não são as melhores estirpes, solubilizadoras de K.

A formação de biofilme no aluminossilicato, aumenta o tempo de residência do microrganismo, na superfície mineral, aumentando, conseqüentemente, o intemperismo mineral. Estudos mostram que biofilmes microbianos, não apenas aceleram o processo de intemperismo, mas também regulam as perdas por desnudação, agindo como uma camada protetora, cobrindo a interface mineral (ETESAMI et al. 2017).

Man et al. (2014), avaliando a solubilização de K, por bactérias, em rocha Xisto, detectou que a formação de biofilme, na superfície mineral, promoveu a corrosão do xisto e a liberação de K, de Si e de Al.

**Tabela 9** - Classificação de bactérias, produtoras de biofilme, em meio líquido, densidade óptica a 570nm, de acordo com escala de Stepanovic et al. (2007).

Isolados	Média	Classificação *
Controle(-)	0,06	-
B30	0,11	+
B116	0,07	+
B1433	0,12	+
B1434	0,15	++
B1479	0,21	+++
B1485	0,07	+
B1509	0,07	+
B1931	0,10	+
B2096	0,08	+
B2176	0,06	-



**Figura 7.** Desenvolvimento de cor arroxeada indicando produção de biofilme

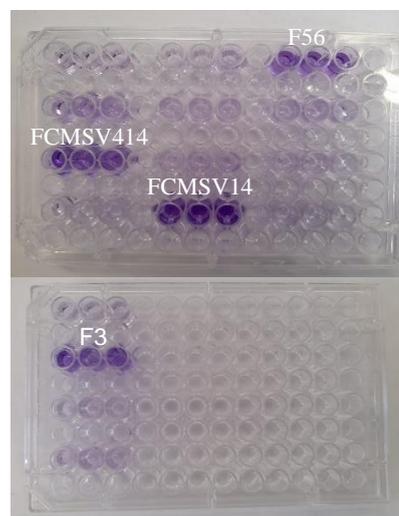
Classificação\* = não formadores ( $Doa \leq 0,06$ ) (-), fracamente formadores ( $0,06 \leq Doa \leq 0,12$ ) (+); moderadamente formadores ( $0,12 < Doa \leq 0,24$ ) (++); fortemente formadores ( $Doa > 0,24$ ) (+++). Sendo: Doa = Densidade óptica da absorbância.

Dos 12 isolados fúngicos avaliados, 100% produziram biofilme (Tabela 10). Verificou-se que 33%, dos isolados fúngicos, foram classificados como fortemente formadores de biofilme (F3, F56, FCMSSV14 e FCMSV4), 8%, classificados como moderadamente formadores, e 58%, fracamente formadores. Nagaraju et al. (2017), pesquisando a formação de biofilmes, na superfície de fungos e de bactérias, solubilizadores de potássio, notou aumento considerável, na solubilização do zinco e na liberação de potássio, em comparação com isolados que não produziram biofilme, concluindo ainda, que a formação de biofilme, também aumenta as chances de sobrevivência do microrganismo, no solo por mais tempo.

Estudos mostram, que a formação de biofilme, por fungos, é uma estratégia plausível para a sobrevivência desses, no solo (SENEVIRATNE e JAYASINGHEARACHCHI, 2003). A formação de biofilme é ideal para introduzir, microrganismos inoculantes no solo, pois sua formação favorece a proteção contra ambientes adversos e a competição por populações de microrganismos, nativas do solo (NAGARAJU et al. 2017).

**Tabela 10** - Classificação de fungos, produtores de biofilme, em meio líquido, densidade óptica a 570nm, de acordo com escala de Stepanovic et al. (2007).

Isolados	Média	Classificação *
Controle (-)	0,07	-
F3	0,51	+++
F18	0,10	+
F22	0,10	+
F56	1,13	+++
F4	0,09	+
F2179	0,09	+
F2844	0,09	+
FCMSV05	0,10	+
FCMSV14	0,60	+++
FCMSV414	0,54	+++
FCMSV408	0,24	++
FCMSV528	0,09	+



**Figura 8.** Desenvolvimento de cor arroxeada indicando produção de biofilme.

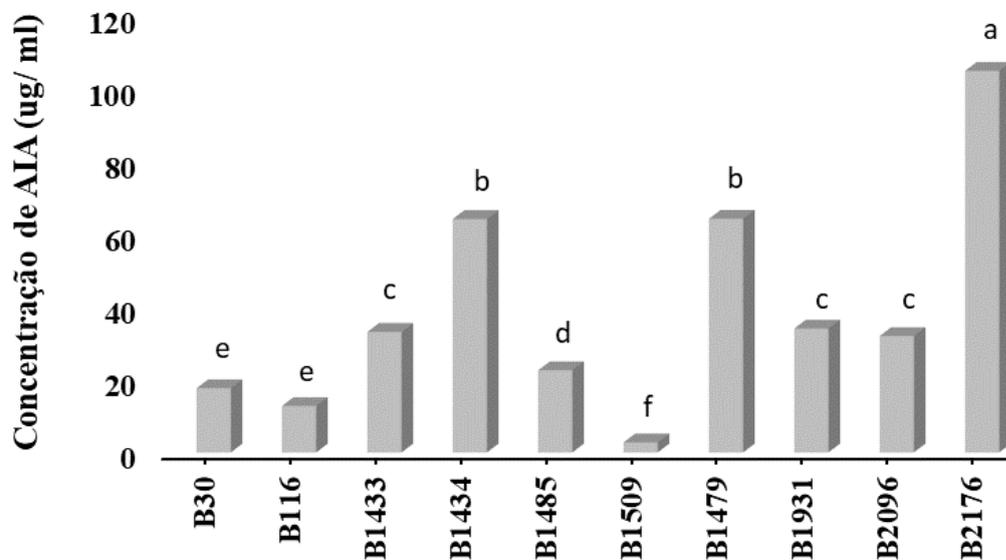
Classificação\* = não formadores ( $Doa \leq 0,06$ ) (-), fracamente formadores ( $0,06 \leq Doa \leq 0,12$ ) (+); moderadamente formadores ( $0,12 < Doa \leq 0,24$ ) (++); fortemente formadores ( $Doa \leq 0,24$ ) (+++). Sendo: Doa = Densidade óptica da absorbância.

### 5.8 Produção de AIA - Ácido Indol-Acético, por bactérias e por fungos

Os resultados da produção de AIA, pelos os isolados bacterianos, apresentados na Figura 7, indicaram diferença estatística significativa, entre as estirpes avaliadas. Observou-se que a produção de AIA, variou entre 2,77 e 104,98  $\mu\text{g/mL}$ , sendo os isolados, B2176, B1434 e B1479, considerados mais eficientes, não havendo correlação entre taxa de solubilização e produção de AIA.

Os resultados encontrados, para a produção de AIA, nesse trabalho são, superiores aos observados por Veloso et al. (2020), que obtiveram valor máximo de produção de AIA, de 61,67  $\mu\text{g/mL}$ , em microrganismos solubilizadores de fosfato. Resultados similares, também foram encontrados por Pádua e Florentino (2022), que evidenciaram que as estirpes utilizadas em seu trabalho, tinham como características fisiológicas, capacidade de solubilizar fósforo e potássio, e produzir AIA.

O AIA é o principal representante das auxinas, um hormônio vegetal, responsável pelo alongamento celular, sendo sua produção regularmente apontada, como um dos mecanismos utilizados, pelo microrganismo, para promover o desenvolvimento das plantas (OLANREWAJU et al. 2017).

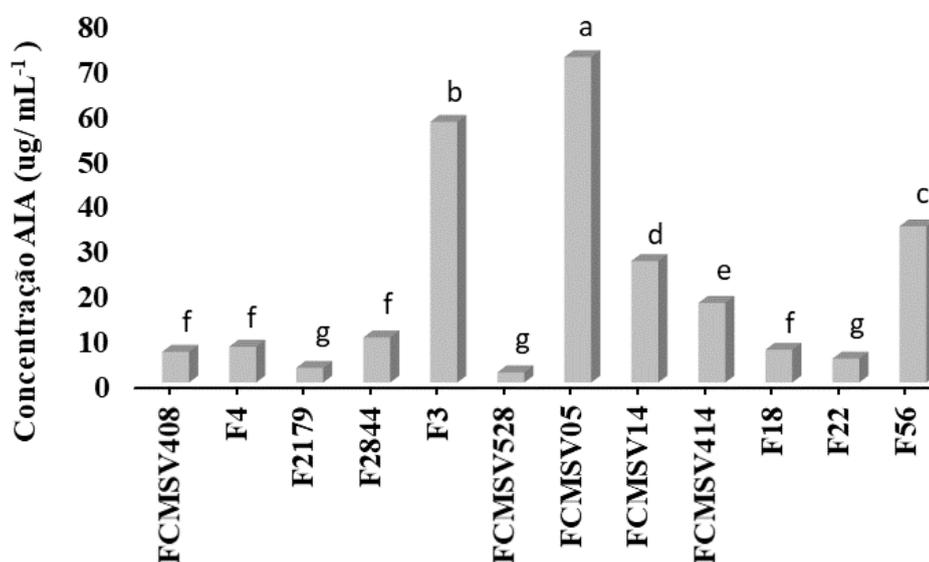


**Figura 7.** Produção de AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$  AIA), por 10 isolados bacterianos. As médias seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, com uma probabilidade de 5%.

Quando se avaliou, a produção de ácido indol acético (AIA), por fungos, em meio de cultura, suplementado com DL-triptofano, observou-se diferença significativa entre os isolados, com valores variando entre 6,8 e 72,05  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 8). Os isolados, FCMSV05 e F3, foram considerados os mais eficientes, na produção de AIA.

Os valores obtidos nesse trabalho, são superiores aos valores observados por França et al. (2017), Chagas et al. (2013) e Oliveira et al. (2012), que avaliaram o potencial de produção de AIA, por isolados de *Trichoderma sp.*, e que constataram, que eles foram eficazes na produção de AIA, com a adição do precursor L-triptofano, no meio de cultura, com valores variando de 0,70 a 8,44  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Outros trabalhos, evidenciam que a produção de AIA, por isolados fúngicos, podem proporcionar o desenvolvimento radicular das plantas, por sintetização na rizosfera. (CARVALHO FILHO et al. 2008).



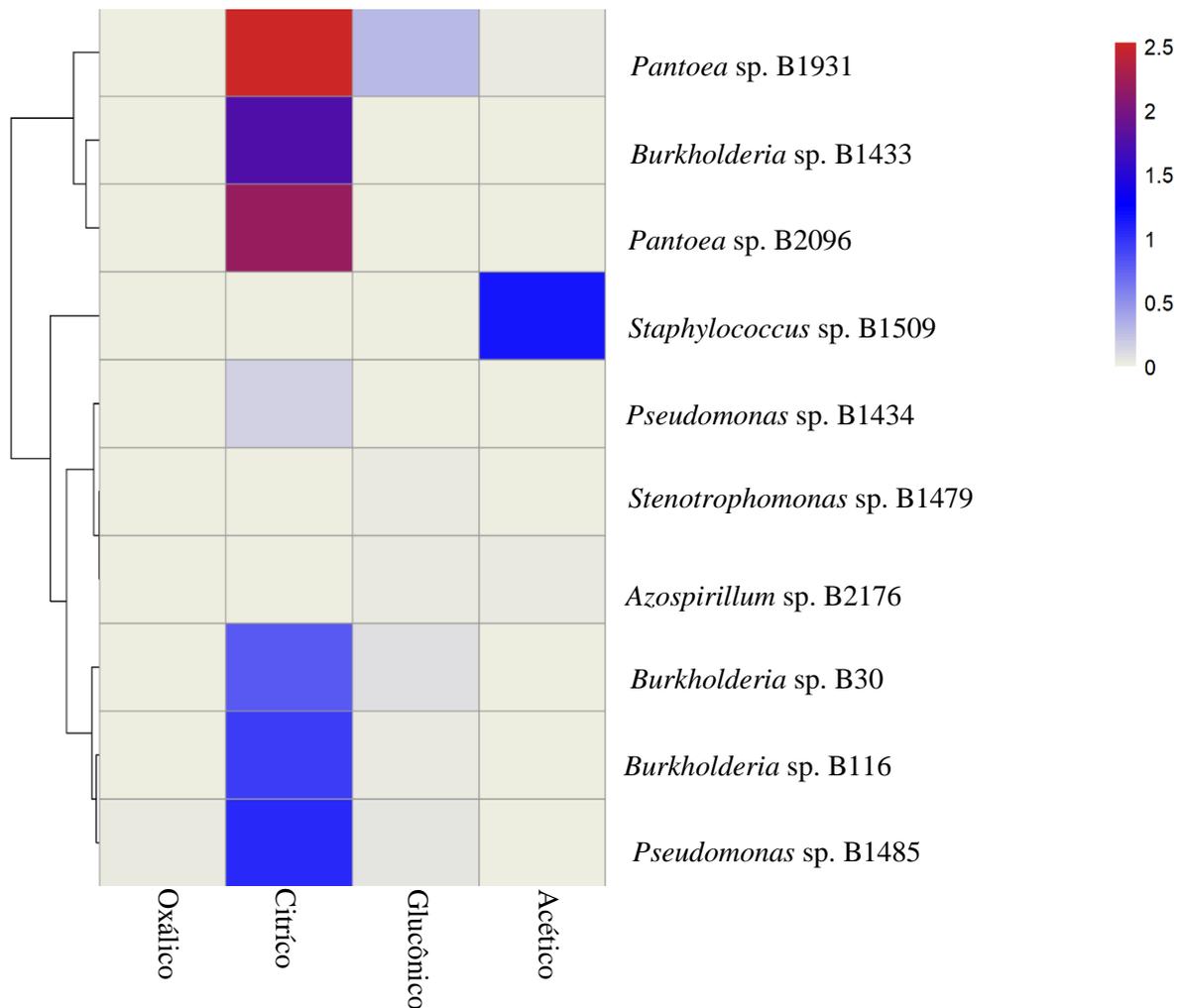
**Figura 8.** Produção de AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$  AIA), por 12 isolados fúngicos. As médias seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, com uma probabilidade de 5%..

### 5.9 Produção de ácidos orgânicos, por bactérias e por fungos

As análises por HPLC, dos sobrenadantes, obtidos da solubilização de potássio, com as diferentes rochas (Verdete de Abaeté e Biotita Xisto), e com os diferentes grupos de microrganismos, fungos e bactérias, estão representadas, nos dendogramas de agrupamento nas Figuras 9, 10, 11 e 12. A produção desses compostos, variou entre bactéria e a presença de rocha. Dentre os ácidos orgânicos analisados, os padrões detectáveis foram apenas dos ácidos acético, glucônico, cítrico e oxálico, em diferentes concentrações, independente da rocha e do microrganismo.

Na presença de Biotita Xisto (Figura 9), que representa o agrupamento hierárquico da produção de ácidos orgânicos, por bactérias, observa-se que 90% dos isolados, produziram ácido oxálico (com produção até  $0,03 \text{ g L}^{-1}$ ), 70% produziram ácido cítrico (com produção até  $2,53 \text{ g L}^{-1}$ ), 60% produziram ácido glucônico (com produção até  $0,30 \text{ g L}^{-1}$ ) e 40% produziram ácido acético (com produção até  $1,15 \text{ g L}^{-1}$ ). No primeiro agrupamento, os isolados obtiveram menor produção de ácido cítrico, variando de 0 a  $1 \text{ g L}^{-1}$ . O segundo grupo, representa as bactérias, que mais produziram ácido cítrico: B1931 (*Pantoea* sp.), B1433 (*Burkholderia* sp.) e B2096 (*Pantoea* sp.). O subgrupo, dentro desse grupo, demonstra que as bactérias, B1433 e B2096, não produziram ácidos glucônico e acético, apesar de terem produzido ácidos cítrico e oxálico.

Na Tabela 11, estão representados os valores de ácidos orgânicos e de pH, do meio, contendo rocha Biotita Xisto. Nota-se que os isolados, que apresentaram uma maior produção de ácido cítrico, obtiveram os menores valores de pH, sendo evidenciada correlação negativa significativa, entre pH e a produção desse ácido. Não foi identificada correlação significativa, entre pH e a produção de ácidos oxálico, glucônico e acético.



**Figura 9.** Agrupamento hierárquico de bactérias, produtoras de ácidos orgânicos, em meio, contendo rocha Biotita Xisto. A concentração foi determinada, por análise de HPLC, e expressa em  $g L^{-1}$ , da concentração máxima observada, para cada metabólito, e, representada por uma escala de cores, com diferentes intensidades de azul. Concentrações de ácidos acético, glucônico, cítrico e oxálico, foram utilizados, para construir a árvore de distância. A figura foi construída utilizando o programa R.

**Tabela 11.** Valores de pH e de produção de ácidos orgânicos, determinados em sobrenadante, em meio líquido, acrescido com a rocha Biotita Xisto e com bactérias.

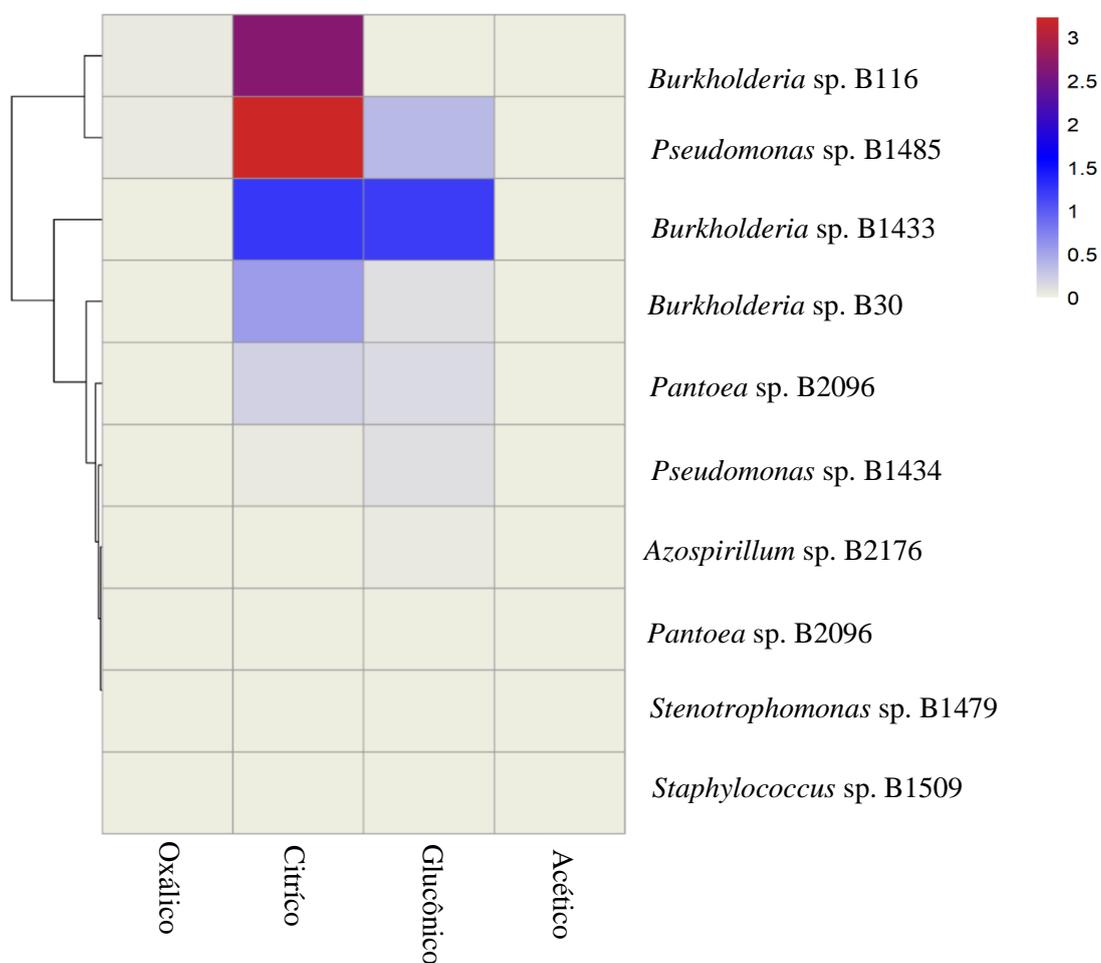
Bactérias	Produção de ácidos orgânicos g L <sup>-1</sup>				
	pH	Oxálico	Cítrico	Glucônico	Acético
<i>Burkholderia</i> sp. B30	6,47	0,02	0,80	0,08	0,00
<i>Burkholderia</i> sp. B116	6,6	0,02	0,95	0,03	0,00
<i>Burkholderia</i> sp. B1433	3,68	0,02	1,77	0,00	0,00
<i>Pseudomonas</i> sp. B1434	6,27	0,01	0,17	0,00	0,00
<i>Stenotrophomonas</i> sp. B1479	6,84	0,01	0,00	0,05	0,02
<i>Pseudomonas</i> sp. B1485	6,21	0,03	1,04	0,07	0,00
<i>Staphylococcus</i> sp. B1509	5,4	0,01	0,00	0,00	1,15
<i>Pantoea</i> sp. B1931	3,45	0,02	2,53	0,30	0,03
<i>Pantoea</i> sp. B2096	3,58	0,02	2,20	0,00	0,00
<i>Azospirillum</i> sp. B2176	6,87	0,00	0,00	0,05	0,03
	<b>Correlação</b>	-0,45	-0,85*	-0,29	-0,03

Análise de correlação significativa (\*).

Na presença de Verdete de Abaeté (Figura 10), está representado o agrupamento hierárquico, da produção de ácidos orgânicos, por bactérias. Observa-se que 40% dos isolados, produziram ácido oxálico (com produção até 0,04 g L<sup>-1</sup>), 60% produziram ácido cítrico até 3,23 g L<sup>-1</sup>, 70% produziram ácido glucônico (até 1,22 g L<sup>-1</sup>) e 10% produziram ácido acético (até 0,03 g L<sup>-1</sup>). Pode-se observar, que no primeiro agrupamento, os isolados obtiveram menor produção de ácido cítrico, variando de 0 a 1,23 g L<sup>-1</sup>, oxálico e glucônico. O segundo grupo, representa as bactérias, que mais produziram ácido cítrico: B116 (*Burkholderia* sp.) e B1485 (*Pseudomonas* sp.), e produziram ainda, baixas quantidades de ácidos oxálico e glucônico.

Valores superiores, de produção de ácido oxálico, foram relatados por Sheng & He (2006), que em estudos sobre solubilização de rochas potássicas, por estirpes de *Bacillus edaficus*, detectaram de 0,188 g L<sup>-1</sup> a 0,192 g L<sup>-1</sup>, de ácido oxálico, e, 0,119 g L<sup>-1</sup> a 0,148 g L<sup>-1</sup>, de ácido tartárico.

Na Tabela 12, estão representados os valores de ácidos orgânicos e pH, em meio contendo rocha Verdete de Abaeté. Verifica-se que os isolados, que apresentaram uma maior produção de ácido cítrico, obtiveram os menores valores de pH, com correlação negativa significativa, entre pH e a produção desse ácido. O mesmo ocorreu entre pH e a produção de ácido oxálico, onde também evidenciou-se, correlação negativa significativa. Não foi encontrada, correlação entre pH e produção dos ácidos glucônico e acético



**Figura 10.** Agrupamento hierárquico de bactérias, produtoras ácidos orgânicos, em meio contendo rocha Verdete de Abaeté. A concentração foi determinada por análise de HPLC, e expressa em  $\text{g L}^{-1}$ , da concentração máxima observada, para cada metabólito, e, representada por uma escala de cores, com diferentes intensidades de azul. Concentrações de ácidos acético, glucônico, cítrico e oxálico, foram utilizados para construir a árvore de distância. A figura foi contruida utilizando o software R.

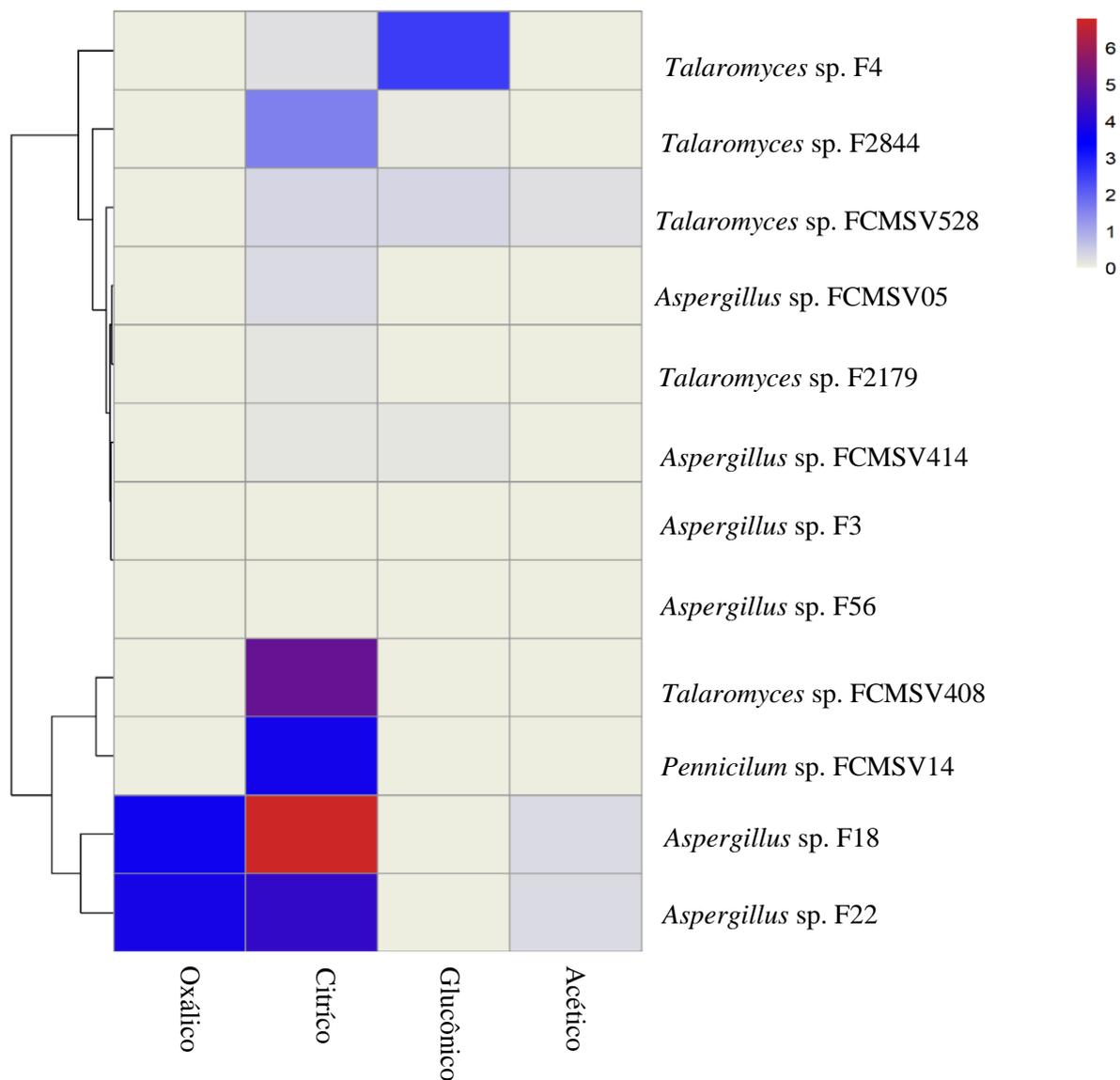
**Tabela 12.** Valores de pH e produção de ácidos orgânicos, determinados em sobrenadante, em meio líquido, acrescido com a rocha Verdete de Abaeté, por dez estirpes de bactérias.

Bactérias	Produção de ácidos orgânicos g L <sup>-1</sup>				
	pH	Oxálico	Cítrico	Glucônico	Acético
<i>Burkholderia</i> sp. B30	2,21	0,02	0,57	0,11	0,00
<i>Burkholderia</i> sp. B116	2,50	0,04	2,68	0,03	0,00
<i>Burkholderia</i> sp. B1433	3,33	0,02	1,23	1,22	0,03
<i>Pseudomonas</i> sp. B1434	4,83	0,00	0,05	0,12	0,00
<i>Stenotrophomonas</i> sp. B1479	4,53	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Pseudomonas</i> sp. B1485	2,99	0,04	3,23	0,36	0,00
<i>Staphylococcus</i> sp. B1509	4,02	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Pantoea</i> sp. B1931	4,18	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Pantoea</i> sp. B2096	3,78	0,00	0,20	0,13	0,00
<i>Azospirillum</i> sp. B2176	4,17	0,00	0,00	0,05	0,00
<b>Correlação</b>		-0,80*	-0,67*	-0,22	-0,13

Análise de correlação significativa (\*).

Na Figura 11, está representado o agrupamento hierárquico, da produção de ácidos orgânicos, por fungos, na presença de Biotita Xisto. Observa-se que 41%, dos isolados, produziram ácido oxálico (com produção até 3,75 g L<sup>-1</sup>), 83% produziram ácido cítrico (com produção até 6,79 g L<sup>-1</sup>), 33% produziram ácido glucônico (com produção até 2,52 g L<sup>-1</sup>) e 50% produziram ácido acético (com produção até 0,31 g L<sup>-1</sup>). Esse agrupamento é dividido por dois subgrupos, o primeiro composto, por F18 (*Aspergillus* sp.) e por F22 (*Aspergillus* sp.), que produziram ácidos oxálico, cítrico e acético, e, o segundo subgrupo, que produziu apenas ácido cítrico, composto por FCMSV14 (*Penicillium* sp.) e por FCMSV408 (*Talaromyces* sp.). O segundo grupo, representa menor produção de ácidos orgânicos, ácido cítrico, variando de 0 a 1,62 g L<sup>-1</sup> (F2844 *Talaromyces* sp.), e ácido glucônico, variando de 0 a 2,52 g L<sup>-1</sup> (F4 *Talaromyces* sp.). Os isolados, F56 (*Aspergillus* sp.) e F3 (*Aspergillus* sp.), não produziram nenhuma quantidade dos ácidos dosados acima.

Na Tabela 13, estão estabelecidos os valores, de ácidos orgânicos e de pH, em meio contendo rocha Biotita Xisto, onde observa-se que os isolados, que apresentaram uma maior produção de ácido cítrico F18 (*Aspergillus* sp.) e F22 (*Aspergillus* sp.), obtiveram os menores valores de pH (1,91 e 1,72, respectivamente). Identificou-se correlação negativa significativa, entre a produção desse ácido e o pH. O mesmo ocorreu com a produção dos ácidos oxálico e acético, onde também ocorreu correlação negativa significativa, com o pH. No entanto, entre pH e ácido glucônico, não foi detectada correlação significativa.



**Figura 11.** Agrupamento hierárquico, de fungos produtores de ácidos orgânicos, em meio contendo rocha Biotita Xisto. A concentração foi determinada, por análise de HPLC e expressa em  $\text{g L}^{-1}$ , da concentração máxima observada, para cada metabólito, e representada por uma escala de cores, com diferentes intensidades de azul. Concentrações de ácidos acético, glucônico, cítrico e oxálico, foram utilizados para construir a árvore de distância. A figura foi construída utilizando o software R.

**Tabela 13** - Valores de pH e produção de ácidos orgânicos, determinados em sobrenadante, em meio líquido, acrescido com a rocha Biotita Xisto para doze estirpes de fungos.

Fungos	pH	Produção de ácidos orgânicos g L <sup>-1</sup>			
		Oxálico	Cítrico	Glucônico	Acético
<i>Aspergillus</i> sp. F3	5,07	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Talaromyces</i> sp. F4	3,37	0,00	0,26	2,52	0,00
<i>Talaromyces</i> sp. FCMSV528	3,63	0,01	0,36	0,36	0,26
<i>Aspergillus</i> sp.F18	1,91	3,66	6,79	0,00	0,31
<i>Aspergillus</i> sp. F22	1,72	3,75	4,22	0,00	0,30
<i>Talaromyces</i> sp. FCMSV408	2,91	0,01	5,06	0,00	0,00
<i>Aspergillus</i> sp. FCMSV414	3,75	0,00	0,15	0,15	0,05
<i>Aspergillus</i> sp. F56	5,37	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Aspergillus</i> sp. FCMSV05	3,78	0,00	0,30	0,00	0,00
<i>Pennicilum</i> sp. FCMSV14	3,04	0,00	3,71	0,00	0,00
<i>Talaromyces</i> sp. F2179	3,93	0,01	0,17	0,00	0,04
<i>Talaromyces</i> sp. F2844	3,09	0,00	1,62	0,13	0,05
	<b>Correlação</b>	-0,72*	-0,80*	-0,02	-0,64*

Análise de correlação significativa (\*).

Na presença de Verdete de Abaeté (Figura 12), está representado o agrupamento hierárquico, da produção de ácidos orgânicos, por fungos. Observa-se que 25% dos isolados, produziram ácido oxálico (com produção de até 2,99 g L<sup>-1</sup>), 75% produziram ácido cítrico (com produção até 7,66 g L<sup>-1</sup>), 41% produziram ácido glucônico (com produção até 1,64 g L<sup>-1</sup>) e 33% produziram ácido acético (com produção até 0,21 g L<sup>-1</sup>). Esse agrupamento é dividido em dois subgrupos; o primeiro, composto por F22 (*Aspergillus* sp.) - produzindo ácidos oxálico 2,63 g L<sup>-1</sup>, cítrico 4,6 g L<sup>-1</sup> e acético 0,21 g L<sup>-1</sup>, e, FCMSV14 (*Pennicilum* sp.) - produzindo ácidos cítrico 3,04 g L<sup>-1</sup>, e glucônico 0,29 g L<sup>-1</sup>. O segundo subgrupo é composto por F18 (*Aspergillus* sp.) - produzindo ácidos oxálico 1,92 g L<sup>-1</sup> e cítrico 7,66 g L<sup>-1</sup>, e FCMSV408 (*Talaromyces* sp.), que produziu apenas ácido cítrico 5,99 g L<sup>-1</sup>. O segundo grupo representa menor produção de ácidos orgânicos, destacando-se F2844 (*Talaromyces* sp.), produzindo 2,99 g L<sup>-1</sup> de ácido oxálico. Os isolados, F56 (*Aspergillus* sp.) e F3 (*Aspergillus* sp.), não produziram nenhuma quantidade dos ácidos dosados acima.

Na Tabela 14, estão representados os valores de ácidos orgânicos e pH, em meio contendo rocha Verdete de Abaeté. Observa-se que os isolados, que apresentaram maior produção de ácido cítrico (F22 *Aspergillus* sp. e F18 *Aspergillus* sp.), obtiveram os menores valores de pH (1,83 e 2,05, respectivamente). Foi identificada correlação negativa significativa,

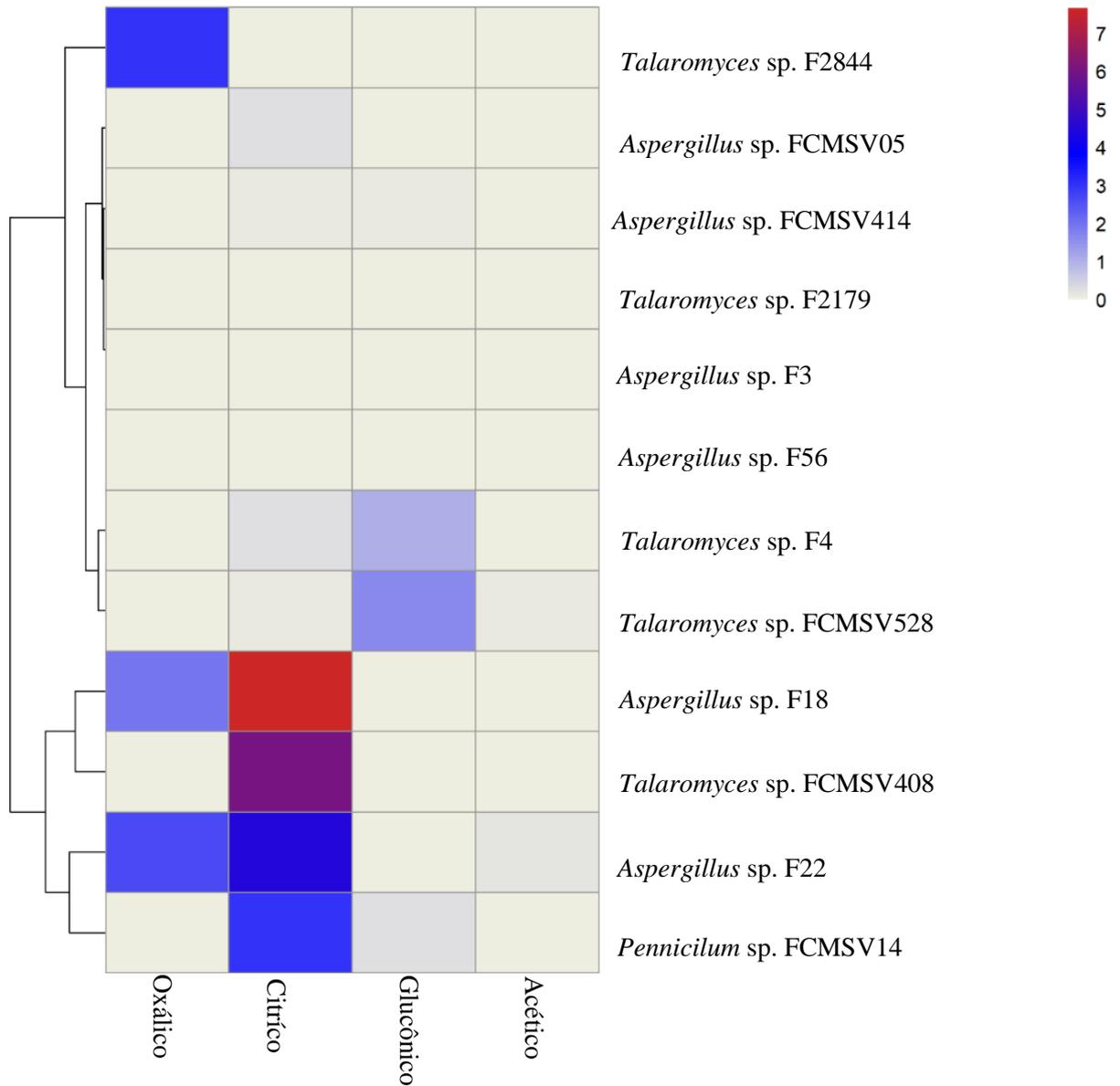
entre a produção desse ácido e o pH. Não foi encontrada correlação significativa, entre a interação de pH e os ácidos oxálico, glucônico e acético.

Diversos autores, relatam que os ácidos oxálico, tartárico, glucônico, cítrico, málico, láctico e succínico, são os mais liberados durante a solubilização de K (PRAJAPATI et al. 2012; WU et al. 2005; ZARJANI et al. 2013). Estes ácidos atuam na liberação do K, fortemente ligado à estrutura tetraédrica de  $\text{SiO}_4$  e de  $\text{AlO}_4$ , por meio da liberação de íons  $\text{H}^+$ , na formação de complexos com os cátions, ligados ao mineral e à capacidade quelante de íons, por meio dos grupos hidroxila e carboxila, componentes estruturais dos ácidos orgânicos (MEENA et al. 2014).

Os valores obtidos nesse trabalho, são superiores aos encontrados por Ramos (2016), que ao avaliarem a produção de ácidos orgânicos, liberados em sobrenadante de solubilização com rocha Verdete, por fungos, encontraram valores, variando de  $0,007 \text{ g L}^{-1}$  a  $1,22 \text{ g L}^{-1}$ , para ácido cítrico, e valores variando de  $0,0002 \text{ g L}^{-1}$  a  $0,006 \text{ g L}^{-1}$ , para ácido oxálico.

Girgis (2008), ao avaliar bactérias do gênero *Bacillus*, verificou que a produção de ácidos orgânicos, como oxálico, fumárico, cítrico e tartárico, podem quebrar a estrutura dos minerais, extraindo elementos indispensáveis para o metabolismo, ocasionando disponibilização de K, e que, o aumento da acidez total, associada à produção de exopolissacarídeo, também pode aumentar os teores de K, no meio.

Behera et al., (2014), Meena et al. (2014) e Parmar & Sindhu (2013), apontam que a acidificação do meio, pela liberação de  $\text{H}^+$ , é proveniente, principalmente, da produção de ácidos orgânicos. No entanto, Liaud et al. (2014), sugerem que, apesar da presença de ácidos orgânicos, serem o principal fator de acidificação do meio, nem sempre é observada, esta correlação, pois em alguns casos, esta, também pode ser devido à remoção do amônio, a partir do sulfato de amônio, utilizado como fonte de N, ou a excreção de  $\text{H}^+$ , proveniente da assimilação do  $\text{NH}_4^+$ .



**Figura 12.** Agrupamento hierárquico, de fungos, produtores de ácidos orgânicos, em meio contendo rocha Verdete de Abaeté. A concentração foi determinada, por análise de HPLC e expressa em  $\text{g L}^{-1}$ , da concentração máxima observada, para cada metabólito, e ,representada por uma escala de cores, com diferentes intensidades de azul. Concentrações de ácidos acetico, glucônico, cítrico e oxálico, foram utilizados, para construir a árvore de distância. A figura foi construída usando o software R.

**Tabela 14** - Valores de pH e produção de ácidos orgânicos, determinados em sobrenadante, de meio líquido, acrescido com a rocha Verdete de Abaeté, para doze estirpes de fungos.

Fungos	pH	Produção de ácidos orgânicos g L <sup>-1</sup>			
		Oxálico	Cítrico	Glucônico	Acético
<i>Aspergillus</i> sp. F3	3,56	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Talaromyces</i> sp. F4	3,22	0,00	0,27	1,05	0,00
<i>Talaromyces</i> sp. FCMSV528	3,14	0,00	0,12	1,64	0,10
<i>Aspergillus</i> sp. F18	2,05	1,92	7,66	0,00	0,00
<i>Aspergillus</i> sp. F22	1,83	2,63	4,46	0,00	0,21
<i>Talaromyces</i> sp. FCMSV408	2,52	0,00	5,99	0,00	0,00
<i>Aspergillus</i> sp. FCMSV414	3,70	0,00	0,11	0,12	0,07
<i>Aspergillus</i> sp. F56	3,69	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Aspergillus</i> sp. FCMSV05	3,45	0,00	0,27	0,00	0,00
<i>Penicillium</i> sp. FCMSV14	2,77	0,00	3,04	0,29	0,00
<i>Talaromyces</i> sp. F2179	4,99	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Talaromyces</i> sp. F2844	3,17	2,99	0,08	0,08	0,03
	<b>Correlação</b>	-0,53	-0,77*	-0,01	-0,41

Análise de correlação significativa (\*).

### 5.10 Identificação molecular em bactérias e em fungos

As análises de sequenciamento, do gene 16S rRNA, dos isolados bacterianos, potencialmente solubilizadores de K, mostraram um alto nível de similaridade, com as sequências depositadas no banco de dados NCBI, entre 98,43% e 100%. Na Tabela 15, estão apresentados os gêneros, dos 10 isolados bacterianos.

**Tabela 15** - Identificação molecular, das dez estirpes de bactérias, solubilizadoras de K.

Bactérias	Frag. (pb)	Gênero	Cob. (%)	E-value	Ident. (%)	GenBank
B1485	1.095	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	0,0	99,01	OL944325.1
B1509	865	<i>Staphylococcus</i> sp.	99	0,0	100,00	MT642942.1
B2176	1.382	<i>Azospirillum</i> sp.	100	0,0	99,42	CP007794.1
B116	1.389	<i>Burkholderia</i> sp.	100	0,0	100,00	CP050980.1
B1434	1.389	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	0,0	98,43	OK274034.1
B2096	1.436	<i>Pantoea</i> sp.	100	0,0	99,17	CP014207.1
B1433	1.434	<i>Burkholderia</i> sp.	99	0,0	100,00	CP017240.1
B1931	1.427	<i>Pantoea</i> sp.	100	0,0	99,72	MN641907.1
B1479	1.444	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	100	0,0	100,00	JQ828868.1
B30	1.470	<i>Burkholderia</i> sp.	100	0,0	99,80	CP050980.1

Considerando a similaridade de gêneros, podem ser observados seis gêneros distintos. O gênero *Burkholderia* sp. (isolados B30, B116 e B1433), o gênero *Pantoea* sp. (isolados B2096 e B1931), o gênero *Pseudomonas* sp. (isolados B1485 e B1434), o gênero *Staphylococcus* sp. (isolado B1509), o gênero *Azospirillum* sp. (isolado B2176) e o gênero *Stenotrophomonas* sp. (isolado B1479).

Estudos mostram, que entre os principais grupos de bactérias, solubilizadoras de K, já descritas, estão as espécies *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Paenibacillus* sp., *Bacillus mucilaginosus*, *B. edaphicus*, *B. circulans*, *Arthrobacter* sp., *Enterobacter hormaechei*, *Paenibacillus mucilaginosus*, *P. frequentans*, *Cladosporium* sp., *Aminobacter* sp., *Sphingomonas* sp., *Burkholderia* sp., e *Paenibacillus glucanolyticus* (PAIVA et al. 2022).

Na Tabela 16, são apresentados os gêneros, dos isolados fúngicos, potencialmente solubilizadores de K. As sequências da subunidade, 18S rRNA, mostraram um nível de similaridade, com as sequências depositadas no banco de dados NCBI, entre 93,98% e 99,81%. Considerando a similaridade de gêneros, podem ser evidenciados três gêneros distintos. O grupo I, *Aspergillus* sp. (F56, FCMSV414, FCMSV408, F3, F22 e F18), o grupo II, *Talaromyces* sp. (F4, F2844, F2179, FCMSV528, FCMSV408) e o grupo III, *Penicillium* sp. (FCMSV14).

**Tabela 16** - Identificação molecular, das doze estirpes de fungos, solubilizadores de K.

Fungos	Frag . (pb)	Gêneros	Cob. (%)	E-value	Ident. (%)	GenBank
FCMSV14	438	<i>Penicillium</i> sp.	99	0,0	98,68	AB667857.1
F56	531	<i>Aspergillus</i> sp.	99	0,0	99,65	MT529482.1
F4	532	<i>Talaromyces</i> sp.	98	0,0	99,81	MH793055.1
FCMSV414	525	<i>Aspergillus</i> sp.	90	0,0	99,05	OL711675.1
F2844	519	<i>Talaromyces</i> sp.	99	0,0	99,01	AB474749.2
F2179	437	<i>Talaromyces</i> sp.	100	0,0	99,31	AB474749.2
FCMSV408	551	<i>Aspergillus</i> sp.	100	0,0	96,73	KY937925.1
FCMSV528	541	<i>Talaromyces</i> sp.	97	0,0	99,81	MH793055.1
FCMSV408	450	<i>Talaromyces</i> sp.	95	0,0	93,98	AB474749.2
F3	535	<i>Aspergillus</i> sp.	100	0,0	99,07	OL711675.1
F22	486	<i>Aspergillus</i> sp.	98	0,0	99,15	LC570775.1
F18	423	<i>Aspergillus</i> sp.	100	0,0	99,76	LC570775.1

Entre os principais grupos de fungos, solubilizadoras de K, destacam-se os gêneros a saber:

*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp. e os fungos micorrízicos do gênero *Glomus* sp. (PAIVA et al. 2022).

## 6. CONCLUSÕES

- A utilização de testes preliminares, em meio de cultura, contendo silicato de alumínio e K, mostrou-se adequada, como estratégia para pré-seleção de microrganismos eficientes, para biossolubilização de rochas silicáticas.
- A eficiência de solubilização de K, varia em função do tipo de rocha silicática e do genótipo de microrganismo, e correlaciona-se negativamente, com valor de pH, do meio. E, maior disponibilidade, de K, foi observada na presença da rocha Biotita.
- Com base nos parâmetros utilizados, houve diferenças entre os microrganismos testados, em relação à eficiência de biossolubilização de K, sendo os isolados bacterianos, B30 e B116 (*Burkholderia* sp.), B2096 e B1931 (*Pantoea* sp.), B1485 (*Pseudomonas* sp.), e os fúngicos, F22 e F18 (*Aspergillus* sp.), os que apresentam maior capacidade de solubilização de K, independente do tipo de rocha.
- O uso de glicose, como fonte de carbono, na concentração de 2%, estimulou a eficiência de biossolubilização de K, na presença de Verdete de Abaeté.
- A maioria dos microrganismos testados foram considerados produtores de metabolitos, envolvidos na promoção de crescimento vegetal, tais como ácidos indol acético, biofilme, exopolissacarídeos e ácidos orgânicos.
- O perfil de ácidos orgânicos, produzidos por fungos e por bactérias, em meio líquido, mostra a presença de quantidades elevadas de ácido cítrico>oxálico>glucônio>acético.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEKSANDROV, V.G., BLAGODYR, R.N., IIEV, I.P., 1967. Phosphorus acid isolation from apatite produced by silicate bacteria. **Mikrobiol. Zh.** 29, 111–4.

ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**, 2º edição. 1997. 472 p.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J., ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Volume 25, Issue 17, 1 September, Pages 3389–3402.

ALVES, V. M. C.; GOMES, E. A.; RESENDE, A. V.; PAIVA, C. A. O.; MARRIEL, I. E.; SOUZA, S. M. LANA, U. G. P. **Solubilização de potássio presente em minerais por microrganismos e efeitos no desenvolvimento de culturas agrícolas**, 2021. 21 p. (Embrapa Milho e Sorgo Documento 246). Disponível em: <[https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1134272/1/Doc-264\\_Solubilizacao-de-potassio.pdf](https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1134272/1/Doc-264_Solubilizacao-de-potassio.pdf)>. Acesso em: 19 abr. 2022.

ANDA (2019). Disponível em: [anda.org.br](http://anda.org.br). Acesso em setembro 2020. BARBOSA, L. O. **Avaliação da Biossolubilização de Potássio a partir de Agrominerais Empregando Fungos Filamentosos**. 2011, 60p. Dissertação (mestrado) – UFRJ / Escola de Química, Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2011. Rio de Janeiro, 2011.

ANJANADEVI, I.P.; JOHN, N.S.; JOHN, S.K.; JEEVA, M.L. 2013. Isolation and characterization of N fixing bacteria from elephant foot yam (*Amorphophallus paeoniifolius* (Dennst.) Nicolson) growing regions of south India. **J. Root. Crops.**, 39, 154–162.

ARBIETO, E. A. M. **Biodisponibilização de nutrientes de rochas por microrganismos do solo**. Florianópolis-SC, 2005. 81f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

ARSHAD M, FRANKENBERGER W.T. Jr. (1998) Plant growth regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. **Adv Agron** 62:146–151.

BARBOSA, L. O. **Avaliação da Biossolubilização de Potássio a partir de Agrominerais Empregando Fungos Filamentosos**. Dissertação 2011. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2011. XVII, 60p.; il.

BEHERA, B.C.; SINGDEVSACHAN, R.R.; DUTTA, S.K.; THATOI, H.N. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove-A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 97-110, 2014.

BERENDSEN, R.L.; PIETERSE, C.M.J.; BAKKER, P.A.H.M. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.8, p.478- 486, 2012.

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**, v.17, p.399-406, 1976.

BLAUT, M.; COLLINS, M. D.; WELLING, G. W. (2002). Molecular biological methods for studying the gut microbiota: the EU human gut flora project. **The British Journal of Nutrition**, v. 87 Suppl 2, p. S203-211.

BRIC, J.M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p 535-538, 1991.

BRUNALE, P. P. M. **Identificação molecular dos micro-organismos cultiváveis contaminantes de Diesel A e Diesel B S500**. Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília Escola de Química. Auditório Lauro Morhy do Instituto de Química (IQ) da (UnB). Brasília: fevereiro de 2017.

CAMPE, J.; O'BRIEN, T.A.; BARKER, A.V. (1996). Soil remineralization for sustainable agriculture. **Remineralise the Earth, Spring**. p.141-164.

CARA, D. V. C. **Solubilização de Elementos Químicos do Verdete Pela Ação de Isolados Bacterianos Seleccionados da Rizosfera de *Helianthus annuus* L.** Tese de Doutorado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2016.

CARA, D. V. C.; RIZZO, A. C. L.; CUNHA, C. D.; ROCHA, D. L.; LEONEL, R. S.; SÉRVULO, E. F. C. Isolation of bacterial cultures from *Helianthus annuus* L. rhizosphere and assessment of bioweathering of verdete (Glauconitic Sandstone). **International Journal of Engineering & Technology**, v. 15, n. 6, p. 11-18, 2015.

CARA, D. V. C.; ROCHA, D. L.; CUNHA, C. D.; RIZZO, A. C. L.; SÉRVULO, E. F. C. **Solubilização biológica de potássio**. Rio de Janeiro: CETEM/MCTI, 2012. 42p.

CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo** (recurso eletrônico). 2ª Edição. Piracicaba: ESALQ, 2016. 221 p.

CARDOSO, E.J.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. 360 p.

CARVALHO-FILHO, M. R.; MELO, S. C. M.; SANTOS, R.P.; MENÊZES, J. E. **Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético *in vitro* e colonização endofítica de mudas de eucalipto**. Brasília, DF: Embrapa, 2008. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 226).

CHAGAS, P.C; SOBRAL, S.T.M; OLIVEIRA, R.R.; CHAGAS, E.A.; PIO, R; SANTOS, V.A. Physical and chemical methods to breach seed dormancy of sugar apple. **Revista de Ciências Agrárias**. 56: 101-106, 2013.

CHAGNON, P.L.; BRADLEY, R.L.; MAHERALI, H.; KLIRONOMOS, J. N. A trait-based framework to understand life history of mycorrhizal fungi. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 18, p. 484-491, 2013.

COELHO, A. M.; O Potássio na cultura do milho. In: SIMPÓSIO SOBRE POTÁSSIO NA AGRICULTURA BRASILEIRA, 2, 2004, São Paulo. **Anais do II Simpósio sobre Potássio na Agricultura Brasileira**. Piracicaba: Potafos, 2005. 841 p.

COLA, G. P. A.; SIMÃO, J.B.P. Rochagem como forma alternativa de suplementação de potássio na agricultura agroecológica. **Revista Verde** (Mossoró – RN), v. 7, n. 4, p. 15-27, outubro, 2012.

CORREA, J. S.; CAMARGOS, I. M. F.; RODRIGUES, T. T. M. S. **Bactérias endofíticas solubilizadoras de potássio nos minerais mica e feldspato**. In: I Seminário ProfEPT, VII seminário de iniciação científica do IFNMG. Instituto Federal norte de Minas Gerais, Pirapora, 2019.

COUTINHO, H. L. C.; OLIVEIRA, V. M.; MANFIO, G.P. **Diversidade microbiana em amostras ambientais**. In: GARAY, I. E. G.; DIAS, B. F. S. Conservação da biodiversidade em ecodidtemas tropicais: avanços conceituais e revisão de novas metodologias de avaliação e monitoramento. Petrópolis: Editora Vozes, 2001.430 p.

DALCIN, G. **Seleção de microrganismos promotores da disponibilidade de nutrientes contidos em rochas, produtos e rejeitos de mineração**. 2008. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

DOURADO, M. L. **Novas Rotas de Produção de Fertilizante Potássico: A Biossolubilização de Agrominerais**. Niterói, 2018. 78 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal Fluminense, Escola de Engenharia, Niterói, 2018.

DUARTE, C. F. D.; CECATO, U.; HUNGRIA, M.; FERNANDES, H. J. (2020) Morphogenetic and structural characteristics of *Urochloa* species under inoculation with plant-growth-promoting bacteria and nitrogen fertilisation. **Crop and Pasture Science**, 71, 82 – 89.

DUCHICELA, J.; SULLIVAN, T. S.; BONTTI, E.; BEVER, J. D. Soil aggregate stability increase is strongly related to fungal community succession along an abandoned agricultural field chronosequence in the Bolivian Altiplano. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 50, p. 1266-1273, 2013.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA — EMBRAPA (2021). **Brasil é quarto maior produtor mundial de grãos e maior exportador de carne bovina, mostra estudo**. Disponível em:<<https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/-/noticia/62619259/brasil-e-o-quarto-maior-produtor-de-graos-e-o-maior-exportador-de-carne-bovina-do-mundo-diz-estudo>>. Acesso em novembro 2021.

ETESAMI, H.; EMAMI, S.; ALIKHANI, H. A. Potassium solubilizing bacteria (KSB): mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects: a review. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 17, n. 4, p. 897-911, 2017.

FAHIM, M.M. The effect of light and others factors on the sporulation of *Alternaria porri*. **Trans. Br. Mycol. Soc.** 49 (1): 73-8, 1966.

FERREIRA, D.F. (2011). SISVAR: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35: 1036–1042.

FLIESSBACH, A.; WINKLER, M.; LUTZ, M. P.; OBERHOLZER, H. R.; MADER, P. Soil amendment with *Pseudomonas fluorescens* CHA0: lasting effects on soil biological properties in soils low in microbial biomass and activity. **Microbial Ecology**, New York, v. 57, p. 611–623, 2009.

FLORENTINO, L. A.; REZENDE, A. V.; MIRANDA, C. C. B.; MESQUITA, A. C.; MANTOVANI, J. R. ; BIANCHINI, H. C. (2017). Potassium solubilization in phonolite rock by diazotrophic bacteria. **Comunicata Scientiae**, 8(1), 17-23.

FONSECA, M. S. **Produção e caracterização de exopolissacarídeo sintetizado por fungo filamentoso isolado de palha de coqueiro**. 2016. 29 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) – Departamento de química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2016.

FRANÇA, S.; RONCONI, C. M. M.; SILVA, A. A. S. Estudo da cinética de liberação de potássio contido no flogopitito da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ROCHAGEM, 2, 2013, Poços de Caldas. **Anais**. p 200-211. Poços de Caldas: Petrobras: Embrapa, 2013.

Gaind, S., Gaur, A.C., 1989. Effect of pH on phosphate solubilization by microbes. *Curr. Sci.* 58, 1208–1211.

GAIND, S.; GAUR, A. C. Effect of ph on phosphate solubilization by microbes. **Current Science Association**. Vol. 58, No. 21 (November 5, 1989), pp. 1208-1211 (4 pages).

GALKIEWICZ J. P.; KELLOGG, C. A. (2008) Cross-kingdom amplification using bacteria-specific primers: complications for studies of coral microbial ecology. *Applied and Environment Microbiology*, v.74, p.7828- 7831.

GILLER, P.S. The diversity of soil communities, the ‘poor man’s tropical rainforest’. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 5, p. 135-168, 1996.

GIRGIS, M. G. Z.; HEBA, M. A.; SHARAF, M. S. *In Vitro* evaluation of rock phosphate and potassium solubilizing potential of some bacillus strains. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, 2(1): 68-81, 2008.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. 1951. **Colorimetric estimation of indole-acetic acid**. *Plant Physiol.* , 26 ( 1951 ) , pp . 192-195

GUIMARÃES, D. P. et al. Optimization of dextran synthesis and acidic hydrolysis by surface response analysis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 16, n. 2, p.129-139, 1999.

GUIMARÃES, P. S.; LUCIO, C. H.; SOARES, E. M.; NONATO, L. V.; COELHO, A. M.; ALVES, V. M. C.; MARRIEL, I. E. **Liberação de potássio de rocha silicática brecha**

**alcalina influenciada pelo genótipo de fungo, in vitro.** In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 26.; SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA-DO-CARTUCHO, SPODOPTERA FRUGIPERDA, 2.; SIMPÓSIO SOBRE COLLETOTRICHUM GRAMINICOLA, 1., 2006, Belo Horizonte. Inovação para sistemas integrados de produção: trabalhos apresentados. [Sete Lagoas]: ABMS, 2006. CD-ROM.

HEAD, I. M.; CAIN, R. B.; SUETT, D.L. **Molecular aspects of enhanced microbial degradation of pesticides.** In: BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE-PESTS AND DISEASES, 3., 1990, 1990. P. 907-916.

HENSEL, J. (1989). **Brout und Stein.** Tradução Sebastião Pinheiro – Pães de Pedra. Porto Alegre, Fundação Juquira Candiru, 2003.

ILCHENKO, W & GUIMARÃES, D. (1953). **Sobre a utilização agrícola dos sienitos nefelínicos do Planalto de Poços de Caldas.** MG. Inst. Tecn. Avulso. 15. 16p.

JIMENEZ GÓMEZ, S. (1992). **Fertilizantes de Liberación Lenta.** Mundi-Prensa. Madrid. 126 p.

KHALID, A.; TAHIR, S.; ARSHAD, M.; ZAHIR Z.A. (2004) Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis in rhizosphere vs. non-rhizosphere soil. **Aust J Soil Res** 42:921–926.

LANE, D. J.; PACE, B.; OLSEN, G. J. (1985) **Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 82, n. 20, p. 6955–6959.

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

LEITE, R. C.; DOS SANTOS, J. G. D.; SILVA, E. L.; ALVES, C. R. C. R.; HUNGRIA, M.; LEITE, R. D. C. (2019). Productivity increase, reduction of nitrogen fertiliser use and drought-stress mitigation by inoculation of Marandu grass (*Urochloa brizantha*) with *Azospirillum brasilense*. **Crop & Pasture Science**, 70, 61–67.

LEONARDOS, O.H.; FYFE, W.S.; KROMBERG, B. (1976). Rochagem: método de aumento de fertilidades em solos lixiviados e arenosos. Congr. Bras. Geol. Ouro Preto. **Anais.** SBG. p. 137-145.

LIAUD, N.; GINIÉS, C.; NAVARRO, D.; FABRE, N.; CRAPART, S.; HERPOËL-GIMBERT, I.; LEVASSEUR, A.; RAOUCHE, S.; SIGOILLOT, J.C. **Exploring fungal biodiversity: organic acid production by 66 strains of filamentous fungi.** Fungal Biology and Biotechnology, v. 1, p.1-10, 2014.

LIU, D.; LIAN, B.; DONG, H. Isolation of *Paenibacillus* sp. and assessment of its potential for enhancing mineral weathering. **Geomicrobiology Journal**, v. 29, n. 5, p. 413-421, 2012. DOI:

LODI, L. A. **Solubilização biológica de rocha potássica para aplicação como biofertilizante**. 2020. 77 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2020.

LOPES-ASSAD, M. L.; ROSA, M. M.; ERLER, G.; CECCATO-ANTONINI, S. R.; Solubilização de pó-de-rocha por *Aspergillus niger*, **Espaço & Geografia**, v. 9, n.1, 1-17, 2006.

LOPES-ASSAD, M.L.; AVANSINI, S.H.; ROSA, M.M.; CARVALHO, J.R.P. & ANTONINI, S.R.C. The solubilization of potassium-bearing rock powder by *Aspergillus niger* in small-scale batch fermentations. **Can. J. Microbiol.** v.56, p.598-605, 2010.

MALAVOLTA, E. Potássio: absorção, transporte e redistribuição na planta. In: SIMPÓSIO SOBRE POTÁSSIO NA AGRICULTURA BRASILEIRA, 2., 2004, São Pedro, SP. Potássio na agricultura brasileira: anais. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potássio e do Fosfato, 2005. p. 179-238.

MAN, L.Y.; CAO, X.Y.; SUN, D.S. Effect of potassium-solubilizing bacteria-mineral contact mode on decomposition behavior of potassium-rich shale. **Chin. J. Nonferrous Met.** 24, 48-52. 2014.

MARRA, L.M., OLIVEIRA-LONGATTI, S.M. DE, SOARES, C.R.F.S., LIMA, J.M. DE, OLIVARES, F.L., MOREIRA, F.M.S., 2015. Initial pH of medium affects organic acids production but do not affect phosphate solubilization. **Brazilian J. Microbiol.** 2, 367–375.

MARRIEL, I.E.; COELHO, A M.; GUIMARÃES, P.S.; SOARES, E.M.; NONATO, L.F.V.; OLIVEIRA, C.A.; ALVES, V.M.C. Seleção de isolados de fungos biossolubilizadores de rochas silicáticas in vitro. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 2006. Dourados. **Anais**. Embrapa Agropecuária Oeste. CD-ROM.

MARTINS, E. S. Remineralizadores na região Centro-Oeste. In: II Congresso Brasileiro de rochagem. **Anais do III Congresso Brasileiro de Rochagem**. 2016.

MARTINS, E.S. et al. Relatório 1ª Fase - Parceria Embrapa – TERRATIVA. **Agrominerais Silicáticos da TERRATIVA como Fertilizantes Potássicos e Condicionadores Multinutrientes de Solos para Aplicação no Bioma Cerrado**. 2015.

MARTINS, E.S.; OLIVEIRA, C.G.; RESENDE, A.V.; MATOS, M.S.F. Agrominerais – **Rochas Silicáticas como Fontes Minerais Alternativas de Potássio para a Agricultura**. In: Rochas e Minerais Industriais – usos e especificações / Ed. Adão Benvindo da Luz e Fernando Antonio Freitas Lins. 2Ed. – Rio de Janeiro: CETEM/MCT, Cap. 9, p. 205-221. 2008.

MARTINS, E.S.; RESENDE, A.V.; OLIVEIRA, C.G.; NETO, A.E.F. **Materiais silicáticos como fontes regionais de nutrientes e condicionadores de solos**. In: FERNANDES, F.R.; LUZ, A.B.; CASTILHOS, Z.C. Agrominerais para o Brasil. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2010. p. 89-104.

MEENA, V. S.; MAURYA, B. R.; VERMA, J. P. Does a rhizospheric microorganism enhance K<sup>+</sup> availability in agricultural soils. **Microbiological Research**, Jena, v. 169, n. 5/6, p. 337-347, 2014.

MEENA, V.S.; BAHADUR, I.; MAURYA, B.R.; KUMAR, A.; MEENA, R.K.; MEENA, S.K.; VERMA, J.P., 2016. **Potassium-solubilizing microorganisms in Evergreen Agriculture: An Overview**, in: Meena, Vijay Singh, Verma, Jay Prakash, Maurya, Bihari Ram, Meena, R.S. (Eds.). Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture. Springer, Nova Delhi, pp. 1–20.

MIRANDA, C.C.B. **Biossolubilização de fonolito por bactérias diazotróficas e potencial de utilização em *Brachiaria brizantha* cv. Mandaru**. 2016, 68 páginas. Dissertação (Mestrado) – Universidade José do Rosario Vellano, Alfenas, 2016.

MOAT, A.G.; FOSTER, J.W.; SPECTOR, M.P., 2002. Central Pathways of Carbohydrate Metabolism, in: Moat, A.G., Spector, M.P., Foster, J.W. (Eds.), **Microbial Physiology**. Wiley-Liss, pp. 350–367.

NAGARAJU, Y.; TRIVENI, S.; SUBHASHREDDY, R.; JHANSI, P. (2017). Biofilm Formation of Zinc Solubilizing, Potassium Releasing Bacteria on the Surface of Fungi. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci** (2017) 6(4): 2037-2047.

OLANREWAJU, O.S.; GLICK, B.R.; BABALOLA, O.O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.33, p.197, 2017.

OLIVEIRA, G. O. et al. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 3, p. 149-155, 2012.

OLIVEIRA, M. P.; MALAGOLLI, G. A.; CELLA, D. Mercado de Fertilizantes: dependência de importações do Brasil. **Revista Interface Tecnológica, [S. l.]**, v. 16, n. 1, p. 489-498, 2019.

PÁDUA, E. G. **Rochagem como adubação complementar para culturas oleoginosas**. 2012. 91 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

PÁDUA, E. G., FLORENTINO, L. A. Uso do fonolito e bactérias solubilizadoras de potássio na cultura do feijoeiro. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, e53711226248, 2022 (CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 |

PAIVA, C. A. O.; ALVES, V. M. C.; GOMES, E. A.; SOUSA, S. M.; LANA, U. G. P.; MARRIEL, I. E. M. **Microrganismos solubilizadores de fósforo e potássio na cultura da soja**. n.1.p.17, 2022. In: MEYER, M. C.; BUENO, A. de F.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. da (ed.). Bioinsumos na cultura da soja. Brasília, DF: Embrapa, 2022.

PARMAR, P.; SINDHU, S.S. Potassium solubilization by rhizosphere bacteria: influence of nutritional and environmental conditions. **Journal of Microbiology Research**, v. 3, p. 25-31, 2013.

PATTEN, C. L., & GLICK, B. R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian journal of microbiology**, 42 (3), 207-220.

PAULA, A. M.; BECKER, A. S.; SILVA, E. J.; VENDRUSCOLO E. C. G.; SANTOS, M. F. **Potencial de solubilização de potássio em rochas moídas por bactérias isoladas de área de mata.** In: XXXIV Congresso Brasileiro de ciências do solo. 2013.

PAULO, E. M.; VASCONCELOS, M. P.; OLIVEIRA, I. S.; AFFE, H. M. D. J.; NASCIMENTO, R.; MELO, I. S. D., ROQUE, M. R. A.; ASSIS, S. A. An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 32, 710-714. (2012).

PEREIRA, A. C.; GOMES, M. R.S.; ROCHA, S. D. F. Glauconita como fonte alternativa de potássio para produção de fertilizante de liberação lenta. **Geonomos**, 27(1), 32-37, 2019. [www.igc.ufmg.br/geonomos](http://www.igc.ufmg.br/geonomos).

PIZA, P. A. T.; BERTOLINO, L. C.; SILVA, A. A. S. SAMPAIO, J. A.; LUZ, A. B. Verdete da região Cedro de Abaeté (MG) como fonte alternativa para potássio. São Paulo, UNESP, **Geociências**, v. 30, n. 3, p. 345-356, 2011.

PRAJAPATI, K.; MODI, H. A. The importance of potassium in plant growth: a review. **Indian Journal of Plant Sciences**, v. 1, n. 1/2, p. 177-186, 2012.

PROSSER, J. I. Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. **Plant and Soil**, v. 244, p. 9-17, 2002.

RAMOS, T. C. D.A. **Diversidade genética e prospecção do potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados em solos do quadrilátero ferrífero – MG.** 2016. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciências agrárias) - Universidade Federal de São João Del Rei, Sete Lagoas, 2016.

RAMOS, T.C. D.A.; SOUZA, F. A.; PAIVA, C. A. O.; SIMEANE, M. L. F. TAKAHASHI, J. A. MARRIEL, I. E. **Biossolubilização de rochas silicáticas e produção de ácidos orgânicos in vitro por fungos filamentosos isolados de solos ferruginosos de Minas Gerais.** In:XXXI Congresso Nacional de Milho e Sorgo. Bento Gonçalves RS, 2016.

RAYMOND, J.; JANET, L.; CHRISTOPHER, R.; ROBERT, E. B. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 21, p. 541–554, 2004.

RESENDE, A.V.; MARTINS, E.S.; OLIVERA, C.G.; SENA, M.C.; MACHADO, C.T.T. KIMPARA, J.D. & OLIVEIRA FILHO, E.C. Suprimento de potássio e pesquisa de uso de rochas “in natura” na agricultura brasileira. **Espaço e Geografia**. v. 9, n.1.p. 19-42, 2006.

RIBEIRO, L.S.; SANTOS, A.R.; SOUZA, L.F.S.; SOUZA, J. S. Rochas silicáticas portadoras de potássio como fonte do nutriente para as plantas solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.34, n.3, p, 891-897, maio/jun.2010.

RODRIGUES, P. G. M.; JUNIOR, J. M. A.; ARAUJO, D. A. O.; RODRIGUES, T. T. M. S.; MOREIRA, L. L.Q.; MARTINS, E. S. Bactérias de solo solubilizadores de silicatos. **In 15º Congresso Nacional de meio ambiente**, Poços de Caldas, 2018.

SAGA CONSULTORIA. **Potássio: reservas, mercado e produção**. Disponível em: <https://sagaconsultoria.com/potassio-reservas-mercado-e-producao/>. Acesso em: 9 ago. 2021.

SAGHAI-MAROOF, M.A; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. (1984). Polimorfismos de comprimento de espaçador de DNA ribossômico em cevada: herança mendeliana, localização cromossômica e dinâmica populacional. **Anais da Academia Nacional de Ciências**, 81 (24), 8014-8018.

SARIKHANI, M.R.; OUSTAN, S.; EBRAHIMI, M.; ALIASGHARZAD, N. Isolation and identification of potassium-releasing bacteria in soil and assessment of their ability to release potassium for plants. **Eur. J. Soil Sci.** 69, 1078 e 1086. 2018.

SATTAR, A.; NAVEDA, M.; ALIA, M.; ZAHIRA, Z.; NADEEMB, S.; YASEENA, M.; MEENAC, V. S.; FAROOQD, M.; SINGHE, R.; RAHMANF, M.; MEENA, H. N. Perspectives of potassium solubilizing microbes in sustainable food production system: a review. **Applied Soil Ecology**, v. 133, p. 146-159, 2019.

SCHUELER, T. A.; DOURADO. M. L.; RIZZO, A. C. L. **Processos biotecnológicos para a solubilização de rochas fosfáticas**. Rio de Janeiro: CETEM/MCTIC, 2019. 45p. il. (Série Tecnologia Mineral, 102. IV.

SENEVIRATNE, G. (2003) Development of Eco-Friendly, Beneficial Microbial Biofilms. **Current Science**, 85, 1395-1396.

SETIAWATI, T.C.; MUTMAINNAH, L., 2016. Solubilization of Potassium Containing Mineral by Microorganisms From Sugarcane Rhizosphere. **Agric. Sci. Procedia** 9, 108–117.

SHENG, X.F; HE, L.Y. Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 66-72, 2006.

SILVA, M. C. P.; FIGUEIREDO, A. F.; ANDREOTE, F. D.; CARDOSO, E. J. B. N. (2013). Plant growth promoting bacteria in *Brachiaria brizantha*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 29, p. 163\2013171, 2013.

SILVA, U. C.; SILVA, P. G.; ADELÁRIO, F. M. S.; OLIVEIRA, A. C. de; ALVES, V. M. C.; MARRIEL, I. E. **Isolamento e caracterização de bactérias isoladas de pó de rocha quanto à liberação de potássio in vitro**. 28 p.: il. (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277; 177). Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2015.

SINDHU, R.; KUTTIRAJA, M.; PREETI, V. E.; VANI, S.; SUKUMARAN, R. K.; BINOD, P. A novel surfactant-assisted ultrasound pretreatment of sugarcane tops for improved enzymatic release of sugars. **Bioresource technology**, v. 135, p. 67–72, 2013.

SOUZA, F. N. S. **O potencial de agrominerais silicáticos como fonte de nutrientes na agricultura tropical**. Dissertação (doutorado). Universidade de Brasília, UNB. 2014.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA; G. D., DJUKIĆ, S.; ĆIRKOVIĆ, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing

conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Apmis**, 115, p.891-899, 2007.

SUN, F.; OU, Q.; WANG, N.; GUO, GUO, Z. X.; OU, Y.; LI, N.; PENG, C. Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from *Mikania micrantha* rhizospheric soil and their effect on *M. micrantha* plants. **Global Ecology and Conservation** .23. 2020.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal Porto Alegre: Artmed, 2004. p.449-484 UROZ, S.; CALVARUSO, C.; TURPAULT, M.P.; FREY-KLETT, P. Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. **Trends in Microbiology** .v.17 (8): 378 - 387, 2009.

UROZ, S.; CALVARUSO, C.; TURPAULT, M. P.; KLETT, P.F. Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. **ScienceDirect** .Volume 17, Issue 8, August 2009, Pages 378-387.

VELLOSO, C. C. V.; OLIVEIRA-PAIVA, C. A.; GOMES, E. A.; LANA, U. G. P.; CARVALHO, C. G.; GUIMARÃES, L. J. M.; PASTINA, M. M.; SOUSA, S. M. de. Genome-guided insights of tropical *Bacillus* strains efficient in maize growth promotion. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 96, n. 9, f1aa157, 2020.

WARREN, L.A., 2005. **Biofilms and metal geochemistry: the relevance of micro-organism-induced geochemical transformations**. In: Gadd, G.M., Semple, K.T., Lappin-Scott, H.M. (eds.), *Microorganisms and Earth Systems Advances in Geomicrobiology*, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

WU, S.C.; CAO, Z.H.; LI, Z.G.; CHEUNG, K.C.; WONG, M.H. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. **Geoderma**,v. 125, p. 155-166, 2005.

XU, X.; Du, X.; WANG, F.; SHA, J.; CHEN, Q.; TIAN, G.; ZHU, Z.; GE, S.; JIANG. Y. Effects of Potassium Levels on Plant Growth, Accumulation and Distribution of Carbon, and Nitrate Metabolism in Apple Dwarf Rootstock Seedlings. **Front. Plant Sci.** 11:904.

YADAV, J., VERMA, J.P., TIWARI, K.N., 2011. Solubilization of Tricalcium Phosphate by Fungus *Aspergillus niger* at Different Carbon Source and Salinity. **Trends Applied Sci. Res.** 6, 606–6013.

YUAN, L.; HUANG, J.; LI, X.; CHRISTIE, P. Biological mobilization of potassium from clay minerals by ectomycorrhizal fungi and eucalypt seedling roots. **Plant and Soil**, v. 262, p. 351-361, 2004.

ZARJANI, J.K.; ALIASGHARZAD, N.; OUSTAN, S.; EMADI, M.; AHMADI, A. Isolation and characterization of potassium solubilizing bacteria in some Iranian soils. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 77, p.75-89, 2013.

ZHANG, C.; KONG, F. Isolation and identification of potassium solubilizing bacteria from tobacco rhizospheric soil and their effect on tobacco plants. **Applied Soil Ecology, Amsterdam**, v. 82, p. 18-25, 2014.

ZÖRB, C.; SENBAYRAM, M.; PEITER, E. Potassium in agriculture: status and perspectives. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 9, p. 656-669, 2014.