

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**SOLUBILIZAÇÃO BIOLÓGICA DE ROCHA POTÁSSICA PARA  
APLICAÇÃO COMO BIOFERTILIZANTE**

**Ludimila Araújo Lodi**

**São Carlos, SP**

**2020**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**Ludimila Araújo Lodi**

**SOLUBILIZAÇÃO BIOLÓGICA DE ROCHA POTÁSSICA PARA  
APLICAÇÃO COMO BIOFERTILIZANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

**Orientadora: Dra. Cristiane Sanchez Farinas**

**São Carlos, SP**

**2020**

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE LUDIMILA ARAÚJO LODI APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 18 DE FEVEREIRO DE 2020.

BANCA EXAMINADORA:



Cristiane Sanchez Farinas  
Orientadora, EMBRAPA/UFSCar



Fernanda Perpétua Casciotori  
UFSCar



Rodrigo Klaic  
EMBRAPA

Dedido este trabalho a meu marido, Thiago Lodi,  
por todo o amor, suporte e companheirismo nesta  
jornada.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, em especial a Thiago Lodi, Euzita Araújo, Lourena Araújo, Rosane Machado, Francisco Rodrigues e Renato Oliveira, por acreditarem em mim e pelo apoio incondicional ao longo dos últimos dois anos.

Agradeço a minha orientadora, Dra. Cristiane Farinas, pela oportunidade, apoio, ensinamentos e pelas palavras tranquilizadoras nos momentos certos.

Agradeço em especial ao Dr. Rodrigo Klaic por todas as horas disponibilizadas para me ajudar, desde reuniões para planejamento até a companhia em experimentos nos fins de semana. Você foi essencial para a realização de todas as etapas deste projeto. A você, minha eterna gratidão.

Agradeço ao Dr. Ricardo Bortoletto pelo auxílio na etapa referente a dissolução das rochas e modelagem matemática, bem como por toda paciência para sanar minhas dúvidas.

Agradeço aos meus companheiros do Laboratório de Agroenergia por toda a diversão e apoio dado nos momentos difíceis. Não citarei nomes para evitar ser injusta ao esquecer alguém, mas quem me acompanhava no dia-a-dia sabe do meu carinho e gratidão por cada etapa vivida. Esse último ano foi mais leve graças a companhia de vocês.

Agradeço à Vinicius Majaron e Marcela Pfeifer, os alunos de iniciação científica mais legais e competentes que conheço, pela realização de milhares das minhas análises e pelas diversas horas de conversas durante as medidas.

Agradeço à UFSCar, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e a Embrapa Instrumentação pela estrutura e suporte disponibilizado.

Agradeço ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de incentivo à pesquisa disponibilizada.

Agradeço também a todos os colegas e amigos por todo o incentivo, apoio e torcida ao longo desses dois últimos anos.

Por fim, a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, com esse trabalho e que por um momento de lapso não mencionei: Muito obrigada!

*“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido.  
Agora é hora de compreender mais para temer menos.”*

**Marie Curie**

## RESUMO

O Potássio (K) desempenha um papel importante em diversos processos bioquímicos e fisiológicos nas plantas, porém as baixas concentrações de K solúvel no solo tornam necessário o uso de fertilizantes químicos a fim de suprir as necessidades nutricionais das plantas. No entanto, a produção de fertilizantes de K a partir do processamento químico de rochas potássicas (RKs) é considerada dispendiosa e pode causar danos ao meio ambiente. Em contrapartida, a solubilização biológica de RKs tem se mostrado uma estratégia em potencial para obtenção de biofertilizantes, visando uma agricultura mais sustentável. Nessa estratégia microrganismos são utilizados para promover a solubilização da RK, quando aplicado ao solo ou a partir de cultivo microbiano *in vitro*, sendo a produção de ácidos orgânicos no meio o principal mecanismo de solubilização deste processo. Nesse âmbito, este trabalho teve como objetivo estudar os mecanismos de dissolução de rochas potássicas via ácidos orgânicos e o desenvolvimento de estratégias para aumentar a solubilidade do K presente na RK a partir de solubilização biológica por cultivo submerso. Este estudo foi realizado utilizando duas RKs modelo, rocha 1 (Yorkshire, Reino Unido) e rocha 2 (Minas Gerais, Brasil). As rochas foram previamente caracterizadas por Difração de Raios-X, Fluorescência de Raios-X, Microscopia Eletrônica de Varredura e sua Área Superficial e Tamanho de Partículas médio foram determinados. Posteriormente, as RKs foram submetidas a ensaios de dissolução por 40 dias em água e diferentes ácidos orgânicos (cítrico, glucônico e oxálico) para avaliar o efeito destes na dissolução das rochas. Por fim, foram avaliadas estratégias para a promoção do aumento da solubilidade de K através da solubilização biológica da RK a partir da ação de microrganismos produtores de ácidos orgânicos via cultivo submerso. Nesse contexto, foi avaliado o potencial de solubilização de diferentes cepas do fungo filamentoso *Aspergillus* (*A. niger* C, *A. niger* F12, *A. niger* 3T5B8 e *Aspergillus* 763), o efeito da concentração (1%, 2,5%, 5% e 10%) de duas fontes de carbono (glicose e glicerol) no cultivo, o efeito do pH<sub>inicial</sub> do meio de cultivo e o efeito da interação entre microrganismo-rocha para uma melhor compreensão da dinâmica da solubilização. Por fim, foi realizada um estudo da cinética de solubilização com RK natural e com a RK após um pré-tratamento de ativação mecânica (moagem), durante 10 dias. A partir dos resultados obtidos, as fases Polihalita (rocha 1) e K-Feldspato (rocha 2) foram identificadas na etapa de caracterização apresentando uma ordem de dissolução do K nos ácidos orgânicos de KCl (controle) > RK<sub>Polihalita</sub> > RK<sub>Feldspato</sub>. Os ácidos orgânicos não influenciaram significativamente na dissolução do K presente na RK<sub>Polihalita</sub>, em contrapartida influenciaram na liberação do K da RK<sub>Feldspato</sub>, bem como na liberação dos demais nutrientes de ambas as rochas. A RK<sub>Polihalita</sub> alcançou 100% de dissolução do K em todos os ácidos avaliados enquanto a RK<sub>Feldspato</sub> apresentou o maior percentual de dissolução em ácido oxálico (20,05%) após 25 dias. Dada a menor dissolução de K apresentada, a RK<sub>Feldspato</sub> foi utilizada na etapa de solubilização biológica por *A. niger* C em que as variáveis 5% de glicose, pH<sub>inicial</sub> 4 e cultivo sem a etapa de pré-cultivo foram as condições de cultivo selecionadas. Além disso, a interação física entre microrganismo-rocha foi capaz de aumentar cerca de 33% do K solubilizado no meio em comparação aos ensaios sem a presença do fungo. A cinética de solubilização da RK<sub>Feldspato</sub> natural alcançou um máximo de solubilização de 15,87% de K após 3 dias. O pré-tratamento da RK<sub>Feldspato</sub> proporcionou um aumento de 35% na solubilidade do K, se comparado com a RK natural, alcançando já no primeiro dia uma solubilização de 20,66% de K. Esses resultados evidenciam o efeito potencializador da solubilização biológica na liberação do K insolúvel presente na RK<sub>Feldspato</sub>.

**Palavras-chaves:** *Aspergillus niger*, Feldspato, dissolução mineral, mecanismos de solubilização.

## ABSTRACT

Potassium (K) plays an important role in several biochemical and physiological processes in plants, but the low concentrations of soluble K in the soil make it necessary to use chemical fertilizers in order to supply the nutritional needs of the plants. However, the production of K fertilizers from the chemical processing of potassic rocks (RK's) is considered expensive and can cause damage to the environment. In contrast, the biological solubilization of RKs has been shown to be a potential strategy for obtaining biofertilizers, aiming at more sustainable agriculture. In this strategy, microorganisms are used to promote the solubilization of RK, when applied to the soil or from microbial cultivation *in vitro*, with the production of organic acids in the medium being the main mechanism of solubilization of this process. In this context, this work aimed to study the mechanisms of dissolution of potassium rocks via organic acids and the development of strategies to increase the solubility of K present in RK from biological solubilization by submerged cultivation. This study was carried out using two model RK's, rock 1 (Yorkshire, United Kingdom) and rock 2 (Minas Gerais, Brazil). The rocks were previously characterized by X-Ray Diffraction, X-Ray Fluorescence, Scanning Electron Microscopy and their Surface Area and Average Particle Size were determined. Subsequently, the RK's were subjected to dissolution tests for 40 days in water and different organic acids (citric, gluconic and oxalic) to evaluate their effect on the dissolution of rocks. Finally, strategies for promoting the increase in K solubility through biological solubilization of RK from the action of microorganisms producing organic acids via submerged culture were evaluated. In this context, the solubilization potential of different strains of the filamentous fungus *Aspergillus* (*A. niger* C, *A. niger* F12, *A. niger* 3T5B8 and *Aspergillus* 763), the effect of concentration (1%, 2.5%, 5% and 10%) of two carbon sources (glucose and glycerol) in the culture, the effect of the initial pH of the culture medium, and the effect of the interaction between microorganism-rock for a better understanding of the dynamics of solubilization. Finally, a study of the solubilization kinetics with natural RK and with RK was performed after a pretreatment of mechanical activation (grinding), for 10 days. From the results obtained in this work, the phases Polyhalite (rock 1) and K-Feldspar (rock 2) were identified in the characterization step presenting an order of dissolution of K in the organic acids of  $KCl$  (control) >  $RK_{Polyhalite}$  >  $RK_{Feldspar}$ . Organic acids did not significantly influence the dissolution of K present in  $RK_{Polyhalite}$ , on the other hand they influenced the release of K from  $RK_{Feldspar}$ , as well as the release of other nutrients from both rocks.  $RK_{Polyhalite}$  reached 100% dissolution of K in all evaluated acids while  $RK_{Feldspar}$  presented the highest percentage of dissolution in oxalic acid (20.05%) after 25 days. Given the lower dissolution of K presented,  $RK_{Feldspar}$  was used in the biological solubilization step by *A. niger* C in which the variables 5% glucose,  $pH_{initial}$  4 and cultivation without the preculture stage were the conditions selected. The physical interaction between microorganism-rock was able to increase about 33% of the K solubilized in the medium compared to tests without the presence of the fungus. The solubilization kinetics of natural  $RK_{Feldspar}$  reached a maximum solubilization of 15.87% K after 3 days, while the kinetics with  $RK_{Feldspar}$  after pretreatment provided a 35% increase in K solubility, if compared with natural RK, reaching a solubilization of 20.66% of K on the first day. These results show the potentiating effect of biological solubilization on the release of insoluble K present in RK Feldspar.

**Keywords:** *Aspergillus niger*, Feldspar, mineral dissolution, solubilization mechanisms.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Esquema da produção de fertilizante potássico tradicional por rochas de origem sedimentar.....	19
<b>Figura 2</b> - Esquema da produção de fertilizante por rochas de origem ígnea .....	20
<b>Figura 3</b> - Sistema de liberação em meio aquoso utilizando um béquer como meio protetor dos materiais estudados.....	29
<b>Figura 4</b> - Padrões de DRX da A) RK <sub>Polihalita</sub> e B) RK <sub>Feldspato</sub> , incluindo as informações de pico extraídas e as fases minerais identificadas exibidas como padrões de aderência abaixo .....	36
<b>Figura 5</b> - Micrografias por microscopia eletrônica de alta resolução (MEV-FEG). A) RK <sub>Polihalita</sub> B) RK <sub>Feldspato</sub> .....	39
<b>Figura 6</b> - Dissolução de KCl em água e em diferentes ácidos orgânicos. A) Água B) Ácido Glucônico C) Ácido Oxálico D) Ácido Cítrico .....	40
<b>Figura 7</b> - Dissolução da RK <sub>Polihalita</sub> em água e em diferentes ácidos orgânicos. A) Água B) Ácido Glucônico C) Ácido Oxálico D) Ácido Cítrico .....	41
<b>Figura 8</b> - Dissolução RK <sub>Feldspato</sub> em água e em diferentes ácidos. A) Água B) Ácido Glucônico C) Ácido Oxálico D) Ácido Cítrico E) Ácido Clorídrico (0,1 M) e F) Ácido Clorídrico (1 M) .....	44
<b>Figura 9</b> - DRX, comparação entre a rocha natural e após a dissolução A) RK <sub>Polihalita</sub> natural, B) RK <sub>Polihalita</sub> em água C) RK <sub>Polihalita</sub> em ácido glucônico, D) RK <sub>Polihalita</sub> ácido oxálico, E) RK <sub>Polihalita</sub> em ácido cítrico, F) RK <sub>Feldspato</sub> natural, G) RK <sub>Feldspato</sub> em água H) RK <sub>Feldspato</sub> em ácido glucônico, I) RK <sub>Feldspato</sub> em ácido oxálico, J) RK <sub>Feldspato</sub> em ácido cítrico, K) RK <sub>Feldspato</sub> em ácido clorídrico (0,104 M) e L) RK <sub>Feldspato</sub> em ácido clorídrico (1 M).....	49
<b>Figura 10</b> - EDX, comparação entre a rocha natural e após a dissolução A) RK <sub>Polihalita</sub> natural, B) RK <sub>Polihalita</sub> em água C) RK <sub>Polihalita</sub> em ácido glucônico, D) RK <sub>Polihalita</sub> ácido oxálico, E) RK <sub>Polihalita</sub> em ácido cítrico, F) RK <sub>Feldspato</sub> natural, G) RK <sub>Feldspato</sub> em água, H) RK <sub>Feldspato</sub> em ácido glucônico, I) RK <sub>Feldspato</sub> em ácido oxálico, J) RK <sub>Feldspato</sub> em ácido cítrico, K) RK <sub>Feldspato</sub> em ácido clorídrico (0,1 M) e L) RK <sub>Feldspato</sub> em ácido clorídrico (1 M).....	50
<b>Figura 11</b> - Solubilização biológica a partir de diferentes microrganismos em cultivo submerso, com e sem a etapa de pré-cultivo em meio Aleksandrov, 1% de glicose como fonte de carbono, 2% de RK <sub>Feldspato</sub> (m/v), pH 7,0, em 96 h, 30°C e 220 rpm. A) Percentual de K solubilizado por diferentes microrganismos; B) pH <sub>inicial</sub> e acidez total final nos cultivos de diferentes microrganismos. ....	52

<b>Figura 12</b> - Percentual de K solubilizado a partir de diferentes fontes de carbono, glicose e glicerol, por cultivo submerso em meio Aleksandrov, com e sem a etapa de pré-cultivo, 2% de $RK_{Feldspato}$ , $pH_{inicial}$ 7,0, 96 h, 30°C e 220 rpm.....	54
<b>Figura 13</b> - Avaliação do efeito do $pH_{inicial}$ na solubilização da $RK_{Feldspato}$ , com e sem a etapa de pré-cultivo em meio Aleksandrov, 5% de glicose como fonte de carbono, 2% de $RK_{Feldspato}$ (m/v), em 96 h, 30°C e 220 rpm. A) Percentual de K solubilizado; B) pH e acidez total final nos cultivos com diferentes $pH_{inicial}$ .....	57
<b>Figura 14</b> - Avaliação do efeito da interação entre microrganismo-rocha na solubilização de K. A) Percentual de K solubilizado a partir de diferentes tratamentos, por cultivo submerso em meio Aleksandrov e 5% de glicose, 2% $RK_{Feldspato}$ , $pH_{inicial}$ 7,0, 96 h, 30°C e 220 rpm; B) pH e acidez total final dos diferentes tratamentos avaliados .....	58
<b>Figura 15</b> - Micrografias por microscópio eletrônico de varredura (MEV) da $RK_{Feldspato}$ após diferentes tratamentos. A-B) $RK_{Feldspato}$ após tratamento “Extrato líquido + RK” (com pré-cultivo); C-D) $RK_{Feldspato}$ após tratamento “Extrato líquido + RK” (sem pré-cultivo); E-F) $RK_{Feldspato}$ após tratamento “Fungo + RK + Meio” (com pré-cultivo); G-H) $RK_{Feldspato}$ após tratamento “Fungo + RK + meio” (sem pré-cultivo).....	60
<b>Figura 16</b> - Cinética de solubilização da $RK_{Feldspato}$ em meio Aleksandrov, 5% de glicose como fonte de carbono, 2% de $RK_{Feldspato}$ (m/v), $pH_{inicial}$ 4, 30°C e 220 rpm. A) Percentual do K solubilizado e perfil da produtividade; B) Perfil de biomassa produzida e glicose residual; C) $pH_{final}$ e acidez total final .....	62
<b>Figura 17</b> - Percentual de K solubilizado na cinética de solubilização da $RK_{Feldspato}$ moída, 5% de glicose como fonte de carbono, 2% de $RK_{Feldspato}$ (m/v), $pH_{inicial}$ 4, 30°C e 220 rpm.....	64
<b>Figura 18</b> - Padrões de DRX da $RK_{Feldspato}$ natural e $RK_{Feldspato}$ após o pré-tratamento .....	65

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Minerais potássicos de origem sedimentar e seus teores equivalentes em peso (%) .....	17
<b>Tabela 2</b> - Minerais potássicos de origem ígnea e seus teores equivalentes em peso (%) .....	18
<b>Tabela 3</b> - Análise química por fluorescência de raios-X das rochas de potássio, juntamente com as áreas de superfície e tamanhos de partículas correspondentes.....	38
<b>Tabela 4</b> - Constante de taxa de dissolução dos nutrientes constituintes do KCl, $RK_{\text{Polihalita}}$ e $RK_{\text{Feldspato}}$ em água, ácido glucônico, oxálico e cítrico.....	46
<b>Tabela 5</b> - Efeito das fontes de carbono na solubilização biológica da rocha potássica em termos de $\text{pH}_{\text{final}}$ e acidez total.....	55

## SUMÁRIO

RESUMO .....	5
ABSTRACT .....	6
LISTA DE FIGURAS .....	7
LISTA DE TABELAS .....	9
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	15
2.1 O Potássio e sua importância para as plantas .....	15
2.2 Reservas e tipos de rochas potássicas .....	16
2.3 Fertilizantes químicos potássicos e seus impactos ambientais .....	18
2.4 Microrganismos solubilizadores de potássio e mecanismos de solubilização.....	21
2.5 Estado da Arte: Solubilização biológica de rochas potássicas.....	22
2.6 Objetivos.....	26
2.6.1 Objetivos gerais.....	26
2.6.2 Objetivos específicos.....	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 Fontes de potássio .....	26
3.2 Caracterizações físico-químicas.....	27
3.2.1 Difração de Raios-X (DRX).....	27
3.2.2 Fluorescência de Raios-X (FRX) .....	27
3.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	27
3.2.4 Determinação da área superficial .....	27
3.2.5 Determinação do tamanho de partícula.....	27
3.2.6 Espectroscopia por Raios-X por Dispersão de Energia (EDS) .....	28
3.3 Ensaio de dissolução da rocha potássica em água e diferentes ácidos.....	28
3.3.1 Determinação dos parâmetros cinéticos da liberação de K.....	29
3.4 Solubilização biológica de rocha potássica .....	30
3.4.1 Microrganismos.....	31
3.4.2 Cultivo submerso (CSm).....	31
3.4.3 Avaliação de diferentes concentrações e tipo de fontes de carbono no CSm .....	31
3.4.4 Avaliação do efeito de diferentes pH <sub>inicial</sub> de cultivo na solubilização de K.....	32
3.4.5 Avaliação do efeito da interação microrganismo-rocha na solubilização de K .....	32
3.4.6 Cinética de solubilização de rocha potássica .....	33
3.4.7 Pré –tratamento da rocha potássica e cinética de solubilização .....	33

3.5 Determinação dos elementos presentes nas rochas potássicas .....	33
3.6 Determinação do pH e acidez total no cultivo .....	34
3.7 Determinação da glicose residual .....	34
3.8 Determinação da biomassa microbiana produzida .....	35
3.9 Análise estatística .....	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
4.1 Caracterizações físicas e químicas das rochas potássicas.....	35
4.2 Estudo da dissolução das rochas potássicas em diferentes meios.....	39
4.2.1 Efeito dos ácidos orgânicos na dissolução das rochas potássicas .....	39
4.2.2 Caracterização do material residual .....	46
4.3 Solubilização biológica da rocha potássica .....	50
4.3.1 Seleção do microrganismo solubilizador de rocha potássica .....	51
4.3.2 Avaliação da concentração e do tipo de fontes de carbono na solubilização biológica de K .....	53
4.3.3 Avaliação do efeito do pH <sub>inicial</sub> de cultivo na solubilização biológica de K.....	56
4.3.4 Avaliação do efeito da interação do microrganismo-rocha na solubilização de K ..	58
4.3.5 Cinética de Solubilização da $RK_{\text{Feldspato}}$ .....	61
4.3.6 Efeito do pré –tratamento da rocha potássica na cinética de solubilização biológica .....	63
5 CONCLUSÕES .....	66
6 PERSPECTIVAS FUTURAS .....	67
REFERÊNCIAS .....	68

## 1 INTRODUÇÃO

O potássio (K) é um macroelemento essencial para todos os organismos vivos. É o sétimo elemento mais comum na crosta terrestre e o terceiro macromutriente mais importante para a nutrição vegetal, depois do nitrogênio e do fósforo. Esse elemento desempenha papel significativo na ativação de vários processos metabólicos, como a fotossíntese e a síntese de enzimas e proteínas (Shanware, Kalkar e Trivedi, 2014a; Meena et al., 2016b). No solo, está presente como cátion em soluções, na superfície de matéria orgânica e incorporado na rede cristalina de minerais. No entanto, embora seja considerado um elemento abundante no solo, as concentrações de K solúvel, ou seja, prontamente disponível para absorção pelas plantas, são geralmente muito baixas, pois cerca de 90 - 98% do K está presente em sua forma insolúvel (Cara et al., 2012; Jaiswal et al., 2016).

As baixas concentrações de K solúvel no solo tornam necessário o uso de fertilizantes químicos solúveis a fim de suprir as necessidades nutricionais das plantas. No ano de 2017 foram consumidos em torno de 110 Mton de  $K_2O$  como fertilizante (Food And Agriculture Organization Of The United Nations – FAO, 2018), sendo o terceiro macronutriente mais utilizado na agricultura e evidenciando a importância desse nutriente para aumentar a produtividade de alimentos. Contudo, o uso excessivo destes fertilizantes acarretam problemas ambientais, como a poluição de corpos d'água devido à percloração e lixiviação do potássio no solo (Savci, 2012). Essa problemática impulsionou a busca por estratégias eficientes para a solubilização do K insolúvel presente nos solos a partir do uso de microrganismos promotores de solubilização (Mohamed et al., 2016). Estudos também tem sido desenvolvidos para avaliar a solubilização biológica *in vitro* de rochas potássicas (RKs) utilizando métodos de cultivo microbiano (Kasana et al., 2017; Lian et al., 2008; Lopes-Assad et al., 2006; Prajapati et al., 2012a; Song et al., 2015a; Xue et al., 2018), como uma alternativa ao processamento químico para produção de fertilizantes potássicos para plantas. Esta estratégia torna-se interessante principalmente quando se utiliza RKs silicatadas, de origem ígnea do tipo Feldspato, que são os minerais mais abundantes da crosta terrestre e apresentam teores significativos de K em sua estrutura, além de apresentarem baixo custo. Entretanto, a maioria das RKs de origem ígnea contém o K inserido em sua estrutura cristalina, o que dificulta a recuperação do mineral (Cara et al., 2012; Nascimento and Loureiro, 2004).

Neste sentido, diversos microrganismos tem sido descritos na literatura por seu potencial de solubilização de rochas potássicas, sendo o principal mecanismo a produção de diferentes ácidos orgânicos, como o ácido cítrico, oxálico e glucônico. Estes promovem a diminuição local do pH no meio e induzem a liberação do íon  $K^+$ . Os ácidos orgânicos também podem formar quelatos a partir de seus grupos hidroxila e carboxila com metais ligados à constituição química da rocha e assim promover a liberação do  $K^+$  (Bahadur et al., 2014; Sattar et al., 2019). Entretanto, o efeito individual dos ácidos orgânicos na solubilização de RKs ainda é pouco estudado. Os ácidos orgânicos apresentam características químicas diferentes quanto ao número de grupos hidroxila e carboxila, tamanho da cadeia, e constante de acidez ( $k_a$ ), logo podem apresentar diferentes efeitos na solubilização de RKs. O correto entendimento do efeito dos ácidos orgânicos na cinética de solubilização do K e de outros componentes das RKs pode ser base para desenvolver novas estratégias para melhorar os processos de solubilização biológica das RKs.

Entre os principais microrganismos produtores de ácidos orgânicos destacam-se os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus ssp.*, que são considerados uma classe importante na produção desses metabólitos e tem sido evidenciados em alguns trabalhos por sua capacidade de solubilização de RKs via cultivo submerso (CSm) e cultivo em estado sólido (CEs) (Brandão et al., 2014; Lian et al., 2008; Lopes-Assad et al., 2006). O cultivo submerso é utilizado para avaliar o potencial de microrganismos para promover a solubilização de RKs *in vitro*, e oferece vantagens em relação ao cultivo em estado sólido, principalmente em relação à instrumentação e ao controle do processo (Fazenda et al., 2008). Assim, o produto líquido resultante do processo de solubilização das RKs por microrganismos é denominado biofertilizante potássico e é considerado sustentável, relativamente barato, eficaz e produtivo a longo prazo (Bahadur et al., 2016; Kumar et al., 2016; Masood and Bano, 2016; Mohamed et al., 2016). Sua aplicação tem sido avaliada em aplicações no sistema solo-planta (Alves et al., 2010; Wu et al., 2005) e os resultados tem sido promissores com relação ao aumento na absorção de K e crescimento de plantas.

Entretanto, a eficiência de solubilização da RKs de origem ígneas ainda é baixa, sendo necessário estudar novas estratégias e avaliar condições de processo para aumentar as taxas de solubilização das RKs. A seleção do microrganismo adequado, avaliação do tipo e concentração da fonte de carbono utilizado durante o CSm, a interação microrganismo-rocha, assim como o pré-tratamento da RK, são estratégias que podem ser exploradas para um melhor entendimento

do processo de solubilização biológica da RK e para melhorar a eficiência da solubilização. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo estudar os mecanismos de solubilização da rocha potássica via ácidos orgânicos e desenvolver estratégias para aumentar a solubilização biológica do potássio por cultivo submerso a partir de uma rocha de baixa solubilidade.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 O Potássio e sua importância para as plantas**

O potássio (K) é um elemento químico que pertence ao grupo dos metais alcalinos e carrega o estado de oxidação 1+. É o terceiro principal macronutriente essencial, após o nitrogênio (N) e o fósforo (P), e o cátion mais amplamente absorvido pelas plantas. O K é considerado um nutriente fundamental para o metabolismo, crescimento e desenvolvimento das plantas. Sem as quantidades adequadas de K, as plantas apresentam raízes pouco desenvolvidas, folhas e caules quebradiço, produzem sementes pequenas e crescem mais lentamente (Jaiswal et al., 2016; Masood and Bano, 2016).

O K desempenha um papel significativo em diversos processos bioquímicos e fisiológicos nas plantas. É um forte regulador osmótico responsável pelo funcionamento adequado dos estômatos, processo essencial para realização da fotossíntese. Realiza a ativação de mais de 50 enzimas, participa da produção de adenosina trifosfato (ATP) regulando a fotossíntese e os açúcares produzidos por ela e desempenha um papel importante no transporte de água e nutrientes por longas distâncias através do xilema (Pettigrew, 2008; Shanware et al., 2014). Além de também estar envolvido no metabolismo de carboidratos, gorduras, ácidos, compostos nitrogenados e na síntese de proteínas melhorando a tolerância ao frio e a resistência à seca das plantas (Sattar et al., 2018).

No solo, o potássio está presente em quatro formas: dissolvido em solução (íons  $K^+$ ), K trocável, K fixo e K mineral. O íon  $K^+$  é considerado uma fonte de rápida absorção para as plantas porém, seus níveis são geralmente baixos no solo. O K trocável está ligado externamente a superfícies de minerais argilosos e é facilmente trocado por outros cátions estando assim, prontamente disponível para as plantas. Já o K fixo está disponível apenas moderadamente devido sua forte ligação com as superfícies argilosas. Estas três formas somam cerca de 2 – 8% do potássio disponível no solo, os outros 90 – 98% do K estão incorporados a estrutura cristalina de minerais como o feldspato e mica, estando assim indisponível para as plantas (Curi et al.,



2005; Shanware et al., 2014). Portanto, as baixas concentrações de potássio solúvel no solo tornam necessário o uso de fertilizantes potássicos a fim de suprir as necessidades nutricionais das plantas, obter bons rendimentos e melhorar a produtividade agrícola.

## **2.2 Reservas e tipos de rochas potássicas**

O potássio está presente em inúmeros minerais do solo de origem sedimentar e ígnea, sendo rochas potássicas a principal matéria-prima utilizada na produção de fertilizantes potássicos. Estima-se que as reservas mundiais de RKs totalizam cerca de 250 bilhões de toneladas, sendo que o Canadá, a Rússia, a Bielorrússia e a China detém aproximadamente cerca de 76% da produção mundial de fertilizantes. Atualmente, o Brasil ocupa a 12<sup>a</sup> posição mundial entre os países produtores de fertilizantes potássicos (U. S. Geological Survey, 2019), sendo as principais reservas brasileiras de RKs de origem sedimentar localizadas nos estados de Sergipe e Amazonas. No entanto, a produção de fertilizante potássico nacional está restrita apenas ao complexo mina/usina Taquari-Vassouras no estado de Sergipe (Brasil, 2018). Já as reservas de RKs de origem ígneas brasileiras estão concentradas na região de Poços de Caldas – Minas Gerais (Kotani et al., 2019)

As RKs de origem sedimentar, formadas a partir da evaporação de sedimentos marinhos, são os minerais explorados como matéria-prima na produção de fertilizantes K devido sua elevada solubilidade em água. Essa classe é constituída por sulfatos e/ou cloretos de potássio (Tabela 1) e apresentam teores significativos de K<sub>2</sub>O em sua constituição, variando entre 10 – 63%. Dentre os minerais desta classe apenas a Silvita e a Carnalita são largamente utilizadas como fontes tradicionais para a produção de fertilizantes. A Polihalita, Langbeinita e Kainita, também estão entre as fontes em que o K é recuperado com relativa facilidade, entretanto, não constituem fontes abundantes no hemisfério sul do globo terrestre (Nascimento and Loureiro, 2004).

**Tabela 1** - Minerais potássicos de origem sedimentar e seus teores equivalentes em peso (%)

Minerais	Estrutura Química	Teores Equivalentes (%)			
		K	KCl	K <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Silvita*	KCl	52,44	100	63,13	-
Carnalita*	KCl.MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	14,07	26,83	16,95	-
Silvinita*	KCl + NaCl	-	-	10 – 35	-
Kainita**	4KCl.4MgSO <sub>4</sub> .11H <sub>2</sub> O	15,71	29,94	19,26	-
Langbeinita**	KMg <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	18,84	-	22,69	41,99
Polihalita**	K <sub>2</sub> MgCa <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	12,97	-	15,62	28,90

\*Minerais primários \*\* Minerais secundários

Fonte: adaptado a partir de Nascimento e Loureiro (2004).

Em contrapartida, cerca de 95% do K existente na crosta terrestre é encontrado em RKs de origem ígneas, formadas a partir da cristalização do magma proveniente de erupções vulcânicas. Este tipo de mineral, denominado mineral silicatado, é formado por grupos tetraédricos de sílica e oxigênio fortemente unidos entre si por cátions e possui o K inserido em sua estrutura cristalina, o que dificulta sua extração (Cara et al., 2012). Neste caso, a recuperação do K da estrutura do mineral é possível apenas através da combinação de forte ataque químico e tratamento térmico o que minimiza o interesse em seu uso para produção tradicional de fertilizantes, uma vez que os minerais de origem sedimentar apresentam maior facilidade de extração do K presente em sua estrutura (Nascimento and Loureiro, 2004).

Os principais minerais silicatados ricos em K (Tabela 2) são os Feldspatos, os Feldspatóides e as Micas, com teores de K<sub>2</sub>O que variam entre 10 e 21,5%. Os Feldspatos potássicos constituem cerca de 60% da crosta terrestre e possuem oxigênio, sílica e alumínio em sua estrutura ligados na forma de tetraedros. Neste mineral, as moléculas de oxigênio de cada vértice dos tetraedros são compartilhadas com tetraedros vizinhos, resultando em uma estrutura altamente estável. Os Feldspatos são classificados como Ortoclásio, Microlínio e Sanidina. Os Feldspatóides possuem uma estrutura química semelhante aos Feldspatos, porém com apenas dois terços de sílica em sua estrutura. Os principais minerais desse grupo são a Leucita e a Nefelina. Por fim, as Micas são classificadas em Moscovita, Flogopita, Biotita e Lepidolita (Grecco, 2018; Vlach, 2002).

**Tabela 2** - Minerais potássicos de origem ígnea e seus teores equivalentes em peso (%)

Minerais	Estrutura Química	K <sub>2</sub> O (%)
Ortoclásio*	KAlSi <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	16,9
Microlíneo*	KAlSi <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	16,9
Sanidina*	KSiAl <sub>4</sub> O <sub>8</sub>	12,88
Leucita**	KAlSi <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	21,5
Nefelina**	KAlSiO <sub>4</sub>	8,06
Moscovita***	(KAl <sub>2</sub> (AlSi <sub>3</sub> O <sub>10</sub> )(OH) <sub>2</sub> )	11,81
Flogopita***	(KMg <sub>3</sub> (AlSi <sub>3</sub> O <sub>10</sub> )(OH) <sub>2</sub> )	11,23
Biotita***	K(Mg,Fe) <sub>3</sub> (AlSi <sub>3</sub> O <sub>10</sub> )(OH) <sub>2</sub>	10,86

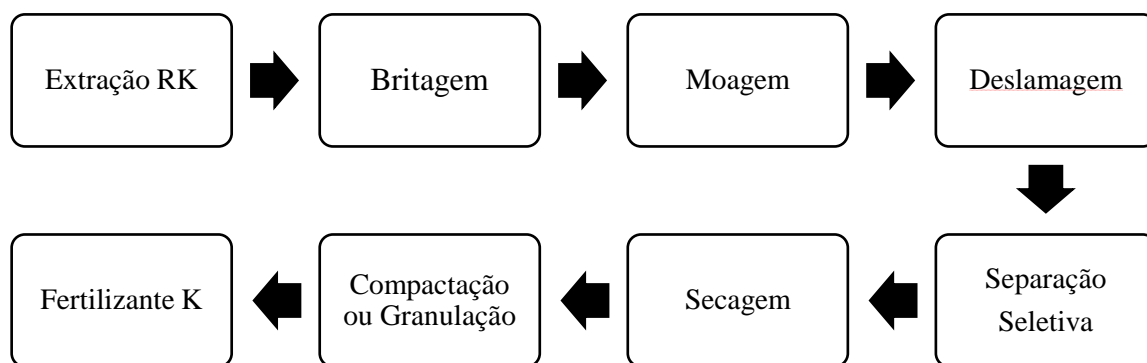
\*Feldspatos \*\* Feldspatóides \*\*\*Micas  
**Fonte:** adaptado a partir de (Grecco, 2018).

De forma geral, os minerais silicatados estão presentes de forma abundante no território brasileiro, o que intensifica seu potencial de utilização na agricultura. No entanto, sua vasta aplicação como fertilizantes ainda depende de alguns fatores como: estudos mais aprofundados sobre os mecanismos e a cinética de dissolução/solubilização dessas RKs no solo, bem como o entendimento de como a composição e as fases cristalinas dessas RKs são alteradas ao longo da sua dissolução/solubilização, qual o efeito da química do solo na dissolução/solubilização dessas RKs a médio e longo prazo e um melhor entendimento sobre a composição mineralógica destas rochas (Nascimento and Loureiro, 2004).

### 2.3 Fertilizantes químicos potássicos e seus impactos ambientais

A produção tradicional de fertilizantes potássicos ocorre através da extração e beneficiamento de RK de origem sedimentar até a obtenção de um produto com alta concentração de K e solúvel em água. Neste caso, a produção do fertilizante não requer a utilização de processos térmicos ou com ácidos fortes, diferentemente dos fertilizantes fosfáticos. A Figura 1 apresenta os principais processos de beneficiamento de RKs de origem sedimentar para produção de fertilizantes potássicos, sendo o Cloreto de Potássio (KCl), Sulfato de Potássio (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e Nitrato de Potássio (KNO<sub>3</sub>) os principais fertilizantes obtidos por esse processo (Dias e Fernandes, 2006; Silva et al., 2004).

**Figura 1** - Esquema da produção de fertilizante potássico tradicional por rochas de origem sedimentar

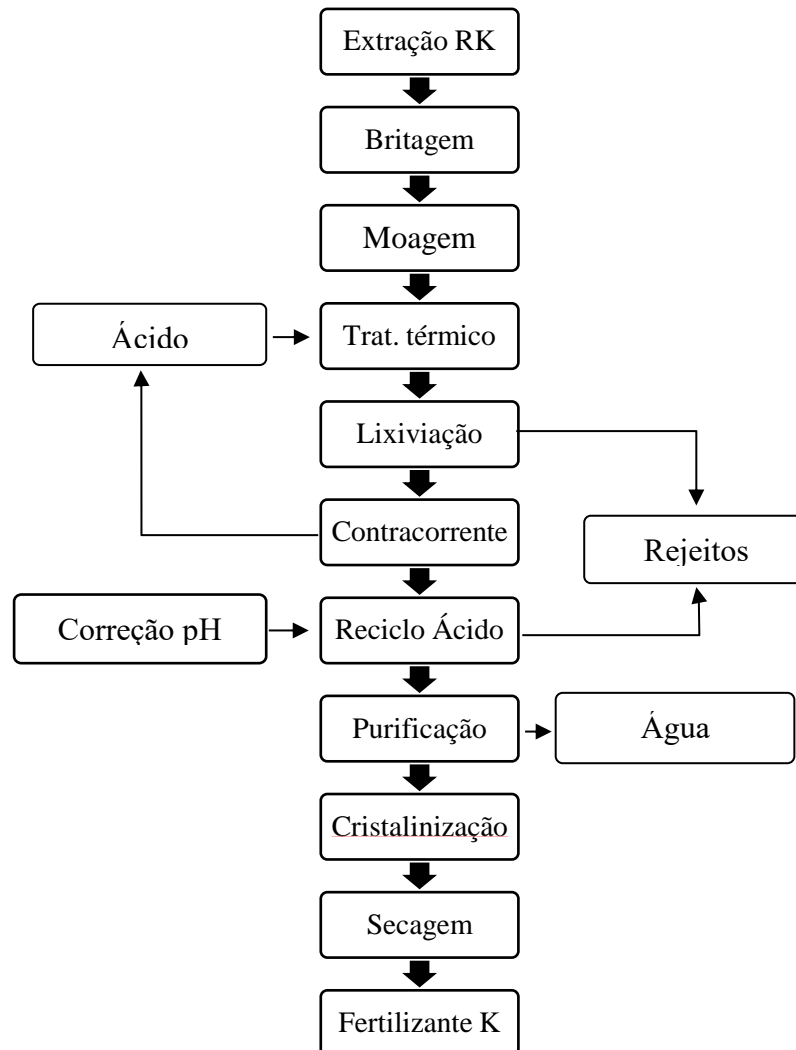


Fonte: elaboração própria.

O Brasil, por sua vez, não se caracteriza como um grande produtor de fertilizantes potássicos devido sua pequena produção interna comparada à demanda nacional, isto se deve às baixas reservas de RKs de origem sedimentar presentes em território brasileiro (Nascimento and Loureiro, 2009). De acordo com a Food Agriculture Organization of The United Nations – FAO, em 2017 o Brasil importou cerca de 6 milhões de toneladas de K, o equivalente a 95% de todo o  $K_2O$  utilizado na agricultura brasileira no mesmo ano, o que evidencia a alta dependência brasileira em relação ao uso deste nutriente. Neste sentido, a elevada demanda de potássio na agricultura, bem como a limitada oferta de fontes K solúveis, tem sido uma constante preocupação em países com uma atividade agrícola intensa, como no Brasil, onde os solos são considerados pobres em minerais nutrientes e possuem baixa capacidade de retenção de cátions favorecendo a lixiviação do K. Por esse motivo, apesar da baixa solubilidade, as rochas silicatadas de origem ígnea, tem sido consideradas como fontes alternativas de K na agricultura (Curi et al., 2005).

As RKs silicatadas de origem ígnea podem ter sua solubilidade aumentada após passarem por um processamento químico, como demonstrado na Figura 2. O produto final é um sal de potássio solúvel ( $K_2SO_4$ ) que pode ser aplicado na agricultura para suplementar K para as plantas. No entanto, o processo de produção de fertilizantes K através deste tipo de mineral a partir do processo descrito (Figura 2) não é considerado econômico e ambientalmente sustentável, uma vez que ocorre a partir da junção de forte ataque químico, utilizando principalmente ácido sulfúrico concentrado, e tratamento térmico que gera alto custo energético, logo é pouco utilizado na produção de fertilizantes K.

**Figura 2** - Esquema da produção de fertilizante por rochas de origem ígnea



**Fonte:** adaptado a partir de Pereira et al. (2018).

As produções agrícolas se sustentam com o uso dos fertilizantes químicos que tem como principal objetivo melhorar a eficiência dos solos. Nas últimas décadas, o uso de grandes quantidades destes fertilizantes tem sido necessário para suprir a demanda por alimento diretamente relacionadas ao aumento da população mundial. Entretanto, estudos mostram que o uso excessivo de fertilizantes químicos ocasiona sérios problemas ambientais e de saúde pública, visto que os efeitos causados no solo por eles não são imediatos. Deste modo, altos níveis de fertilizantes K causam um impacto negativo no pH e na estrutura do solo a longo prazo afetando sua capacidade de retenção de água, a atividade microbiana existente e a absorção de outros nutrientes. O K acumulado no solo advindo destas fertilizações é facilmente lixiviado chegando aos corpos d'água através das chuvas e afetando os seres vivos existentes no meio através da eutrofização (Bahadur et al., 2014; Isherwood, 2000; Savci, 2012). Essa

problemática impulsionou a busca por estratégias eficientes para a solubilização do K insolúvel presente nos solos a partir do uso de microrganismos promotores de solubilização.

Uma estratégia que vem sendo avaliada como uma alternativa ao clássico processo dos fertilizantes químicos tradicionais é a solubilização de RKs por rotas biotecnológica (Bahadur et al., 2016; Meena et al., 2016; Sattar et al., 2019). Essa estratégia, denominada solubilização *in vitro* da RKs, consiste na aplicação de microrganismo para promover a solubilização da RK, via cultivo submerso ou cultivo em estado sólido. Neste processo, o microrganismo atua como um agente solubilizador capaz de transformar o K insolúvel presente na RK em K solúvel através, principalmente, da acidificação do meio provocada pela produção de ácidos orgânicos. O produto líquido resultante desse processo vem sendo denominado biofertilizante potássico (Mohamed et al., 2016), sendo considerado sustentável, relativamente barato, eficaz e produtivo a longo prazo (Bahadur et al., 2016; Kumar et al., 2016; Masood and Bano, 2016; Mohamed et al., 2016).

#### **2.4 Microrganismos solubilizadores de potássio e mecanismos de solubilização**

O solo abriga diversos microrganismos que são capazes de solubilizar o K insolúvel em formas facilmente absorvidas pelas plantas (Meena et al., 2014), sendo que a solubilização de RK por microrganismos foi evidenciada pela primeira vez por Muentz (1890). Atualmente, alguns estudos vem sendo realizados a fim de se isolar e identificar potenciais microrganismos solubilizadores de K do solo (Matthew and Tallapragada, 2017; Prajapati et al., 2012b; Zhang and Kong, 2014). Apesar de diversos microrganismos serem descritos na literatura como solubilizadores de K destacam-se os gêneros de bactérias *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus* e de fungos *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium* como os microrganismos mais eficientes (Sattar et al., 2019).

O principal mecanismo de solubilização por microrganismos solubilizadores de K se dá pela produção de metabólitos de baixa massa molecular, como os ácidos orgânicos, no meio. As moléculas de ácido orgânico influenciam a solubilização de K em um conjunto de três ações distintas, mas ligadas entre si: (i) os ácidos aderem à superfície mineral e extraem nutrientes das partículas minerais por reação de transferência de elétrons; (ii) quebram as ligações de oxigênio e (iii) formam íons quelatados na solução através de seus grupos carboxila e hidroxila. O terceiro mecanismo acelera indiretamente a taxa de dissolução criando um gradiente entre as concentrações de cátion e ânion na solução (Sattar et al., 2019). A produção dos ácidos no meio

depende do tipo de microrganismo, dos nutrientes presentes no meio de cultivo e das características do material a ser solubilizado. Alguns ácidos como o cítrico, oxálico e o glucônico tem sido reportados na literatura como bons agentes quelantes na solubilização de K (Bahadur et al., 2016).

Outros mecanismos de solubilização de K também são descritos na literatura no entanto, o efeito causado por esses mecanismos tem um menor impacto de solubilização se comparado à ação dos ácidos orgânicos. Algumas bactérias e fungos são capazes de secretar enzimas extracelulares e polissacarídeos que participam da degradação mineral liberando o K na solução. A formação de biofilme também é um mecanismo em potencial, porém menos estudado. Neste mecanismo, o material é fixado dentro de uma matriz de polímeros extracelular, produzida pelo microrganismo, intensificando as reações bioquímicas ocorridas na liberação do K. Em ambos os casos, os metabólitos produzidos se aderem à superfície mineral formando um microambiente com altas concentrações de ácidos orgânicos, resultando na dissolução do material por mecanismo semelhante ao explanado para os ácidos orgânicos (Sattar et al., 2019).

Portanto, a escolha do microrganismo solubilizador, assim como a compreensão do mecanismo de solubilização mineral, é importante a fim de se obter um processo eficiente. Neste sentido, dado o principal mecanismo de solubilização das RKs, a literatura descreve os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* sp. como eficientes produtores de diferentes tipos de ácidos orgânicos, sendo considerados potenciais solubilizadores de rochas ricas em minerais fertilizantes do solo (Meena et al., 2016b; Yang, Lübeck e Lübeck, 2017). Assim, na próxima seção serão comentados alguns trabalhos desenvolvidos sobre a solubilização biológica de rocha potássica por fungos.

## **2.5 Estado da Arte: Solubilização biológica de rochas potássicas**

O cultivo submerso (CSm) é um tipo de bioprocessamento que envolve o crescimento de microrganismos em uma suspensão líquida nutritiva. Essa metodologia apresenta diversas vantagens na instrumentação e controle do processo em relação ao cultivo em estado sólido, o que contribui para o aumento de sua eficiência e escalonamento (Fazenda et al., 2008). Diferentes trabalhos reportam a capacidade de solubilização de potássio por CSm, principalmente, a partir dos fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* sp.

Lopes-Assad et al. (2006) investigaram o efeito do fungo filamentososo *Aspergillus niger* (CCT4355) na solubilização das rochas ultramáfica alcalina (33,26% SiO<sub>2</sub>, 8,20% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 3,32% K<sub>2</sub>O) e flogopitito (47,12% SiO<sub>2</sub>, 8,86% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 5,13% K<sub>2</sub>O) em meio de cultivo Crocken e Nyc adaptado, por 21 dias. Os autores ressaltaram que o pH dos ensaios diminuiu drasticamente nos primeiros sete dias de cultivo devido a acidificação provocada pela cepa fúngica. A diminuição do pH influenciou diretamente no aumento da solubilização de ambas as rochas, em especial a ultramáfica alcalina que apresentou uma solubilização 34% maior que a de flogopitito, mesmo esta última possuindo um teor maior de K<sub>2</sub>O em sua composição. Isso se deu devido à composição das rochas, uma vez que a flogopitito tem em sua estrutura uma maior quantidade de silício que a ultramáfica, o que dificulta sua solubilização.

Em trabalhos posteriores, Lopes-Assad et al. (2010) investigaram novamente a solubilização da rocha ultramáfica alcalina (33,26% SiO<sub>2</sub>, 8,20% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 3,32% K<sub>2</sub>O), a partir de duas cepas de *Aspergillus niger* (CCT911 e CCT4355) em meio de cultivo Crocken e Nyc adaptado por 35 dias, em escalas volumétrica do cultivo de até 2 L, bem como diferentes quantidades de rocha e esporos adicionados ao meio. Neste trabalho, os maiores percentuais de solubilização observados (62-70%) ocorreram após os 35 dias, para ambas as cepas, na menor escala avaliada. No entanto, os autores ressaltaram que o grau máximo de solubilização possível pode não ter sido alcançado, sendo necessário avaliar a otimização da transferência de oxigênio para viabilizar o processo em maiores escalas.

O efeito causado pela interação entre o microrganismo-mineral é discutido em alguns trabalhos a fim de investigar se esse mecanismo influencia de forma benéfica a solubilização de K. Lian et al. (2008) utilizaram o *Aspergillus fumigatus* e uma rocha K-feldspato (67,80% SiO<sub>2</sub>, 18,76% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 9,0% K<sub>2</sub>O) para essa investigação, através de cultivo em meio PDA líquido durante 30 dias. Para isso, os autores avaliaram dois diferentes aspectos de interação entre o fungo e o mineral: experimento de contato (mineral e fungo) e experimento de separação (mineral sem contato direto com o fungo). Os resultados obtidos pelos autores demonstraram que, independentemente da configuração experimental, houve o aumento da concentração de K solúvel no cultivo. Contudo, a liberação de K ao longo dos 30 dias nos experimentos de contato físico (2,00 – 8,81%) apresentou-se 3 a 4 vezes maior que nos experimentos de separação (0,49 – 2,71%), o que indica que as forças mecânicas associadas ao contato físico direto entre o fungo e partículas minerais intensificaram a solubilização do K.



Por sua vez, Brandão, Lopes-Assad e Ceccato-Antonini (2014) também avaliaram o efeito do *Aspergillus niger* (CCT4355) na solubilização dos nutrientes das rochas fonolita (54,80% SiO<sub>2</sub>, 21,30% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 8,46% K<sub>2</sub>O) e diabásio (50,31% SiO<sub>2</sub>, 13,94% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0,84% K<sub>2</sub>O) a partir dos tratamentos mineral-meio, mineral-fungo-meio e fungo-meio, em meio de cultivo Crocken e Nyc adaptado, por 30 dias. Os autores obtiveram resultados semelhantes ao discutido anteriormente, uma vez que a solubilização do K no tratamento em que o fungo mantém contato direto com as rochas apresentou melhores resultados, com destaque para a rocha fonolita que apresentou solubilização de K 3 vezes maior que a diabásica.

Simultaneamente a liberação de K, Xue et al. (2018) avaliaram a capacidade de solubilização de Al e Si do fungo *Cenococcum geophilum* Fr nas rochas feldspato (63,71% SiO<sub>2</sub>, 21,51% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 10,79% K<sub>2</sub>O), nefelina (61,02% SiO<sub>2</sub>, 24,31% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 5,17% K<sub>2</sub>O), biotita (48,33% SiO<sub>2</sub>, 15,95% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 5,57% K<sub>2</sub>O), moscovita (49,48% SiO<sub>2</sub>, 34,45% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 8,60% K<sub>2</sub>O) e ilita (69,37% SiO<sub>2</sub>, 19,33% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 4,92% K<sub>2</sub>O), em meio de cultivo Melin-Norkrans durante 21 dias. A ordem de classificação da liberação relativa de K dos minerais foi biotita (6,27%) > ilita (3,87%) > moscovita (1,93%) > feldspato (1,27%) > nefelina (1,12%). Os autores relatam que o microrganismo foi capaz de excretar metabólitos secundários no meio de cultivo que potencializaram a solubilização das rochas, tais como polissacarídeos e diferentes ácidos orgânicos (ácido lático, acético, cítrico, oxálico e succínico). Em contrapartida, a solubilização de Al e Si no meio, para todas as rochas, apresentou-se muito inferior aos valores presentes inicialmente nos minerais, o que indica que o microrganismo não foi capaz de quebrar a estrutura cristalina de forma eficiente.

Outros estudos têm sido realizados a partir do isolamento e identificação de microrganismos solubilizantes de K inorgânico do solo, como o de Prajapati, Sharma e Modi (2012). Os autores isolaram quatro cepas fúngicas do solo de indústrias de cerâmica e selecionaram as cepas *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus* como melhores solubilizadoras das rochas K-feldspato e K-aluminossilicato, em meio nutriente simples (1% de glicose, 0,05% de extrato de levedura, 1% de potássio insolúvel) por 7 dias. O *A. terreus* apresentou maiores valores de solubilização, para ambas as rochas, e os autores atribuem esse resultado a diminuição do pH do meio mais pronunciada associada a este fungo.

Song et al. (2015) isolaram dez microrganismos de amostras do solo e identificaram entre eles quatro melhores solubilizadores (*Penicillium purpurogenum*, *Talaromyces radicus*, *Aspergillus fumigatus* e *Aureobasidium pullulans*, respectivamente) da rocha moscovita

(49,48% SiO<sub>2</sub>, 34,45% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 8,60% K<sub>2</sub>O) para explorar o mecanismo de solubilização de K após 15 dias de incubação em meio Aleksandrov. No processo de solubilização os autores quantificaram a presença de alguns ácidos orgânicos produzidos pelos microrganismos onde, *P. purpurogenum* produziu ácido oxálico, *A. fumigatus* produziu ácido succínico e ácido acético, *A. pullulans* também produziu ácido succínico e *T. radicus* ácido propiônico. Assim, os autores concluíram que o efeito dos ácidos orgânicos na acidificação do meio, juntamente com a interação das hifas do microrganismo sob a moscovita, contribuiu para o desgaste da moscovita e a liberação de K.

Setiawati e Mutmainnah (2016) isolaram 41 microrganismos da área de plantações de cana-de-açúcar dentre os quais 15 microrganismos se destacaram por sua capacidade de solubilização de K. Em seguida, os 15 isolados foram testados quanto a capacidade de solubilização de diferentes fontes de K insolúvel (feldspato, leucita e traquito), em meio Aleksandrov por 15 dias, e a produção de ácidos orgânicos foi quantificada. Os resultados mostraram uma grande variação entre os isolados para solubilização da mesma ou das diferentes fontes de potássio insolúvel. A capacidade dos microrganismos de liberar o K depende muito da natureza dos compostos minerais, do tipo e da concentração da produção de ácido orgânico e das características do microrganismo. Todos os isolados produziram ácido cítrico, ferúlico e cumárico, alguns isolados também produziram ácido málico e siríngico.

Por fim, Kasana et al. (2017) isolaram cinco microrganismos solubilizadores de K do solo e, entre eles, dois isolados de fungos *Fomitopsis meliae*, seguidos por *Aspergillus tubingensis*, apresentaram maior capacidade de dissolução de feldspato em meio de cultivo Aleksandrov. Em uma triagem adicional a cepa *F. meliae* mostrou sua capacidade de crescer e solubilizar K em uma ampla faixa de temperatura (20 a 38 °C) e pH (5,0 a 10,0), onde o índice máximo de solubilização do K foi observado a 28 °C e pH 6,0. Além disso, a cepa mostrou como vantagem adicional a capacidade de solubilização do fósforo.

Neste contexto, é possível observar que os estudos na área de solubilização biológica de RKs por fungos são recentes na literatura, principalmente em relação ao uso de rochas brasileiras. Do ponto de vista tecnológico e científico, a avaliação de rotas biotecnológicas a fim de potencializar a liberação do potássio contido na estrutura das RKs é o passo inicial para obtenção de biofertilizantes, que podem ser utilizados como uma fonte alternativa ao uso dos fertilizantes potássicos tradicionais. Neste sentido, é necessário a intensificação de estudos desta natureza, explorando as características de diferentes microrganismos e de variáveis de

bioprocesso, bem como a utilização de RKs que normalmente não são utilizadas no processo de produção de fertilizantes tradicionais (Cara et al., 2012; Resende et al., 2006).

## **2.6 Objetivos**

### **2.6.1 Objetivos gerais**

Este trabalho teve como objetivo investigar os mecanismos de dissolução da rocha potássica via ácidos orgânicos e desenvolver estratégias para aumentar a solubilização biológica do potássio por cultivo submerso a partir de uma rocha de baixa solubilidade.

### **2.6.2 Objetivos específicos**

Para o atendimento do objetivo geral, foram elencados os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Realizar a caracterização das propriedades físicas e químicas da rocha potássica;
- ✓ Avaliar a dissolução da rocha potássica em diferentes ácidos;
- ✓ Selecionar o microrganismo mais eficiente na solubilização da rocha potássica;
- ✓ Avaliar o efeito de diferentes fontes de carbonos na solubilização da rocha potássica;
- ✓ Avaliar o efeito do pH<sub>inicial</sub> de cultivo na solubilização da rocha potássica;
- ✓ Avaliar o efeito da interação microrganismo-rocha;
- ✓ Avaliar a cinética de solubilização da rocha potássica;
- ✓ Avaliar o efeito do pré-tratamento da rocha potássica na cinética de solubilização biológica.

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Fontes de potássio**

As rochas de potássio (RKs) utilizadas neste trabalho foram fornecidas pela ICL Specialty Fertilizers (Brasil) e Yoorin Fertilizers (Brasil), e inicialmente denominadas de rocha 1 e rocha 2, respectivamente. A rocha 1 (12% K<sub>2</sub>O) é uma RK modelo de origem sedimentar e foi extraída da mina de Boulby (Yorkshire, Reino Unido) e a rocha 2 é uma RK modelo de origem ígnea (8,35% K<sub>2</sub>O) extraída da mina de Poços de Caldas (Minas Gerais, Brasil). O fertilizante comercial KCl (60% K<sub>2</sub>O) foi fornecido por Adubos Vera Cruz (Brasil).

## **3.2 Caracterizações físico-químicas**

### **3.2.1 Difração de Raios-X (DRX)**

As análises de Difração de Raios-X das rochas potássicas foram realizadas utilizando um difratômetro LabX XRD-6000 (Shimadzu, Japão) operado com radiação Cu-K $\alpha$  ( $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$ ), tensão de 30 kV e corrente de 30 mA. Os difratogramas foram registrados para  $2\theta$  de 4° a 90°, usando uma velocidade de varredura contínua de 1° min<sup>-1</sup>.

### **3.2.2 Fluorescência de Raios-X (FRX)**

A Fluorescência de Raios-X foi realizada para identificar os componentes químicos mais comuns presentes na estrutura das rochas usando a técnica de fusão de tetraborato de lítio.

### **3.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A morfologia das rochas potássicas in natura foi observada por Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG), utilizando um microscópio Sigma (ZEISS, Alemanha) operado a uma tensão de aceleração de 4 kV, com distância de 10 mm e um detector de elétrons secundário.

A morfologia da rocha após o cultivo submerso foi observada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), utilizando um microscópio JEOL (JSM-6510) operado a uma tensão de aceleração de 5 kV, com distância de 100 mm e um detector de elétrons secundário.

### **3.2.4 Determinação da área superficial**

A área superficial específica de ambas as rochas de potássio foi determinada por adsorção isotérmica de nitrogênio usando um instrumento Micromeritics ASAP-2020, de acordo com o método de 5 pontos B.E.T. Método (Brunauer – Emmett-Teller).

### **3.2.5 Determinação do tamanho de partícula**

O tamanho de partícula foi determinado por Dispersão Dinâmica de Luz (DLS). As análises foram realizadas em um High Performance Particle ZetaSizer (Malvern Instruments) para obter os tamanhos médios de partículas de ambas as rochas de potássio. Assim, 10 mg de cada amostra foram transferidos para um frasco de vidro de 20 mL, que continha 10 mL de

água destilada. Antes das medições de DLS, a solução foi sonicada (Bransom 450 W) por 10 min, a fim de dispersar as partículas dentro da solução

### **3.2.6 Espectroscopia por Raios-X por Dispersão de Energia (EDS)**

A composição química após os ensaios de dissolução das rochas em diferentes ácidos (Seção 3.3) foi observada por Espectroscopia por Raios-X por dispersão de energia (EDS) utilizando um microscópio JEOL (JSM-6510) operado a uma tensão de aceleração de 15 kV, com distância de 100 mm e um detector de elétrons secundário.

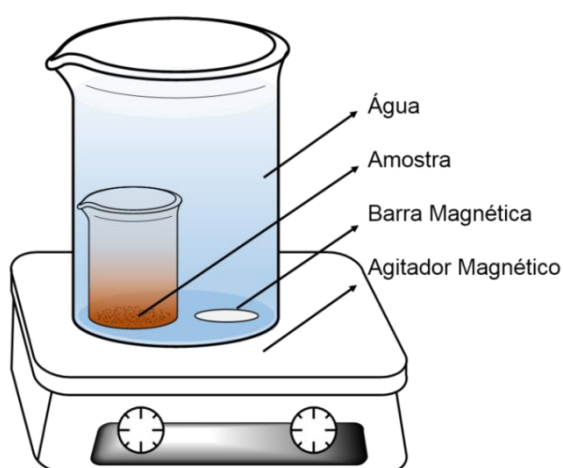
### **3.3 Ensaios de dissolução da rocha potássica em água e diferentes ácidos**

Para avaliar o efeito de diferentes ácidos na dissolução das RKs, foi realizado um experimento de liberação controlada utilizando a metodologia proposta por Bortoletto-Santos, Ribeiro e Polito, (2016). Os ensaios de liberação de potássio foram realizados utilizando água destilada como controle, ácido cítrico (0,1 M), ácido glucônico (0,1 M), e ácido oxálico (0,1 M), para ambas as rochas e ácido clorídrico (0,1 M e 1 M) apenas para a rocha 2. Os ácidos cítrico e oxálico foram fornecidos pela Synth (Brasil) e apresentaram uma fase pura  $\geq 99\%$  em peso. O ácido glucônico e o ácido clorídrico foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (Brasil) e apresentam uma fase pura entre 49-53% e 37% em peso, respectivamente.

O sistema consistiu em imergir uma massa de rocha que continha 100 ppm de K em um recipiente com 600 mL de solução (água ou ácido). Além das duas rochas também foi realizado um experimento controle com KCl. Para atingir esse valor a massa adicionada de KCl, rocha 1 e rocha 2 foram respectivamente, 0,20084 g, 1,1046 g e 1,5064 g. Este sistema foi mantido em uma sala com temperatura controlada em 25 °C e sob agitação branda. A agitação permite garantir que o teor de potássio medido na solução esteja homogêneo. O sistema de liberação utilizado nos experimentos é apresentado na Figura 3. Este sistema permite avaliar apenas o efeito dos ácidos a partir do processo de difusão do K da RK para o meio, uma vez que é desprovido de agitação mecânica e efeitos de cisalhamento nas partículas do material avaliado. O agitador magnético não influencia mecanicamente na liberação do K, apenas permite que o K solubilizado esteja homogêneo na solução líquida. Para cada experimento, uma alíquota de 1 mL foi coletada periodicamente às 6, 12, 24, 36, 48 h; após esse período, a alíquota foi coletada periodicamente a cada 24 h em 10 dias e depois a cada 48 h até o 20º dia. Em sequência, foram retiradas alíquotas a cada 5 dias até o 40º dia. Essas alíquotas foram usadas para a

determinação de potássio solubilizado, de acordo com a metodologia descrita na Seção 3.5. O material residual das RKs no final do experimento foi coletado e seco por 24 h a 60°C e submetido a análise de DRX, de acordo com a metodologia descrita na Seção 3.2.1. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e os dados calculados em médias  $\pm$  desvios padrão.

**Figura 3** - Sistema de liberação em meio aquoso utilizando um béquer como meio protetor dos materiais estudados



Fonte: Plotegher( 2014).

### 3.3.1 Determinação dos parâmetros cinéticos da liberação de K

A comparação entre as curvas e o comportamento de dissolução dos nutrientes pode ser interpretada a partir de um modelo cinético que permite avaliar a taxa de dissolução dos nutrientes nos diferentes ácidos avaliados. Dessa forma, foram calculadas as constantes cinéticas ( $k$ ) de dissolução para cada tratamento, assumindo que a cinética de liberação do nutriente é uma reação de segunda ordem e a sua lei de velocidade ( $v$ ) é proporcional à multiplicação da concentração molar do Reagente A e do Reagente B (Equação 1). É importante ressaltar que  $k$  é a constante de velocidade da reação, neste caso a constante de dissolução, bem como  $[A]$  e  $[B]$  são as concentrações dos reagentes A (ácidos ou água) e B (nutriente solubilizado), respectivamente.

A partir da Equação 1 e considerando que a concentração do solvente A (água, ácido cítrico, ácido glucônico, ácido oxálico ou clorídrico) é infinitamente maior que a concentração do soluto B (nutriente) no meio, pode-se assumir que sua variação em função do tempo é constante (Equação 2), isto é, a derivada da concentração molar de A ( $d[A]/dt$ ) é

aproximadamente zero. Assim, podemos aproximar a concentração de A ([A]) como sendo a concentração inicial de A ([A]<sub>0</sub>) e obter uma nova constante de velocidade k' (Equação 3).

$$v = k [A] [B] \quad \text{Eq. 1}$$

$$\frac{d[A]}{dt} \approx 0 \quad \text{Eq. 2}$$

$$k = k' [A]_0 \quad \text{Eq. 3}$$

Substituindo a Eq. 3 na Eq. 1, obtém-se uma lei de velocidade de pseudo primeira ordem (Equação 4), segundo Plotegher e Ribeiro (2016) e Atkins e de Paula (2008). Reescrevendo a Eq. 4, em função da variação da concentração de B no tempo e integrando a lei de velocidade de pseudo primeira ordem, obtém-se a equação utilizada para descrever o modelo cinético (Equação 5).

$$v = k [A] [B] = k' [B] \quad \text{Eq. 4}$$

$$\frac{d[B]}{dt} = -k'[B]$$

$$\int_{[B]_0}^{[B]} \frac{d[B]}{[B]} = -k' \int_0^t dt$$

$$\ln\left(\frac{[B]}{[B]_0}\right) = -k't$$

$$[B] = [B]_0 e^{-k't} \quad \text{Eq. 5}$$

Por fim, pode-se considerar que a concentração de B em um determinado tempo t é igual à concentração inicial de B ([B]<sub>0</sub>) menos a concentração de nutriente solubilizado, ou seja, [B] = [B]<sub>0</sub> – [Solubilizado]. Reescrevendo a Eq. 5 observa-se uma típica curva exponencial em que no tempo zero a quantidade de nutriente solubilizado é zero, assim como no tempo infinito a quantidade solubilizada é total (100% do nutriente inicialmente presente no material).

$$[Produto] = [B]_0 (1 - e^{-k't}) \quad \text{Eq. 6}$$

### 3.4 Solubilização biológica de rocha potássica

Nesta etapa foi avaliada a solubilização biológica da rocha 2 (RK modelo de origem ígnea) visando o aumento de sua solubilidade, uma vez que este tipo de mineral são os mais

abundantes da crosta terrestre, apresentam teores significativos de K em sua estrutura e baixo custo.

### **3.4.1 Microrganismos**

Uma triagem preliminar com quatro cepas fúngicas foi realizada para determinar a capacidade de solubilização da rocha 2. Os isolados utilizados neste trabalho foram o *Aspergillus niger* C, *Aspergillus niger* 3T5B8, *Aspergillus niger* F12, *Aspergillus* 763 pertencentes à coleção Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro, Brasil). As suspensões de esporos das cepas de fungos foram mantidas a -18 °C em uma solução de glicerol (30% em peso) e NaCl (0,9% em peso). Os esporos foram germinados em placas de Petri contendo Ágar Batata Dextrose (PDA) à 30 °C. Após 96 h, uma suspensão dos esporos cultivados foi colhida adicionando solução Tween 80 (1% em peso). A concentração de esporos foi determinada usando câmara de Neubauer.

### **3.4.2 Cultivo submerso (CSm)**

A solubilização da rocha potássica foi avaliada a partir de cultivo submerso, com e sem a etapa de pré-cultivo. O meio nutriente utilizado para solubilização da RK foi uma adaptação do meio líquido Aleksandrov (Aleksandrov et al., 1967) que consiste em 1% de glicose, 0,05% de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,0005% de FeCl<sub>3</sub>, 0,01% de CaCO<sub>3</sub>, 0,2% de CaHPO<sub>4</sub>, pH<sub>inicial</sub> 7.0. A etapa de pré-cultivo (10<sup>7</sup> esporos/mL) foi realizada por 48 h em uma incubadora agitadora orbital, a 30° C e 220 rpm. A solubilização da rocha foi iniciada transferindo 10% da suspensão de pré-cultivo para o meio de mesma composição e 2% de rocha (m/v) como fonte de K insolúvel, com agitação por 96 h também em uma incubadora agitadora orbital a 30° C e 220 rpm.

Após o período determinado, o material resultante foi filtrado a vácuo usando papel de filtro Whatman No. 1 e depois centrifugado por 20 min à 7000 rpm e 4 °C. O sobrenadante foi analisado quanto o teor de potássio solúvel (Seção 3.5). Nesta etapa também foram avaliados o pH<sub>Final</sub> e a acidez total do meio (Seção 3.6). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e os dados calculados em médias ± desvios padrão.

### **3.4.3 Avaliação de diferentes concentrações e tipo de fontes de carbono no CSm**

Após a triagem dos microrganismos foi avaliado o efeito das fontes de carbono glicose e glicerol, nas concentrações 1%, 2,5%, 5% e 10% (% m/v), na solubilização da rocha potássica.



Os ensaios de solubilização da rocha foram realizados de acordo com a metodologia descrita na Seção 3.4.2. Após o período determinado, o material resultante foi filtrado a vácuo usando papel de filtro Whatman No. 1 e depois centrifugado por 20 min à 7000 rpm e 4 °C. O sobrenadante foi analisado quanto ao teor de potássio solúvel (Seção 3.5). Nesta etapa também foram avaliados o pH<sub>Final</sub> e a acidez total do meio (Seção 3.6). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e os dados calculados em médias  $\pm$  desvios padrão.

#### **3.4.4 Avaliação do efeito de diferentes pH<sub>inicial</sub> de cultivo na solubilização de K**

O efeito do pH<sub>inicial</sub> do cultivo submerso na solubilização de K foi avaliado nos pH 2,0, 4,0 e 7,0, de acordo com a metodologia descrita na Seção 3.4.2. Após o período determinado, o material resultante foi filtrado a vácuo usando papel de filtro Whatman No. 1 e depois centrifugado por 20 min à 7000 rpm e 4 °C. O sobrenadante foi analisado quanto ao teor de potássio solúvel (Seção 3.5). Nesta etapa também foram avaliados o pH<sub>Final</sub> e a acidez total do meio (Seção 3.6). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e os dados calculados em médias  $\pm$  desvios padrão.

#### **3.4.5 Avaliação do efeito da interação microrganismo-rocha na solubilização de K**

A fim de se compreender melhor os mecanismos de solubilização da RK, quatro tratamentos foram avaliados nesta etapa: como controle foi adicionada à RK a água nas mesmas condições de cultivos descritos na Seção 3.4.2; para avaliar se a biomassa produzida pelo fungo tem um efeito cisalhante foi realizado o tratamento biomassa + RK; para avaliar o efeito da acidez do meio produzido pelo fungo foi realizado o tratamento extrato líquido obtido após o cultivo + RK; e para avaliar o efeito da interação física entre o fungo e a RK foi realizado o tratamento fungo + RK + meio. Todos os tratamentos foram realizados com e sem a etapa de pré-cultivo. O tratamento fungo + RK + meio refere-se ao CSm realizado de acordo com a Seção 3.4.2. Para os tratamentos biomassa + RK e extrato líquido + RK, foi realizado um CSm, de acordo com a Seção 3.4.2, porém sem adição da rocha. A biomassa e o extrato líquido produzidos neste cultivo foram separados por filtração a vácuo, usando papel de filtro Whatman No. 1 e depois centrifugado por 20 min à 7000 rpm e 4 °C. A biomassa foi autoclavada por 30 minutos à 121°C e 1 atm. Posteriormente, 2% de rocha (m/v) foi adicionada ao extrato líquido e a biomassa, em agitação por 96 h em uma incubadora agitadora orbital a 30° C e 220 rpm. Após o período determinado, o material resultante foi novamente filtrado e centrifugado nas condições já mencionadas. O sobrenadante foi analisado quanto o teor de potássio solúvel

(Seção 3.5). A rocha residual foi separada na etapa de filtração e seca por 24 h a 60°C e, posteriormente, sua morfologia foi observada por MEV (Seção 3.2.3). Nesta etapa também foram avaliados o  $\text{pH}_{\text{Final}}$  e a acidez total do meio (Seção 3.6). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e os dados calculados em médias  $\pm$  desvios padrão.

### **3.4.6 Cinética de solubilização de rocha potássica**

Após a seleção da melhor condição de fonte de carbono,  $\text{pH}_{\text{inicial}}$  e tipo de cultivo (com ou sem etapa de pré-cultivo) a cinética de solubilização da rocha potássica foi realizada por cultivo submerso de acordo com a Seção 3.4.2. A cinética foi realizada durante 10 dias, sendo os dias 1, 2, 3, 4, 5, 7 e 10 monitorados em relação ao K solubilizado (Seção 3.5), pH e acidez total (Seção 3.6), glicose residual (Seção 3.7) e biomassa produzida. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e os dados calculados em médias  $\pm$  desvios padrão.

### **3.4.7 Pré –tratamento da rocha potássica e cinética de solubilização**

Como estratégia para melhorar a solubilização biológica da RK ela foi submetida a um pré-tratamento de moagem. O processo de moagem foi realizado utilizando um moinho de bolas de alta-energia do tipo Fritsch Pulverisette 7 usando vaso com 5 esferas de zircônia de 10 mm de diâmetro, a uma rotação de 700 rpm por 6 h. Após a moagem o material foi estocado para posterior caracterização e ensaios de solubilização. A cinética de solubilização foi realizada conforme descrito na Seção 3.4.6 durante 10 dias, sendo as amostras retiradas nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 7 e 10, e monitorados em relação apenas ao K solubilizado (Seção 3.5) em meio de cultivo e água (controle).

## **3.5 Determinação dos elementos presentes nas rochas potássicas**

As quantidades de K, magnésio (Mg), cálcio (Ca), alumínio (Al) e sódio (Na) solubilizadas foram determinadas por espectroscopia de absorção atômica de chama (FAAS), utilizando um instrumento Perkin Elmer PinAAcle 900T operado no modo de atomização da chama. As condições analíticas para K foram comprimento de onda de 766,49 nm, largura de fenda de 0,7 nm e mistura de chama de ar sintético a 10 L min<sup>-1</sup> e acetileno a 2,50 L min<sup>-1</sup>. As condições analíticas para o Mg foram comprimento de onda de 285,21 nm, largura de fenda de 0,7 nm e mistura de chama de ar sintético a 10 L min<sup>-1</sup> e acetileno a 2,50 L min<sup>-1</sup>. As condições analíticas para o Ca foram comprimento de onda de 422,67 nm, largura de fenda de 0,7 nm e mistura de chama de nitroso a 6 L min<sup>-1</sup> e acetileno a 7,5 L min<sup>-1</sup>. As condições analíticas para

o Al foram comprimento de onda de 309,27 nm, largura de fenda de 0,7 nm e mistura de chama de óxido nitroso a 6 L min<sup>-1</sup> e acetileno a 7,5 L min<sup>-1</sup>. As condições analíticas para o Na foram comprimento de onda de 589,00 nm, largura de fenda de 0,7 nm e mistura de chama de ar sintético a 10 L min<sup>-1</sup> e acetileno a 2,50 L min<sup>-1</sup>.

O enxofre (S) solubilizado foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Camargo et al. (2009) no manual de Métodos de Análise Química, Mineralógica e Física de Solos do Instituto Agronômico de Campinas.

O K solubilizado na etapa de cinética de solubilização foi determinado por meio de uma reação colorimétrica, utilizando o kit de determinação de potássio da marca Doles Reagentes. Inicialmente, 100 µL de amostra foram adicionados a 1 mL do reagente precipitante, logo após a mistura foi homogeneizada e centrifugada a 3000 rpm durante 6-8 minutos. Em seguida, em tubos de ensaios foram adicionados 1 mL do reagente de uso e 100 µL da amostra, misturados vigorosamente, seguido de repouso por 5 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, a amostra foi homogeneizada novamente e lida em espectrofotômetro. O mesmo procedimento foi realizado para o padrão de potássio, no qual a concentração do K foi calculada utilizando as equações 7 e 8:

$$\text{Potássio} = \text{Absorbância teste} * \text{fator de calibração} \quad \text{Eq. 7}$$

$$\text{Fator de Calibração} = 5 / \text{Absorbância Padrão} \quad \text{Eq. 8}$$

As leituras foram feitas em cubetas de 1 mL em espectrofotômetro Genesis 10 UV Scanning a 580 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os dados calculados em médias ± desvios padrão.

### **3.6 Determinação do pH e acidez total no cultivo**

O pH do meio foi medido com um eletrodo de vidro e a acidez total foi determinada por titulação de uma amostra contendo 20 mL do extrato com NaOH 0,01 M, utilizando fenolftaleína (1% em peso) como indicador.

### **3.7 Determinação da glicose residual**

A concentração de glicose residual foi determinada por meio de uma reação enzimática GOD-POD, utilizando o kit de determinação de glicose Liquiform da marca Labtest. Em tubos

de ensaio foram adicionados 1 mL do reagente 1 do kit e 10 µL de amostra do cultivo, misturados vigorosamente e, posteriormente, incubado em banho-maria a 37 °C por 10 minutos. O mesmo procedimento foi realizado para o padrão de glicose, no qual a concentração de glicose foi calculada utilizando as equações 9 e 10:

$$\text{Glicose} = \text{Absorbância teste} * \text{fator de calibração} \quad \text{Eq. 9}$$

$$\text{Fator de Calibração} = 100/\text{Absorbância Padrão} \quad \text{Eq. 10}$$

As leituras foram feitas em cubetas de 1 mL em espectrofotômetro Genesis 10 UV Scanning a 505 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os dados calculados em médias ± desvios padrão.

### **3.8 Determinação da biomassa microbiana produzida**

A biomassa microbiana produzida durante a cinética de solubilização da RK foi determinada pelo peso seco após secagem a 60 °C por 48 h.

### **3.9 Análise estatística**

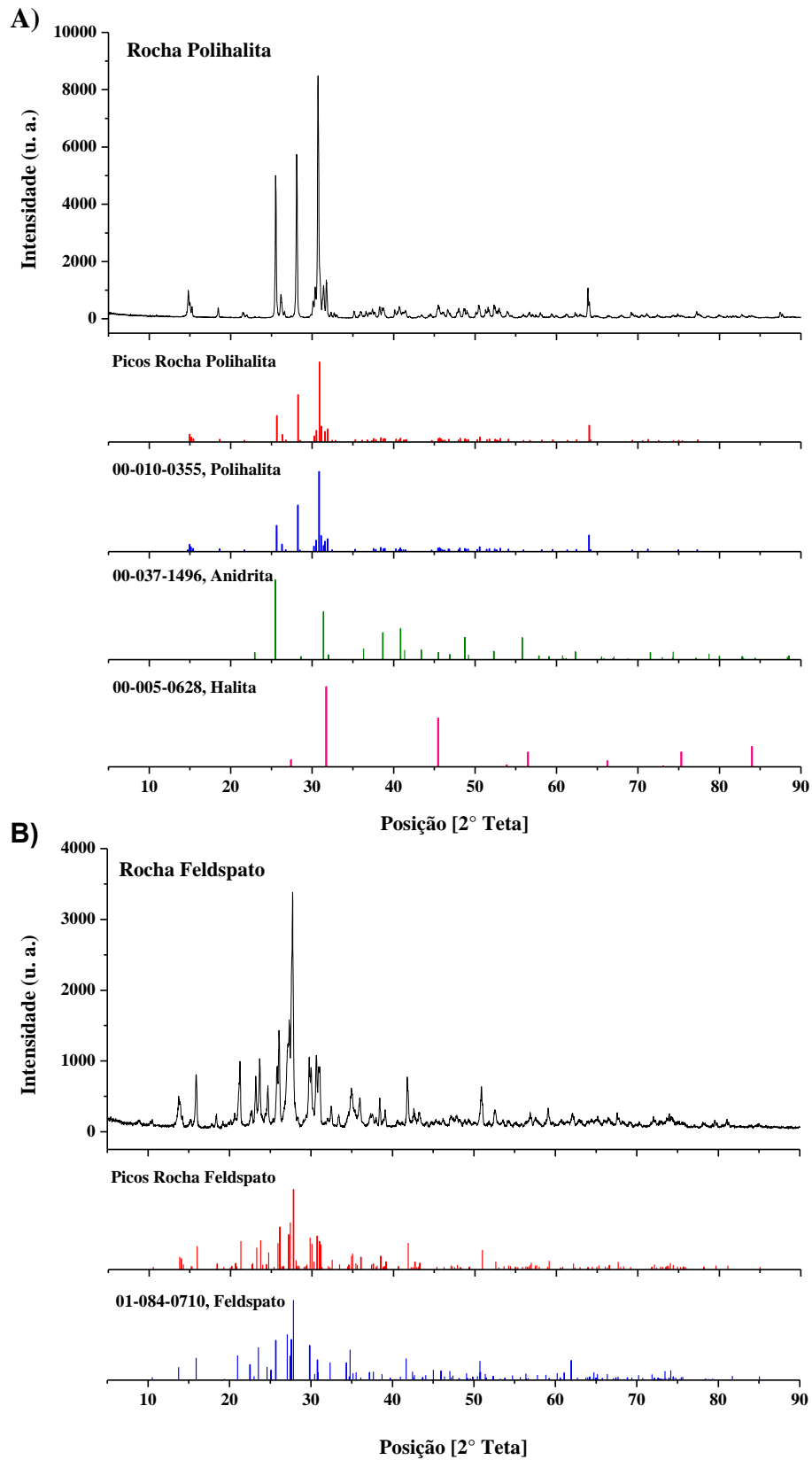
Os dados de potássio solubilizado da etapa de Solubilização Biológica foram submetidos a análise de variância e teste de Tukey a um nível de confiança de 95%, utilizando o software Origin 8.0.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Caracterizações físicas e químicas das rochas potássicas**

As caracterizações de ambas as rochas foram realizadas para a melhor compreensão da natureza física e química dessas distintas fontes de K naturais. A fase cristalina das rochas foi avaliada por difratometria de raios-X (Figura 4), composição química foi determinada por fluorescência de raios X (Tabela 3), e a morfologia de ambas as rochas foi observada por microscopia eletrônica de varedura de alta resolução (Figura 5). Aspectos físicos como área superficial e tamanho de partícula também foram avaliados (Tabela 3).

**Figura 4** - Padrões de DRX da A) RK<sub>Polihalita</sub> e B) RK<sub>Feldspato</sub>, incluindo as informações de pico extraídas e as fases minerais identificadas exibidas como padrões de aderência abaixo



Fonte: autoria própria.

A análise de DRX mostrou que a principal fase cristalina presente na rocha 1 é a Polihalita ( $K_2Ca_2Mg(SO_4)_4 \cdot 2H_2O$ , arquivo de difratograma PDF2 #00-010-0355), renomeada para  $RK_{Polihalita}$ . No entanto, também foi determinado a presença da fase Anidrita ( $CaSO_4$ , arquivo de difratograma PDF2 #00-037-1496) e Halita ( $NaCl$ , arquivo de difratograma PDF2 #00-005-0628). Fases minoritárias como Gesso ( $CaSO_4 \cdot H_2O$ , arquivo de difratograma PDF2 #01-074-1904), e provavelmente traços de quartzo ( $SiO_2$ , arquivo de difratograma PDF2 #01-070-3755) também podem estar presentes. A identificação dessas fases foi confirmada pela análise de fluorescência de raios-X (Tabela 3), que mostra a presença de  $K_2O$  (12% em peso),  $Na_2O$  (1,74% em peso),  $MgO$  (6,79% em peso),  $CaO$  (16,20% em peso),  $SiO_2$  (0,36% em peso) e  $SO_3$  (47,50% em peso) principais constituintes das fases determinadas na composição da  $RK_{Polihalita}$ . Além disso, essas fases são semelhantes às observadas por Kemp et al. (2016) que também estudaram amostras de rocha mineral de depósitos na região de Yorkshire (Reino Unido). Xu, Guo e Bai, (2017) estudaram a composição de rochas minerais de depósitos evaporíticos marinhos na região do Novo México (Estados Unidos) e também constataram a formação principal da fase Polihalita e fases secundárias semelhantes às determinadas neste trabalho.

Por outro lado, a rocha 2 é uma rocha de origem ígnea com predominância da fase K-Feldspato ( $[K_5Na_5]AlSi_3O_8$ , arquivo de difratograma PDF2 # 01-084-0710), renomeada para  $RK_{Feldspato}$ . A fase Nefelina ( $KNa_3[AlSi_3O_8]_4$ , arquivo de difratograma PDF2 #01-074-0387) também foi identificada. Estas fases também foram observados em estudos anteriores usando uma rocha mineral semelhante da região de Minas Gerais (Brasil) (Teixeira et al., 2012). A identificação dessas fases foi confirmada por análise de fluorescência de raios X (Tabela 3), que mostra a presença de quantidades de  $K_2O$  (8,35% em peso),  $Na_2O$  (7,44% em peso),  $Al_2O_3$  (20,04% em peso) e  $SiO_2$  (55,10% em peso). A presença desses elementos, que são os principais constituintes da fase Feldspato e seus análogos, confirma a rocha 2 como um mineral K-feldspato. A análise química também mostrou quantidades significativas de  $Fe_2O_3$  (3,88% em peso) e  $CaO$  (1,70% em peso) na constituição desta rocha.

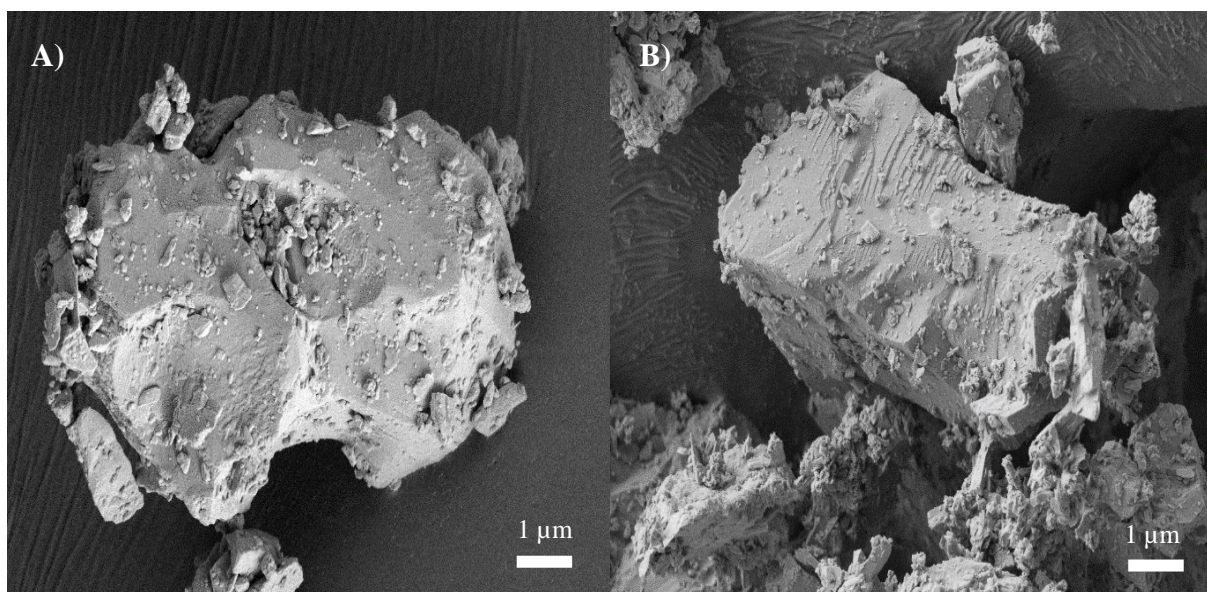
**Tabela 3** - Análise química por fluorescência de raios-X das rochas de potássio, juntamente com as áreas de superfície e tamanhos de partículas correspondentes

Óxidos	RK <sub>Polihalita</sub> (% massa)	RK <sub>Feldspato</sub> (% massa)
K <sub>2</sub> O	12	8,35
Na <sub>2</sub> O	1,74	7,44
MgO	6,79	0,35
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<0,1	20,4
SiO <sub>2</sub>	0,36	55,1
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,02	0,06
CaO	16,2	1,7
TiO <sub>2</sub>	<0,01	0,6
MnO	<0,01	0,25
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,01	3,88
SO <sub>3</sub>	47,5	<0,01
Outros	15,27	1,86
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
C	0,86	0,62
N	0,66	0,62
H	1,43	0,19
<b>Tamanho de Partículas</b>	<b>385,10 nm</b>	<b>561,0 nm</b>
<b>Área Superficial Específica</b>	<b>0,38 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup></b>	<b>2,75 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup></b>

Fonte: autoria própria.

Após determinar as fases cristalinas e a constituição química das rochas potássicas, seus aspectos físicos e morfológicos também foram avaliados. Ambas as rochas apresentam um tamanho de partículas médio inferior a 1µm e uma reduzida área superficial específica (Tabela 2). Esse resultado indica que as RKs apresentam uma elevada cristalinidade e uma baixa porosidade. De forma geral, a taxa de dissolução de um mineral é alterada de acordo com sua composição e estrutura química, dependendo também do tamanho de partícula e da área superficial reativa do mineral, uma vez que quanto menor o tamanho de partícula maior é a área superficial disponível para a reação (Berner, 1978; Helgeson et al., 1984; Martins et al., 2004). Por fim, os aspectos morfológicos de ambas as rochas estão apresentados na Figura 5, comprovando visualmente a baixa porosidade de ambas as rochas, uma vez que é observado uma superfície lisa sem a presença de rugosidade e poros.

**Figura 5** - Micrografias por microscopia eletrônica de alta resolução (MEV-FEG). A) RK<sub>Polihalita</sub> B) RK<sub>Feldspato</sub>



Fonte: autoria própria.

## 4.2 Estudo da dissolução das rochas potássicas em diferentes meios

### 4.2.1 Efeito dos ácidos orgânicos na dissolução das rochas potássicas

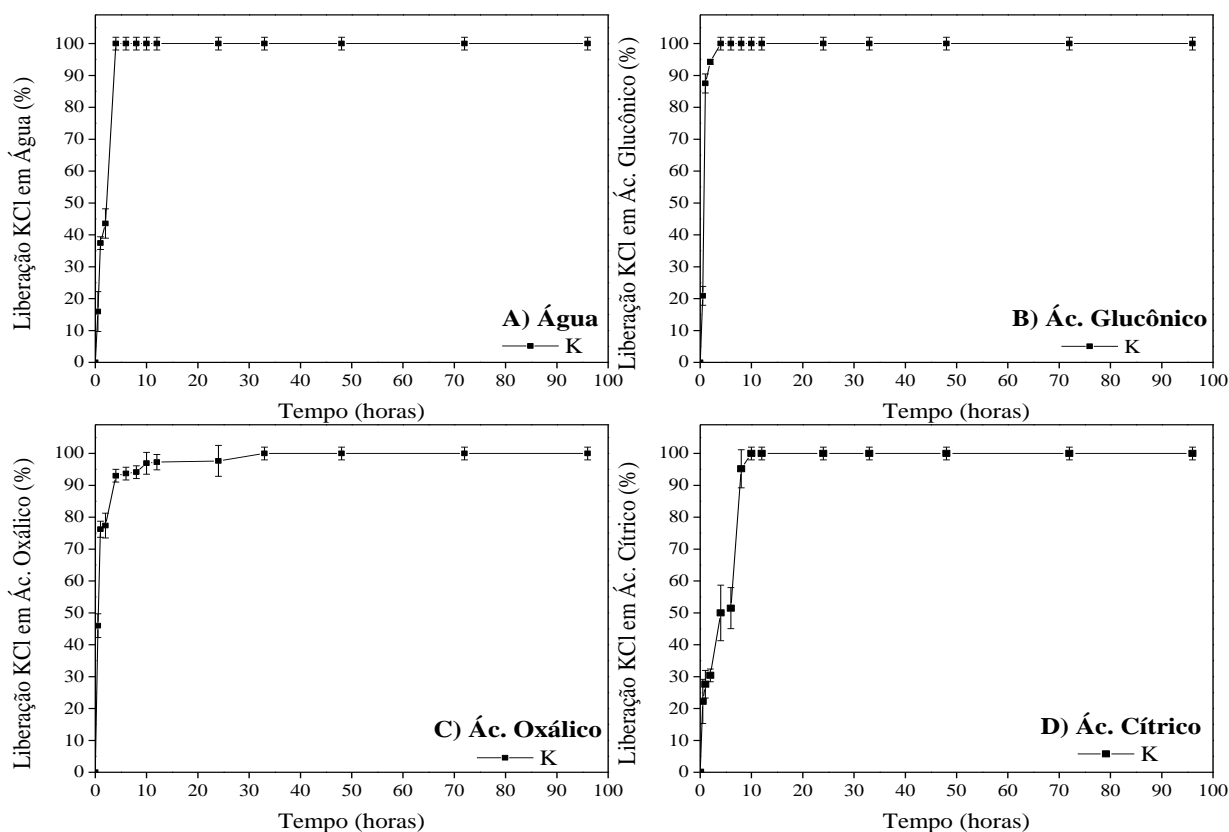
Como reportado na literatura (Masood and Bano, 2016; Meena et al., 2014; Sattar et al., 2019), a produção de ácidos orgânicos de baixa massa molecular é o principal mecanismo pelo qual os agentes microbianos, principalmente os fungos filamentosos, promovem a solubilização de RKs. Entretanto, pouco se sabe do potencial específico de cada ácido orgânico na dissolução/solubilização destas RKs. Entender o mecanismo e o efeito específico de cada ácido orgânico na dissolução das RKs é interessante para o desenvolvimento de estratégias para melhorar a solubilização *in vitro*, a partir da otimização da produção de um ácido orgânico com maior potencial para promover a dissolução durante o cultivo microbiano (Kpombrekou-a and Tabatabai, 2003). Entender esse mecanismo também pode ajudar a selecionar microrganismos eficientes para produção de ácidos orgânicos e inoculantes agrícolas com um maior potencial de solubilização do K insolúvel presente no solo ou aplicado como RKs (Setiawati and Mutmainnah, 2016; Song et al., 2015a). Ou mesmo, para entender como a RK é solubilizada no solo, uma vez que o solo também apresenta ácidos orgânicos produzidos a partir de microrganismos ali presentes ou inoculados (Yadav and Sidhu, 2016). Portanto, nesta etapa foi avaliado o efeito de três ácidos orgânicos de características diferentes (ácido glucônico, oxálico e cítrico, respectivamente um ácido monocarboxílico, dicarboxílico e tricarboxílico) na



dissolução de duas RKs distintas ( $RK_{\text{Polihalita}}$  e  $RK_{\text{Feldspato}}$ ) e uma fonte comercial de fertilizante solúvel de K (KCl). Os ensaios de dissolução também foram feitos em água, utilizada como meio neutro padrão de comparação com os ácidos orgânicos e, apenas para a  $RK_{\text{Feldspato}}$ , duas concentrações distintas de ácido clorídrico também foram avaliadas.

A Figura 6 apresenta o perfil de dissolução do fertilizante KCl em água e em diferentes ácidos orgânicos. O KCl apresentou uma alta dissolução em todos os ensaios avaliados e os resultados obtidos nesta etapa indicam que o tipo de ácido não influenciou significativamente na dissolução do K, uma vez que o mesmo apresentou completa dissolução em até 24 h, para todos os ácidos avaliados. Esse fertilizante também apresentou altos valores na constante de taxa de dissolução para o K (Tabela 4), quando comparado as demais rochas avaliadas, o que confirma a sua alta solubilidade. Esta é a principal característica que faz com que este seja o fertilizante químico potássico mais utilizado na agricultura (Borges and Coelho, 2009), além de ser comumente utilizado como um parâmetro de controle em ensaios de solubilização a fim de comparação com outras potenciais fontes de potássio de baixa solubilidade.

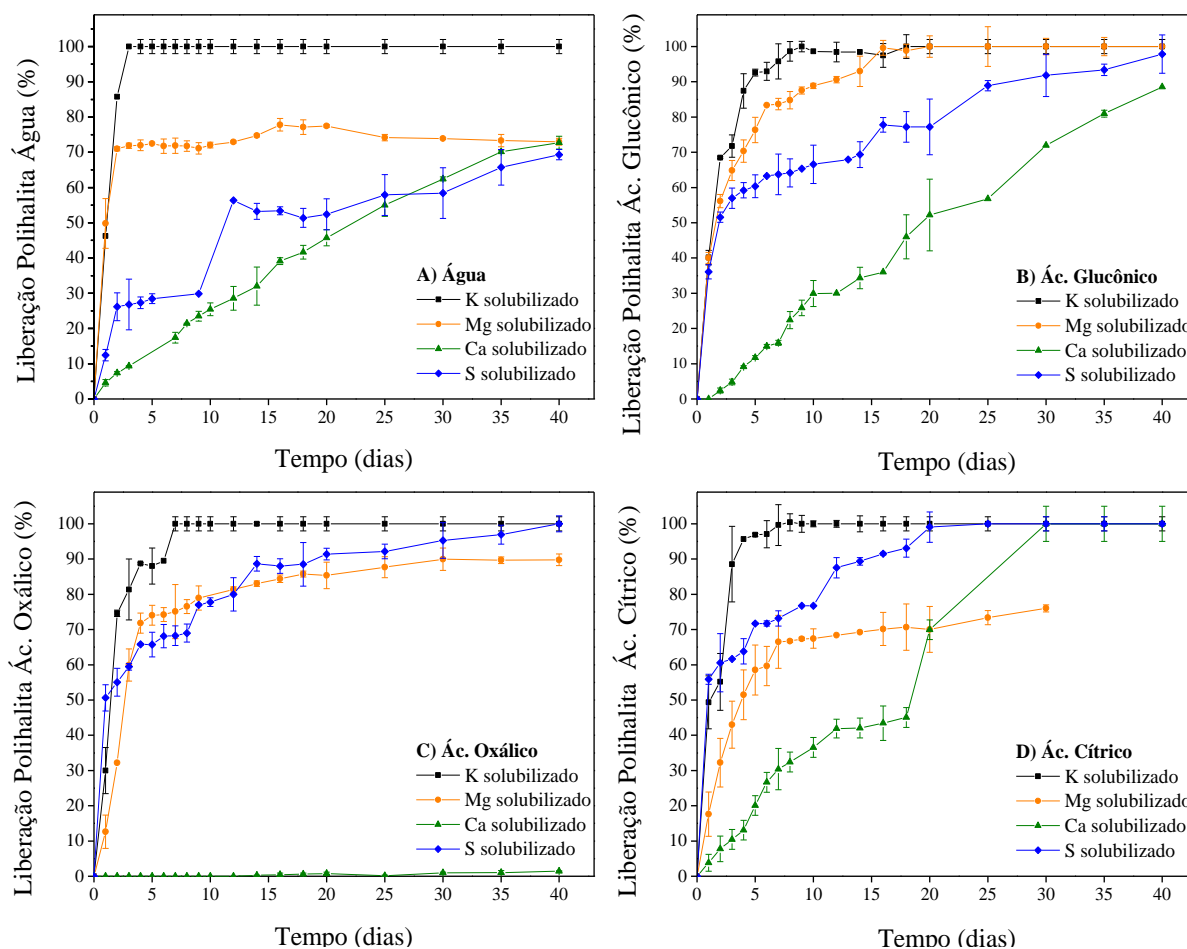
**Figura 6** - Dissolução de KCl em água e em diferentes ácidos orgânicos. A) Água B) Ácido Glucônico C) Ácido Oxálico D) Ácido Cítrico



Fonte: autoria própria.

A Figura 7 apresenta o perfil de dissolução do K e também do Mg, Ca e S, principais elementos que constituem a fase mineralógica da RK<sub>Polihalita</sub>, em água e nos ácidos orgânicos glucônico, oxálico e cítrico.

**Figura 7** - Dissolução da RK<sub>Polihalita</sub> em água e em diferentes ácidos orgânicos. A) Água B) Ácido Glucônico C) Ácido Oxálico D) Ácido Cítrico



Fonte: autoria própria.

Como observado na Figura 7, o K presente na RK<sub>Polihalita</sub> alcançou 100% de dissolução em água (4 dias), ácido glucônico (18 dias) e ácido oxálico (12 dias) e ácido cítrico (8 dias). Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam a completa dissolução do K presente na RK<sub>Polihalita</sub>, mesmo sendo uma dissolução mais lenta se comparada à obtida para o K presente no KCl. Para esta RK, a dissolução em água ocorreu mais rapidamente que nos demais ácidos e isso indica que os ácidos orgânicos não influenciaram significativamente na dissolução do K. Essa afirmação pode ser confirmada a partir da constante de taxa de dissolução calculada (Tabela 4), em que as constantes de dissolução dos ácidos orgânicos apresentaram valores semelhantes entre si e inferiores a calculada para água.

O Mg presente na  $RK_{\text{Polihalita}}$  alcançou uma máxima dissolução de 77,81% em água (16 dias), 100% em ácido glucônico (20 dias), 89,93% em ácido oxálico (30 dias) e 76,02% em ácido cítrico (30 dias). Diferente do K, os ácidos orgânicos influenciaram significativamente na dissolução do Mg, apresentando uma constante de taxa de dissolução superior a água, como observado na Tabela 4. Foi possível constatar que, mesmo apresentando constantes de taxa de dissolução inferiores a obtida pela água, a dissolução final do Mg nos ácidos apresentou-se mais elevada, ou seja, nos ácidos a dissolução do Mg foi mais lenta porém, alcançou uma dissolução superior a da água.

O Ca presente na  $RK_{\text{Polihalita}}$  alcançou uma máxima dissolução de 72,74% em água (40 dias), 88,55% em ácido glucônico (40 dias), 1,42% em ácido oxálico (40 dias) e 100% em ácido cítrico (30 dias). A maior constante de taxa de dissolução (Tabela 4) para o Ca foi observada para o ácido cítrico, enquanto para o ácido oxálico o valor de k não foi obtido, uma vez que a dissolução do Ca foi pequena dada a provável complexação do metal neste meio. Em contrapartida, os ácidos cítrico e glucônico influenciaram significativamente a liberação do Ca presente na rocha se comparados a água.

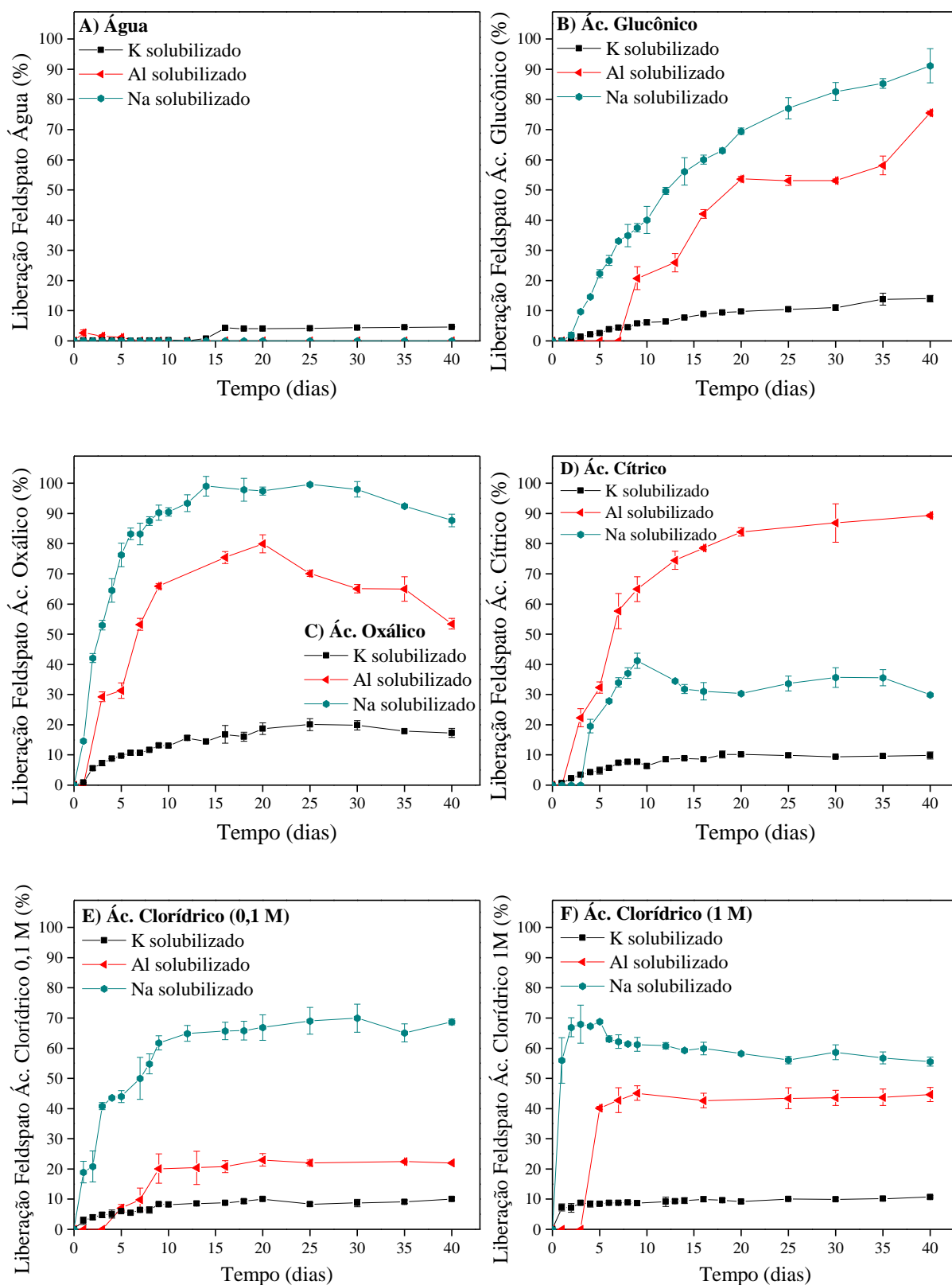
Já o S presente na  $RK_{\text{Polihalita}}$  alcançou uma máxima dissolução de 69,32% em água (40 dias), 97,89% em ácido glucônico (40 dias), 100% em ácido oxálico (40 dias) e 100% em ácido cítrico (25 dias). Para o S, os ácidos orgânicos também se mostraram mais eficientes na dissolução desse nutriente em contraste com a água, dado os maiores valores das constantes de taxas de dissolução (Tabela 4) apresentados.

Nesta etapa, foi possível observar que a dissolução do Mg, Ca e S é mais lenta, se comparada a dissolução do K presente na  $RK_{\text{Polihalita}}$ , no entanto acontecem simultaneamente assim como sugerido por outros estudos presentes na literatura (Herrera, 2019; Yavorskii *et al.*, 2009). Outro fator importante a ser salientado é que existem diferenças nas taxas de dissolução de cada nutriente, assim como tipo de ácido também influenciou e potencializou a taxa de dissolução destes. A liberação desses nutrientes gera interesse em estudos mais aprofundados sobre cinética de dissolução desse mineral e, principalmente, em relação aos outros nutrientes que constituem está RK. Herrera (2019) avaliou o potencial da Polihalita como uma fonte multinutriente de K, Ca, Mg e S e seus efeitos na produtividade e qualidade da cana-de-açúcar. O autor evidenciou que a Polihalita se apresentou como uma fonte adequada para o fornecimento dos nutrientes nas doses necessárias para garantir uma boa eficiência agrônômica. Já Yavorskii *et al.* (2009) avaliaram a solubilização de K e Mg presente em Polihalita em um

reator equipado com agitação em 10% de ácido clorídrico por 1 h a 50, 70, 90 e 100°C e observaram que a medida em que se elevou a temperatura a solubilização de ambos os elementos também aumentou, sendo para o K 61% (50°C), 70% (70°C), 85% (90°C) e 94% (100°C) e para o Mg 67% (50°C), 74% (70°C), 92% (90°C) e 94% (100°C). Em contrapartida à literatura, os resultados obtidos para a  $RK_{\text{Polihalita}}$  neste trabalho indicam que a dissolução dos elementos presentes nesta rocha também pode ser alcançada a partir de condições mais brandas, ou seja, sem o uso de ácidos fortes ou altas temperaturas.

Com relação à dissolução da  $RK_{\text{Feldspato}}$ , a Figura 8 apresenta o perfil de dissolução do K e também para os elementos Al e Na em água, ácidos orgânicos e ácido clorídrico. O K presente na  $RK_{\text{Feldspato}}$  alcançou uma máxima dissolução de 4,36% em água (40 dias), 13,25% em ácido glucônico (40 dias), 20,05% em ácido oxálico (25 dias) e 10,13% em ácido cítrico (20 dias). Em comparação com os ensaios de liberação do KCl e da  $RK_{\text{Polihalita}}$ , a  $RK_{\text{Feldspato}}$  apresentou menores valores de dissolução de K e isso ocorreu provavelmente por que o K presente na  $RK_{\text{Feldspato}}$  está inserido em uma estrutura cristalina silicatada altamente estável e resistente, o que não permite que o cátion  $K^+$  consiga se libertar com facilidade (Cara et al., 2012). Entretanto, embora os ácidos orgânicos, principalmente o ácido oxálico, proporcionem um aumento na dissolução do K comparado ao efeito da água, o teor de K não ultrapassou 20,05%. Por isso, posteriormente, foram realizados ensaios em duas concentrações de ácido clorídrico a fim de avaliar se um ácido inorgânico, assim como o aumento de sua concentração, influenciariam na dissolução do K. Deste modo, a máxima dissolução de K obtida foi de 10,08% em ácido clorídrico 0,1 M (20 dias) e 10,73% em ácido clorídrico 1 M (40 dias). O ácido clorídrico não apresentou um efeito significativo na dissolução do K, se comparado aos demais ácidos avaliados. Algo semelhante ocorreu no trabalho de Duarte (2019) que ao avaliar diferentes concentrações de ácido oxálico na solubilização de RK Verdete concluiu que o tempo de reação possui uma maior influência na dissolução do K que a concentração do ácido empregado. Assim, esse resultado evidencia a alta estabilidade estrutural deste mineral que contribui diretamente para a baixa solubilidade do K.

**Figura 8** - Dissolução  $RK_{\text{Feldspato}}$  em água e em diferentes ácidos. A) Água B) Ácido Glucônico C) Ácido Oxálico D) Ácido Cítrico E) Ácido Clorídrico (0,1 M) e F) Ácido Clorídrico (1 M)



Fonte: autoria própria.

Com relação a taxa de dissolução (Tabela 4) para a  $RK_{\text{Feldspato}}$ , a constante não pôde ser calculada para todos os nutrientes em água, uma vez que os elementos liberados nesse meio apresentaram teores muito baixos de dissolução. Com isso, foi possível afirmar o efeito significativo causado pelos diferentes ácidos avaliados na dissolução dos nutrientes da RK. Para o K, o ácido cítrico apresentou a maior taxa de dissolução entre os ácidos orgânicos avaliados e o ácido clorídrico (0,1 M) apresentou uma taxa semelhante à do ácido cítrico. Contudo, em ambos os casos, a dissolução do K não ultrapassou 10,73%, sendo a dissolução em ácido cítrico mais rápida que em ácido clorídrico (0,1 M), evidenciando o efeito positivo do ácido orgânico na dissolução. Para as diferentes concentrações do ácido inorgânico avaliado, foi possível observar um alto valor da constante k para os ensaios de ácido clorídrico (1 M) em comparação com o ensaio menos concentrado. No entanto, mesmo apresentando uma maior velocidade de dissolução associada, em ambos os ensaios foi observado o limite máximo de 10% de K, o que infere que a concentração do ácido não influencia significativamente na dissolução do K.

Já para o Na presente na  $RK_{\text{Feldspato}}$  não houve dissolução em água enquanto alcançou uma máxima dissolução de 86,11% em ácido glucônico (40 dias), 99,61% em ácido oxálico (25 dias) e 35,64% em ácido cítrico (30 dias), 69,98% em ácido clorídrico 0,1 M (30 dias) e 68,79% em ácido clorídrico 1 M (40 dias). Os ácidos também influenciaram significativamente na dissolução do Na, sendo as maiores constante de taxa de dissolução (Tabela 4) obtidas para ácido clorídrico (1 M) e ácido glucônico, respectivamente. Neste caso, mesmo apresentando uma maior velocidade de dissolução, o ácido clorídrico (1 M) apresentou um menor teor de liberação se comparado ao ácido glucônico, o que evidencia o efeito potencializador do ácido orgânico neste nutriente.

Para o Al presente na  $RK_{\text{Feldspato}}$  a máxima dissolução alcançada foi de 2,68% em água (40 dias), 75,53% em ácido glucônico (40 dias), 79,91% em ácido oxálico (20 dias) e 89,28% em ácido cítrico (40 dias), 23,01% em ácido clorídrico 0,1 M (20 dias) e 44,68% em ácido clorídrico 1 M (40 dias). Os ácidos se mostraram eficientes na dissolução deste nutriente, apresentando os maiores valores de constante de taxa de dissolução (Tabela 4) para o ácido clorídrico (1 M) e ácido glucônico, respectivamente. Todos os ensaios apresentaram valores significativos de dissolução de Al, principalmente os ensaios com os ácidos orgânicos, e isso ocorre devido a capacidade de quelação do Al apresentada por esses ácidos (Mendes et al., 2014; Motekaitis and Martell, 1984).

**Tabela 4** - Constante de taxa de dissolução dos nutrientes constituintes do KCl,  $RK_{Polihalita}$  e  $RK_{Feldspato}$  em água, ácido glucônico, oxálico e cítrico

Constante k ( $h^{-1}10^{-3}$ )								
Meios	KCl	$RK_{Polihalita}$				$RK_{Feldspato}$		
	K	K	Mg	Ca	S	K	Na	Al
Água	452,8	35,3	40,8	0,8	3,3	-	-	-
Ácido Glucônico (0,1 M)	1170,1	20,4	14,4	0,8	6,8	2,6	28,2	3,6
Ácido Oxálico (0,1 M)	1170,1	25,9	13,1	-	12,0	5,8	12,1	10,3
Ácido Cítrico (0,1 M)	224,8	24,8	13,3	5,1	16,2	7,6	26,3	7,4
Ácido Clorídrico (0, 1M)	*	*	*	*	*	7,2	9,4	8,2
Ácido Clorídrico (1 M)	*	*	*	*	*	47,8	67,5	148,3

$R^2$  superior a 0,90 para todos os ensaios; \*ensaios não realizados.

**Fonte:** autoria própria.

Por fim, de modo geral, a ordem de dissolução do K nos ácidos avaliados neste trabalho foi  $KCl > RK_{Polihalita} > RK_{Feldspato}$ . Isso ocorre, principalmente, pelas características específicas de cada material, uma vez que o KCl é um sal solúvel, a  $RK_{Polihalita}$  é uma rocha de origem sedimentar e a  $RK_{Feldspato}$  é uma rocha de origem ígnea, havendo assim diferenças no grau de solubilidade do K entre os materiais avaliados. A baixa dissolução de K apresentada pela  $RK_{Feldspato}$  pode ser explicada pelo complexo processo de dissolução apresentada por este tipo de rocha que envolve reações e mecanismos como: a liberação de cátions via troca iônica, a adsorção/dessorção dos elementos dissolvidos na superfície do mineral, a degradação hidrolítica das ligações tetraédricas e a remoção do Al e da Si presentes na rede cristalina do mineral. Assim, durante a dissolução da rocha forma-se um complexo metaestável ativo na superfície do mineral, em que a natureza química e a composição dos elementos contidos no meio determinam os produtos complexos e hidratados a serem formados após a decomposição irreversível da mesma. Neste sentido, elevada acidez no meio, ligantes orgânicos e inorgânicos, assim como a presença de defeitos na estrutura do mineral são capazes de contribuir na dissolução da rocha. Além disso, a protonação dos elementos Al e Si também influenciam diretamente na taxa de dissolução (Skorina and Allanore, 2015). Neste contexto, a partir dos resultados desta etapa foi possível afirmar que, principalmente para a  $RK_{Feldspato}$ , os ácidos orgânicos intensificaram a dissolução dos nutrientes, permitindo alcançar maiores valores de K liberado.

#### 4.2.2 Caracterização do material residual

Após a finalização dos ensaios de dissolução, o material residual de ambas as RKs foi separado e analisado por difração de raios-X (DRX) para a identificação da estrutura da fase

residual. A Figura 9 mostra os padrões de DRX para a  $RK_{\text{Polihalita}}$  (Figura 9B-E) e  $RK_{\text{Feldspato}}$  (Figura 9G-L) em água e nos ácidos avaliados após a dissolução. O KCl foi completamente solubilizado durante os ensaios, não restando material residual ao final do experimento.

A etapa de caracterização da  $RK_{\text{Polihalita}}$  natural (Seção 4.1, Figura 4) mostrou que a principal fase mineralógica presente é a fase cristalina Polihalita ( $K_2Ca_2Mg(SO_4)_4 \cdot 2H_2O$ , arquivo de difratograma PDF2 #00-010-0355). Já para o material residual, os padrões de DRX da  $RK_{\text{Polihalita}}$  (Figura 9B-E) indicam a formação de novas fases na rocha após a dissolução. O material remanescente da  $RK_{\text{Polihalita}}$  apresentou um padrão de DRX diferente da  $RK_{\text{Polihalita}}$  natural e isso indica que conforme o processo de dissolução ocorria novas fases cristalinas foram formadas. Também, observaram-se perfis de DRX diferentes para água e os ácidos orgânicos, indicando que o tipo do meio interfere na fase residual formada.

Para o material residual resultante da dissolução da  $RK_{\text{Polihalita}}$  em água (Figura 9A), a principal fase cristalina identificada foi o gesso ( $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ , arquivo de difratograma PDF2 #00-033-0311). Semelhante água, a principal fase cristalina indenticada no material residual resultante da dissolução em ácido glucônico (Figura 9B) e ácido cítrico (Figura 9D) também foi o gesso ( $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ , arquivo de difratograma PDF2 #00-033-0311). Entretanto, a dissolução em ácido oxálico (Figura 9C) foi identificada a fase oxalato de cálcio ( $C_2CaO_4 \cdot H_2O$ , arquivo de difratograma PDF2 #00-020-0231). Estes resultados colaboram com a análise de Espectrometria de Raios-X por Dispersão e Energia (EDX) (Figura 10), que mostrou a presença, principalmente, de Ca e S no material residual da água, ácido glucônico e cítrico, e apenas de Ca para o ácido oxálico.

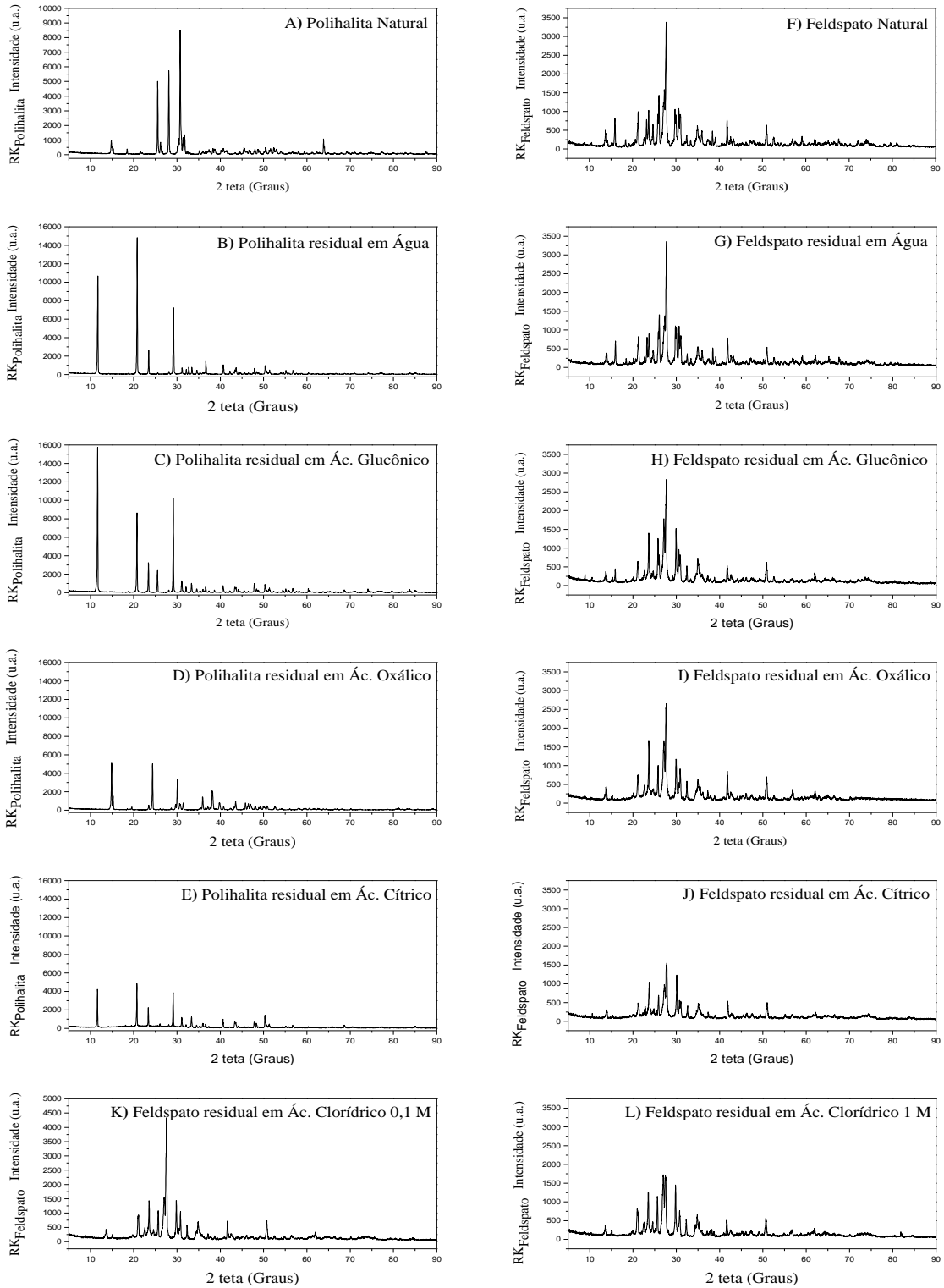
A presença de gesso residual no final do experimento de dissolução em água, ácido glucônico e ácido cítrico, deve-se principalmente a presença de gesso na  $RK_{\text{Polihalita}}$  natural e também possível formação durante o processo de dissolução, uma vez que a  $RK_{\text{Polihalita}}$  apresenta elevados teores de Ca e  $SO_4^{2-}$ . O gesso apresenta baixa solubilidade em água (Leite et al., 2007) logo, a fase não se dissolveu ao longo do experimento. Entretanto, não foi observada a presença de gesso no material residual em ácido oxálico e isto se deve ao alto potencial do ácido oxálico quelatar e complexar com o cálcio, formando oxalato de cálcio (Hannig et al., 2005).

Em contraste ao observado para a  $RK_{\text{Polihalita}}$ , o material residual resultante da dissolução da  $RK_{\text{Feldspato}}$  em água e ácidos orgânicos (Figura 9F-L) apresentou fases cristalinas semelhantes



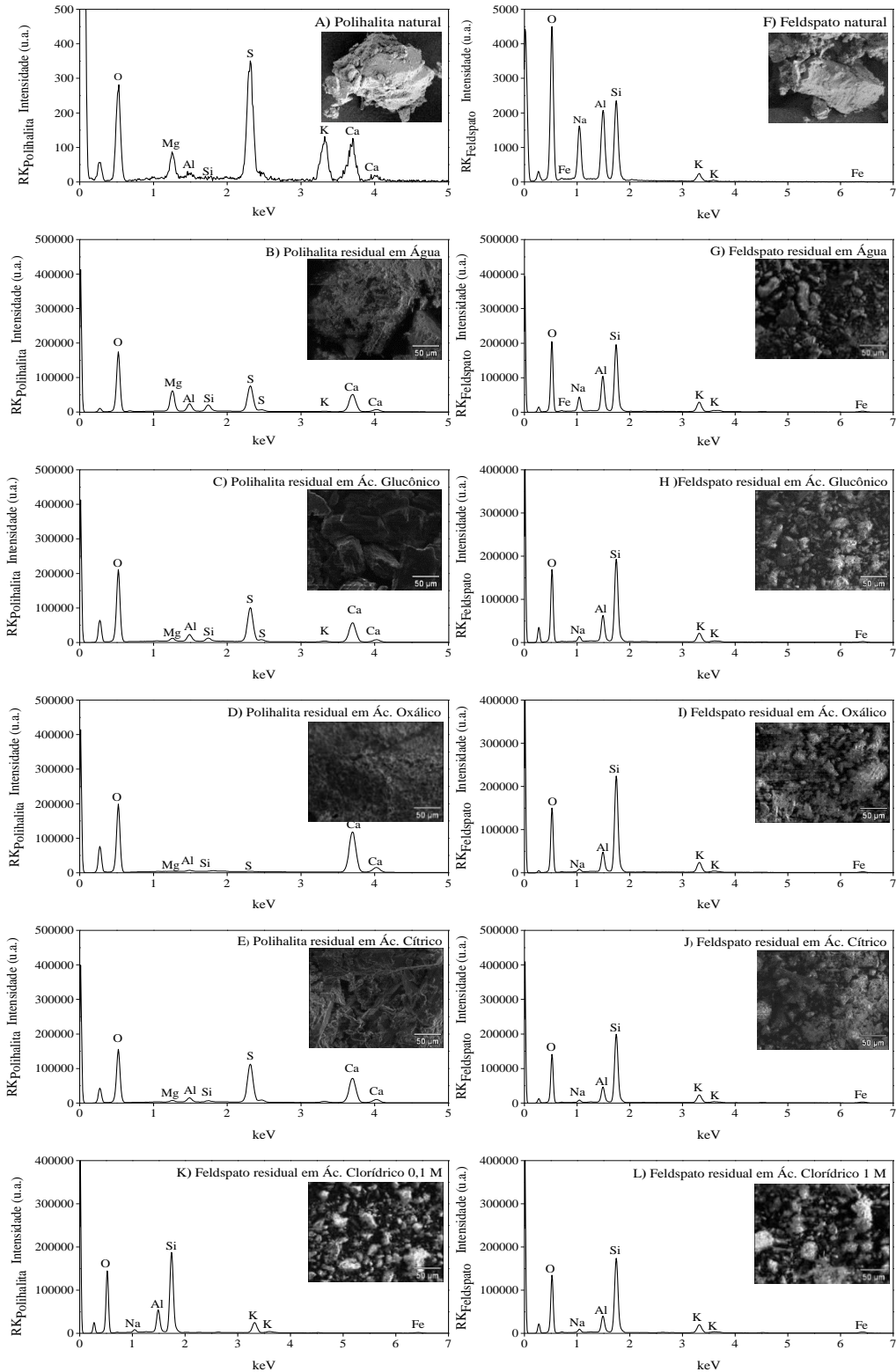
para todos os meios avaliados. A etapa de caracterização da  $RK_{\text{Feldspato}}$  natural (Secção 4.1, Figura 4) mostrou que a principal fase cristalina presente é a fase cristalina silicato de Alumínio Potássio e Sódio ( $[K_5Na_5]AlSi_3O_8$ , arquivo de difratograma PDF2 # 01-084-0710). Após o experimento de dissolução, o padrão de DRX para o material residual da dissolução em água (Figura 9G), ácido glucônico (Figura 9H) e ácido clorídrico 0,1 M (Figura 9K) permaneceram semelhantes ao padrão de DRX da  $RK_{\text{Feldspato}}$  natural (Figura 9F). No entanto, para o ácido oxálico (Figura 9I), ácido clorídrico 1 M (Figura 9L) e, principalmente, para o ácido cítrico (Figura 9J) observou-se maior amortização dos picos de difração que caracterizam a fase alumínio silicato. Sendo que, a intensidade dos picos de difração amortizou na ordem de 50% para a dissolução com ácido cítrico. A análise de EDX (Figura 10) também mostrou a presença de K, Na, Al e Si, comprovando que a dissolução da  $RK_{\text{Feldspato}}$  não foi completa em nenhum dos meios avaliados.

**Figura 9** - DRX, comparação entre a rocha natural e após a dissolução A) RK<sub>Polihalita</sub> natural, B) RK<sub>Polihalita</sub> em água C) RK<sub>Polihalita</sub> em ácido glucônico, D) RK<sub>Polihalita</sub> ácido oxálico, E) RK<sub>Polihalita</sub> em ácido cítrico, F) RK<sub>Feldspato</sub> natural, G) RK<sub>Feldspato</sub> em água H) RK<sub>Feldspato</sub> em ácido glucônico, I) RK<sub>Feldspato</sub> em ácido oxálico, J) RK<sub>Feldspato</sub> em ácido cítrico, K) RK<sub>Feldspato</sub> em ácido clorídrico (0,104 M) e L) RK<sub>Feldspato</sub> em ácido clorídrico (1 M)



Fonte: autoria própria.

**Figura 10** - EDX, comparação entre a rocha natural e após a dissolução A) RK<sub>Polihalita</sub> natural, B) RK<sub>Polihalita</sub> em água C) RK<sub>Polihalita</sub> em ácido glucônico, D) RK<sub>Polihalita</sub> ácido oxálico, E) RK<sub>Polihalita</sub> em ácido cítrico, F) RK<sub>Feldspato</sub> natural, G) RK<sub>Feldspato</sub> em água, H) RK<sub>Feldspato</sub> em ácido glucônico, I) RK<sub>Feldspato</sub> em ácido oxálico, J) RK<sub>Feldspato</sub> em ácido cítrico, K) RK<sub>Feldspato</sub> em ácido clorídrico (0,1 M) e L) RK<sub>Feldspato</sub> em ácido clorídrico (1 M)



Fonte: autoria própria.

### 4.3 Solubilização biológica da rocha potássica

Nesta etapa foi avaliada a solubilização biológica da  $RK_{\text{Feldspato}}$ . Os K-feldspatos ocorrem em abundância no território nacional e constituem uma classe de mineral com grande potencial para uso na agricultura brasileira (Nascimento and Loureiro, 2009). O desenvolvimento de estratégias que visam o aumento da solubilidade do potássio contido neste tipo de rocha é de interesse nacional, uma vez que pode viabilizar a utilização dessa rocha como uma fonte alternativa de fertilizante. Neste contexto, os resultados dos ensaios de dissolução da  $RK_{\text{Feldspato}}$  evidenciaram que a solubilidade do K desta RK em água desta rocha é muito baixa, contudo pode ser melhorada pela ação de ácidos orgânicos, principalmente pelo ácido oxálico e ácido cítrico, como observado na Seção 4.2. Portanto, esta etapa teve como objetivo estudar estratégias para promover o aumento de solubilidade da  $RK_{\text{Feldspato}}$  a partir da ação de microrganismos produtores de ácidos orgânicos utilizando cultivo submerso. Para atingir este objetivo, foram avaliados: o potencial de diferentes microrganismos, o efeito e a concentração de diferentes fontes de carbono durante no cultivo microbiano, o efeito da etapa de pré-cultivo para o processo de e, também, o efeito da interação microrganismo-rocha para entender melhor a dinâmica da solubilização quando existe presença do microrganismo. A cinética completa de solubilização biológica da  $RK_{\text{Feldspato}}$  foi monitorada, e uma etapa de pré-tratamento da rocha potássica foi proposta para aumentar a eficiência de solubilização da  $RK_{\text{Feldspato}}$  na solubilização biológica.

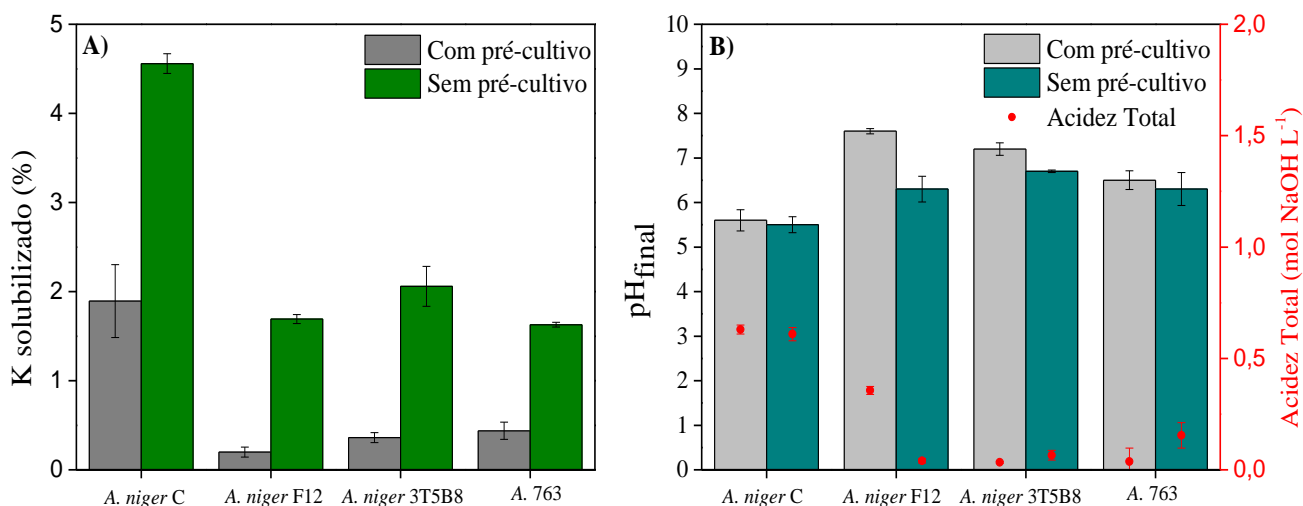
#### 4.3.1 Seleção do microrganismo solubilizador de rocha potássica

Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* sp. são conhecidos na literatura como excelentes produtores de ácidos orgânicos, sendo considerados potenciais solubilizadores de rochas ou de minerais presentes no solo (Meena et al., 2016; Yang et al., 2017). Entretanto, podem existir diferenças entre cepas de *Aspergillus* do mesmo gênero. Por esta razão, neste trabalho foram avaliadas quatro cepas de *Aspergillus* a fim de se obter a melhor cepa solubilizadora de K (Figura 11).

A Figura 11A apresenta o potássio solubilizado a partir de diferentes cepas de microrganismos. As quatro cepas fúngicas utilizadas neste trabalho foram capazes de solubilizar o K presente na  $RK_{\text{Feldspato}}$ , obtendo percentuais solubilizados nos cultivos com e sem pré-cultivo, respectivamente, para o *A. niger* C de 1,89 e 4,56%, *A. niger* F12 de 0,20 e 1,69%, *A. niger* 3T5B8 de 0,36 e 2,06% e *A. 763* de 0,44 e 1,63%. A solubilização se mostrou

mais eficiente nos ensaios em que o cultivo foi realizado sem a etapa de pré-cultivo. No entanto, os percentuais obtidas pelas cepas *A. niger* F12, *A. niger* 3T5B8 e *A. 763*, sem a etapa de pré-cultivo, não diferiram significativamente entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). O mesmo acontece com os resultados obtidos pelas mesmas cepas com a etapa de pré-cultivo. Já a cepa *A. niger* C, em ambos os ensaios, apresentou valores superiores de solubilização, e diferentes significativamente quando comparados aos demais ensaios. A maior solubilização observada nestes ensaios está associada ao aumento da acidez total do meio pela provável produção de ácidos orgânicos, que resulta na redução do pH do meio. Este efeito ocorreu mais intensamente com a cepa *A. niger* C e pode ser observada na Figura 11B.

**Figura 11** - Solubilização biológica a partir de diferentes microrganismos em cultivo submerso, com e sem a etapa de pré-cultivo em meio Aleksandrov, 1% de glicose como fonte de carbono, 2% de  $RK_{\text{Feldspato}}$  (m/v), pH 7,0, em 96 h, 30°C e 220 rpm. A) Percentual de K solubilizado por diferentes microrganismos; B)  $pH_{\text{inicial}}$  e acidez total final nos cultivos de diferentes microrganismos.



Fonte: autoria própria.

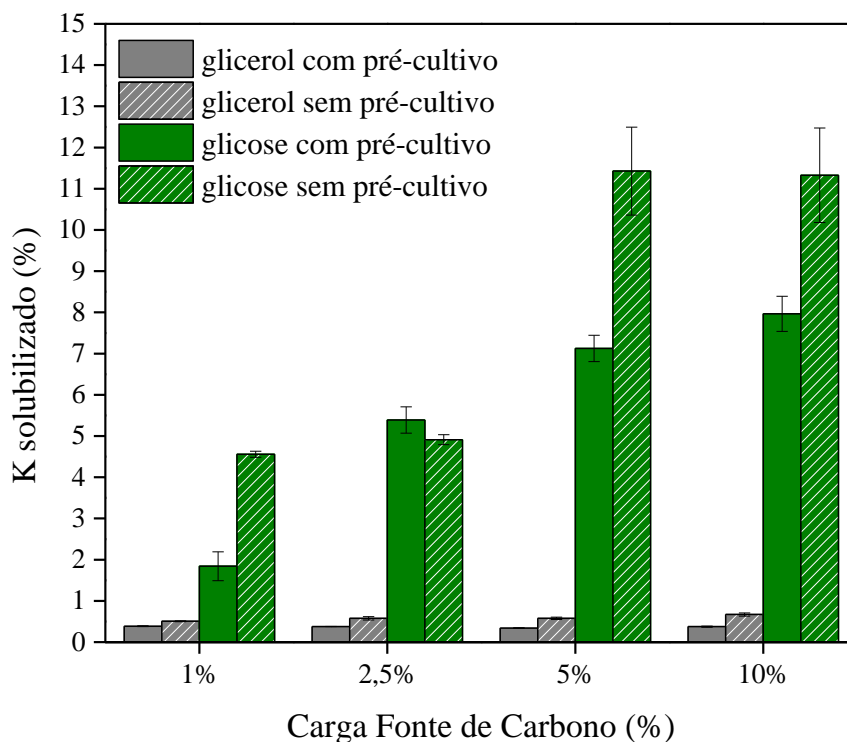
Outros trabalhos já evidenciaram o potencial de solubilização da cepa de *A. niger* C na solubilização de minerais. Klaic et al. (2017) realizaram uma triagem com oito cepas fúngicas a fim de escolher o microrganismo com maior poder de solubilização de rocha fosfática por cultivos submerso e cultivo em estado sólido. Em ambos os cultivos, as cepas *A. niger* C, *A. niger* 3T5B8 e *A. niger* 11T53A14 se destacaram quanto à solubilização do fosfato. Entretanto, o *A. niger* C apresentou os melhores resultados de solubilização em cultivo submerso, conseguindo solubilizar cerca de 40% do fósforo adicionado ao meio. Este microrganismo também foi eficiente para solubilizar rocha fosfática de origem ígnea (Klaic et al., 2018) e promover a oxidação de enxofre elementar (Guimarães et al., 2018).

Com base nesses resultados, o *A. niger C* foi selecionado como o microrganismos com maior potencial para promover a solubilização biológica de rocha potássica entre as cepas fúngicas avaliadas. Para entender melhor o processo de solubilização biológica via CSm e melhorar a solubilização do K proveniente da  $RK_{\text{Feldspato}}$ , o efeito de algumas variáveis de cultivo microbiano, como a concentração e o tipo de fonte de carbono e o  $\text{pH}_{\text{inicial}}$  do meio de cultivo foram avaliados.

#### **4.3.2 Avaliação da concentração e do tipo de fontes de carbono na solubilização biológica de K**

A produção de ácidos orgânicos no meio de cultivo é considerada a principal rota de solubilização das RKs. Neste sentido, o tipo e a concentração da fonte de carbono utilizada no cultivo submerso desempenham um papel essencial para estimular o acúmulo destes metabólitos no meio (Magalhães et al., 2019; Shanware et al., 2014). Assim, a Figura 12 apresenta o efeito das diferentes fontes de carbonos avaliadas neste trabalho na solubilização da  $RK_{\text{Feldspato}}$ . O glicerol não se mostrou uma fonte de carbono eficiente e, também, não apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os percentuais de K solubilizados, sendo os maiores percentuais de K obtidos para a concentração de 10% de glicerol equivalentes a 0,38 e 0,67%, com e sem pré-cultivo, respectivamente. Para a glicose como fonte de carbono, os melhores resultados ocorreram para as concentrações de 5% (7,12 e 11,42%, com e sem pré-cultivo, respectivamente) e 10% (7,96 e 11,32%, com e sem pré-cultivo, respectivamente).

**Figura 12** - Percentual de K solubilizado a partir de diferentes fontes de carbono, glicose e glicerol, por cultivo submerso em meio Aleksandrov, com e sem a etapa de pré-cultivo, 2% de  $RK_{\text{Feldspato}}$ ,  $\text{pH}_{\text{inicial}}$  7,0, 96 h, 30°C e 220 rpm



**Fonte:** autoria própria.

A solubilização da  $RK_{\text{Feldspato}}$  está diretamente ligada ao aumento da acidez do meio e consequente redução do pH, como pode ser observado na Tabela 5. Para as maiores solubilizações com glicerol os valores de  $\text{pH}_{\text{final}}$  apresentaram-se mais próximos à neutralidade. Em contrapartida, a glicose apresentou valores de  $\text{pH}_{\text{final}}$  mais ácidos, variando entre 3,59 e 4,92. A associação entre acidez do meio e taxa de solubilização de K foi evidenciada no trabalho Lopes-Assad *et al.* (2006) no qual foi destacado que a acidificação do meio promovida pelo *A. niger* (CCT- 4355) favoreceu a solubilidade das rochas potássicas ultramáfica alcalina e flogopitito.

**Tabela 5** - Efeito das fontes de carbono na solubilização biológica da rocha potássica em termos de pH<sub>final</sub> e acidez total

Ensaio	Concentração	Glicerol		Glicose	
		pH <sub>final</sub>	Acidez Total (mol NaOH L <sup>-1</sup> )	pH <sub>final</sub>	Acidez Total (mol NaOH L <sup>-1</sup> )
Com pré-cultivo	1%	7,44 ± 0,16	0,02 ± 0,01	5,6 ± 0,24	0,47 ± 0,01
	2,5%	7,34 ± 0,05	0,02 ± 0,01	5,10 ± 0,04	2,10 ± 0,25
	5%	7,45 ± 0,04	0,02 ± 0,01	4,92 ± 0,18	3,85 ± 0,74
	10%	7,53 ± 0,04	0,01 ± 0,01	4,72 ± 0,02	4,36 ± 0,11
Sem pré-cultivo	1%	7,23 ± 0,08	0,01 ± 0,01	5,50 ± 0,18	0,61 ± 0,03
	2,5%	6,72 ± 0,23	0,05 ± 0,03	5,15 ± 0,04	3,25 ± 0,25
	5%	6,77 ± 0,11	0,04 ± 0,01	4,11 ± 0,02	9,61 ± 0,39
	10%	6,13 ± 0,04	0,06 ± 0,01	3,59 ± 0,01	23,52 ± 0,96

Fonte: autoria própria.

A glicose se destacou em alguns trabalhos da literatura que avaliaram o efeito de diferentes fontes de carbono para solubilização de rochas potássicas e fosfáticas (Parmar e Sindhu, 2013; Yadav et al., 2011), o que corrobora os resultados obtidos nesta etapa, em que a solubilização utilizando glicose como fonte de carbono se mostrou mais eficiente. Em outros trabalhos, o glicerol apresentou resultados promissores como fonte carbono na solubilização de rochas fosfáticas (Vassilev et al., 2017, 2012). No entanto, ainda existe pouca informação disponível sobre a produção fúngica de ácidos orgânicos a partir do glicerol (Nicol et al., 2012; Sterflinger, 2000). O baixo desempenho do glicerol nesta etapa se deve, muito provavelmente, ao fato de que para sua assimilação no ciclo de Krebs é necessário a conversão do mesmo em glicose, através de uma via metabólica denominada gliconeogênese. Esse processo requer o dobro de energia, uma vez que algumas das reações desta via são reversíveis e necessitam de enzimas diferentes das usadas na via glicolítica. Estes fatores prejudicam a produção de ácidos orgânicos a partir do glicerol, reduzindo assim a acidez do meio e a solubilização das rochas potássicas. Em contrapartida, a glicose é mais facilmente assimilada no metabolismo microbiano através da glicólise e ciclo de Krebs, produzindo mais ácidos orgânicos comparado ao glicerol (Bini et al., 2016; Moat et al., 2002).

Por fim, para escolha da concentração de glicose a ser utilizada nos próximos ensaios, é importante salientar que os resultados obtidos para os ensaios de 5 e 10% de glicose, com e sem a etapa de pré-cultivo, apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparados aos demais ensaios, no entanto, não diferiram entre si. Ou seja, em ambas as etapas,



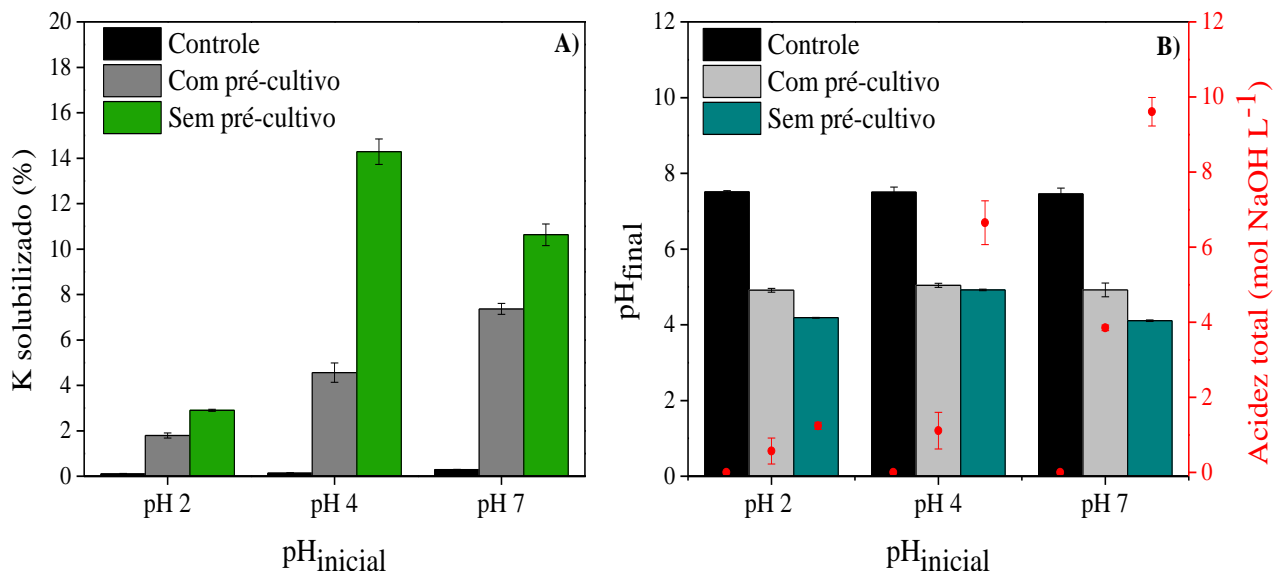
não há uma diferença significativa na solubilização relacionada ao aumento da concentração da fonte de carbono. Com base nesses resultados, a concentração de 5% de glicose foi escolhida para dar prosseguimento na avaliação do efeito do  $\text{pH}_{\text{inicial}}$  do meio de cultivo no processo de solubilização biológica da  $\text{RK}_{\text{Feldspato}}$ .

#### 4.3.3 Avaliação do efeito do $\text{pH}_{\text{inicial}}$ de cultivo na solubilização biológica de K

O pH do meio de cultivo influencia diretamente o crescimento dos microrganismos e os processos bioquímicos realizados por eles. Em muitos casos, a acidificação do meio é um dos principais mecanismos envolvidos na solubilização de minerais e isso ocorre porque a concentração de hidroxilas e de íons de hidrogênio exercem um efeito importante na atividade desses microrganismos e também na disponibilidade dos nutrientes (Gaind and Gaur, 1989; Marra et al., 2015). Portanto, para avaliar a influência do  $\text{pH}_{\text{inicial}}$  do meio de cultivo na solubilização da RK, três valores iniciais de pH de meio de cultivo foram avaliados nesta etapa.

A Figura 13 apresenta os percentuais de K solubilizado (Figura 13A) e os valores de  $\text{pH}_{\text{final}}$  e acidez total (Figura 13B) ao fim dos ensaios nos diferentes  $\text{pH}_{\text{inicial}}$  avaliados. Ao observar a Figura 13A foi possível notar que a ordem de solubilização de K, nos ensaios com a etapa de pré-cultivo, foi  $\text{pH}_{\text{inicial}} 7 (7,36\%) > \text{pH}_{\text{inicial}} 4 (4,56\%) > \text{pH}_{\text{inicial}} 2 (1,79\%)$ . Enquanto que para os ensaios sem a etapa de pré-cultivo,  $\text{pH}_{\text{inicial}} 4 (14,29\%) > \text{pH}_{\text{inicial}} 7 (10,63\%) > \text{pH}_{\text{inicial}} 2 (2,90\%)$ . A Figura 13B apresenta os valores de acidez total e  $\text{pH}_{\text{final}}$  dos ensaios no qual é possível visualizar que o  $\text{pH}_{\text{final}}$  dos ensaios ficou entre 4 – 5 e os maiores valores de acidez total ocorreram nos ensaios com  $\text{pH}_{\text{inicial}} 7$  e 4, respectivamente, nos ensaios sem a etapa de pré-cultivo.

**Figura 13** - Avaliação do efeito do  $\text{pH}_{\text{inicial}}$  na solubilização da  $\text{RK}_{\text{Feldspato}}$ , com e sem a etapa de pré-cultivo em meio Aleksandrov, 5% de glicose como fonte de carbono, 2% de  $\text{RK}_{\text{Feldspato}}$  (m/v), em 96 h, 30°C e 220 rpm. A) Percentual de K solubilizado; B) pH e acidez total final nos cultivos com diferentes  $\text{pH}_{\text{inicial}}$



Fonte: autoria própria.

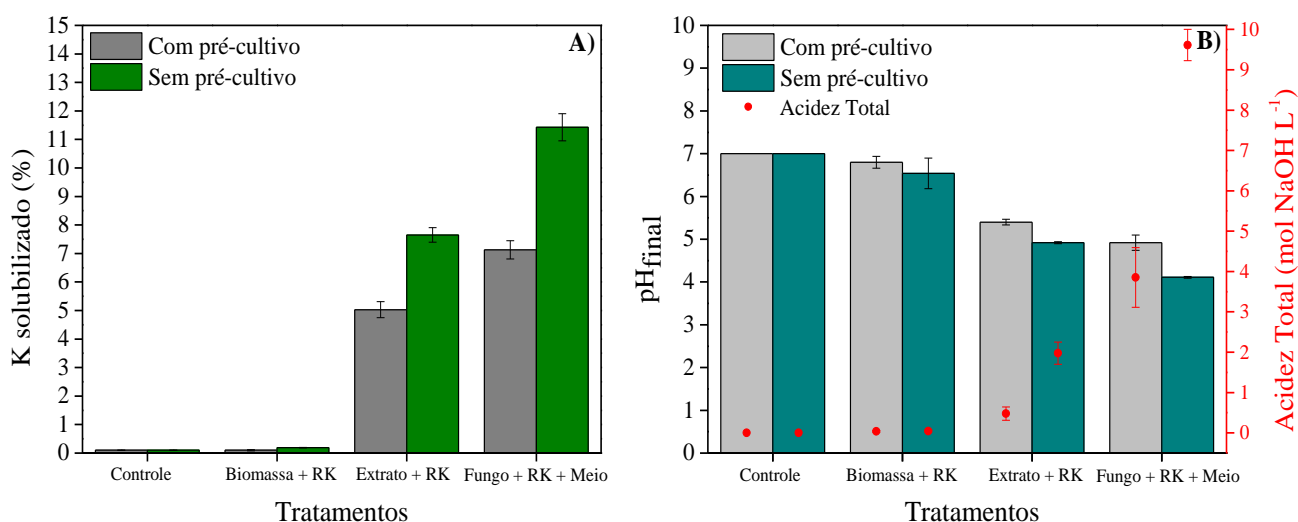
Diversos metabólitos podem ser produzidos ao longo do cultivo microbiano (Sattar et al., 2019) e, conseqüentemente, aumentar a acidez total do meio. No entanto, o tipo de metabólito produzido pode apresentar um maior ou menor potencial para promoção da solubilidade da RK. Logo, os resultados obtidos nesta etapa sugerem que a modificação do  $\text{pH}_{\text{inicial}}$  do meio de cultivo influenciou positivamente na solubilidade do K contido na rocha. Ao modificar o  $\text{pH}_{\text{inicial}}$  para 4 foi possível observar um ganho de solubilidade de cerca de 20%, para o ensaio sem a etapa de pré-cultivo, quando comparado ao percentual obtido para 5% de glicose em  $\text{pH}_{\text{inicial}}$  7 (Seção 4.3.2, Figura 12). Neste contexto, sugere-se o aumento da solubilização da RK pode ser relacionado ao provável acúmulo de ácido oxálico produzido pela cepa *A. niger* C. Uma vez que a literatura relata que a produção microbiana de ácido oxálico ocorre mais intensamente nessa faixa de pH (Ruijter et al., 1999; Rymowicz and Lenart, 2003; Strasser et al., 1994). Outro fator que reforça essa suposição são os resultados obtidos na etapa de dissolução (Seção 4.2, Figura 8C), que evidenciaram que dentre os ácidos avaliados o oxálico possui um maior potencial para dissolução da  $\text{RK}_{\text{Feldspato}}$ .

Portanto, para dar seqüência a etapa de cinética de solubilização foi definido  $\text{pH}_{\text{inicial}}$  4 para o cultivo submerso. A cinética de solubilização da  $\text{RK}_{\text{Feldspato}}$  foi realizada sem a etapa de pré-cultivo, haja vista que ao longo deste trabalho os ensaios sem esta etapa apresentaram os maiores percentuais de solubilização de K.

#### 4.3.4 Avaliação do efeito da interação do microrganismo-rocha na solubilização de K

Para avaliar o efeito da interação do microrganismo-rocha na solubilização de K foram propostas quatro condições de estudo: “Controle” (água + RK), “Biomassa + RK”, “Extrato + RK” e “Fungo + RK + Meio”. Todos os tratamentos foram realizados com ou sem a etapa de pré-cultivo. A Figura 14 apresenta o teor de K solubilizado (Figura 14A) nos diferentes tratamentos avaliados e seus respectivos  $pH_{final}$  e acidez total final (Figura 14B). Os resultados mostraram que apenas os tratamentos “Biomassa + RK” não diferiram significativamente do controle ( $p < 0,05$ ), o que indica que o efeito da abrasividade das células inativadas é desprezível na ação de solubilização da rocha. Os tratamentos “Fungo + RK + Meio” (com pré-cultivo) e “Extrato líquido + RK” (sem pré-cultivo) também não apresentaram diferenças significativas de K solubilizados entre si, ou seja, a presença do fungo no ensaio causou um efeito similar na solubilização do K ao produzido pelo extrato líquido, e isso está relacionado ao  $pH_{final}$  (Figura 14B) semelhante apresentado por ambos. Em contrapartida, ambos os ensaios do tratamento “Fungo + RK + Meio” se sobressaíram com relação aos demais, apresentando os maiores percentuais de K solubilizado e os maiores valores de acidez total.

**Figura 14** - Avaliação do efeito da interação entre microrganismo-rocha na solubilização de K. A) Percentual de K solubilizado a partir de diferentes tratamentos, por cultivo submerso em meio Aleksandrov e 5% de glicose, 2%  $RK_{Feldspato}$ ,  $pH_{inicial}$  7,0, 96 h, 30°C e 220 rpm; B) pH e acidez total final dos diferentes tratamentos avaliados



Fonte: autoria própria.

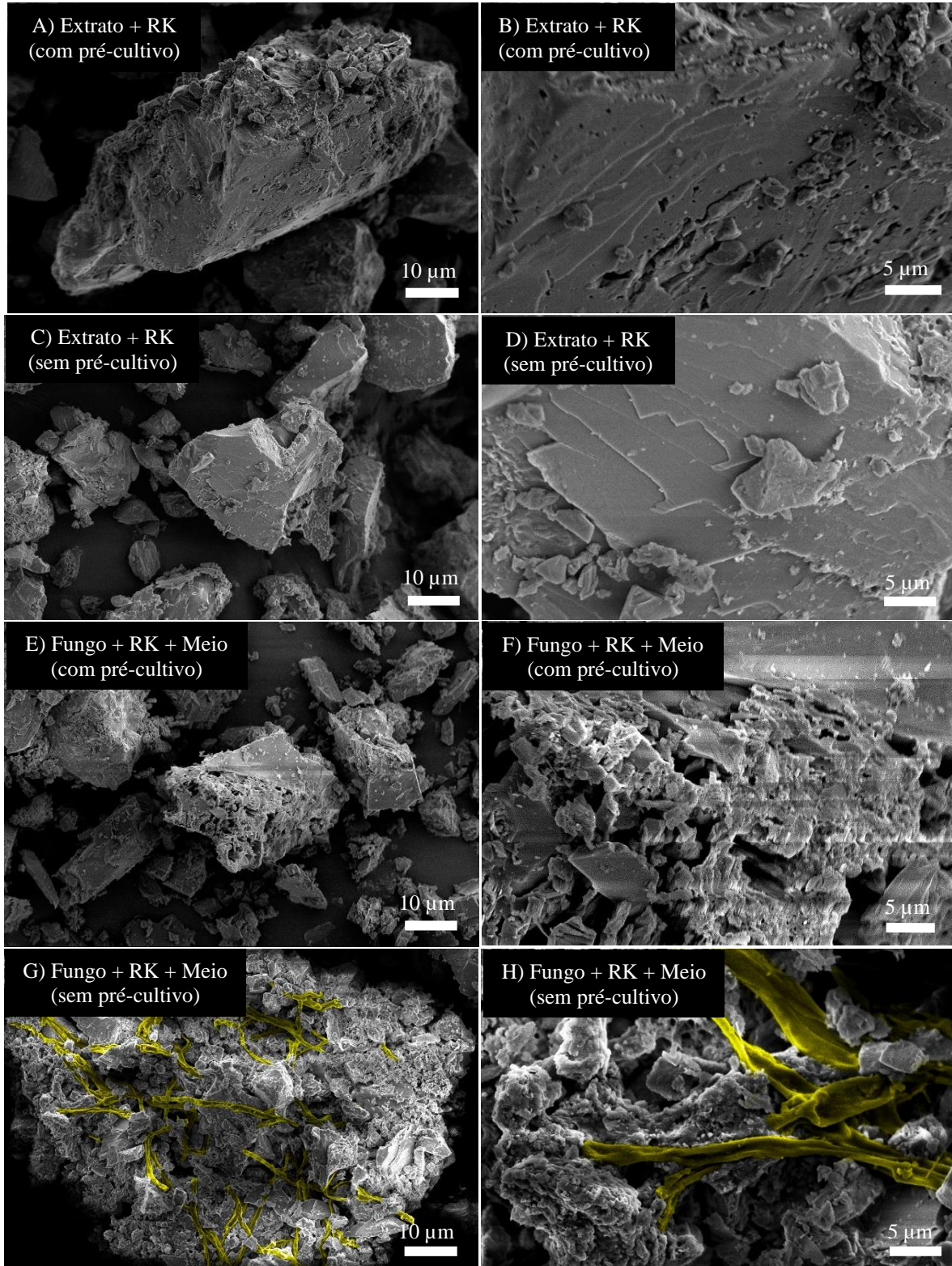
Os resultados obtidos nesta etapa indicam os principais mecanismos envolvidos na solubilização biológica da  $RK_{Feldspato}$ . Os tratamentos referentes ao “Extrato líquido + RK” evidenciam o efeito dos ácidos orgânicos produzidos pelo microrganismo no extrato líquido.

As moléculas dos ácidos orgânicos influenciam na solubilização de K a partir de três ações distintas: aderência à superfície mineral e extração dos nutrientes das partículas minerais por reação de transferência de elétrons, quebra das ligações de oxigênio e formação de íons quelatados na solução através de seus grupos carboxila e hidroxila, criando um gradiente entre as concentrações de cátion e ânion na solução (Sattar et al., 2019). Este efeito pode ser observado na Figura 15, a partir da morfologia da rocha após os tratamentos. O ataque ácido, em ambos os tratamentos (Figura 15, A-D), modificou a estrutura da rocha através de desgaste superficial e do aparecimento de pequenas fissuras em comparação com a  $RK_{\text{Feldspato}}$  natural (Figura 5B).

Por outro lado, os tratamentos referentes ao “Fungo + RK + Meio” sugerem que a interação física entre microrganismo e rocha possui uma grande influência na solubilização do K. A literatura relata que os fungos não apenas possuem a capacidade de se ligar à superfície de minerais, como também conseguem penetrar os poros de aglomerados de partículas de rochas durante o crescimento das hifas (Figura 15 G-H). As forças físicas causadas por essa interação são capazes de fragmentar partes do mineral, diminuindo o tamanho das partículas e gerando superfícies mais reativas (Jongmans et al., 1997; Lian et al., 2008; Song et al., 2015a). Além disso, outro mecanismo possível se dá pela produção de polissacarídeos extracelulares e outras substâncias poliméricas, também secretadas pelos fungos, que são capazes de criar um microambiente onde os ácidos orgânicos podem ser concentrados, facilitando a adesão das hifas fúngicas à superfície do mineral (Lian et al., 2008). Neste contexto, é possível afirmar que a adesão das hifas e a consequente alteração superficial (Figura 15 E-F) indicam que o *A. niger* C afeta significativamente o intemperismo e a liberação dos elementos da  $RK_{\text{Feldspato}}$ .

O efeito benéfico da interação entre o microrganismo e a RK é nítido ao se comparar os teores de K solubilizados nos diferentes tratamentos avaliados. Para os tratamentos referentes aos ensaios com a etapa de pré-cultivo foi possível observar um aumento de 30% na solubilização de K na presença do microrganismo. O mesmo ocorreu para os ensaios sem a etapa de pré-cultivo, em que o aumento foi cerca de 33% para os experimentos com o microrganismo. Além disso, ao comparar os percentuais obtidos nos ensaios de solubilização biológica (14,29% de K em 4 dias) com os percentuais obtidos a partir dos ensaios com os ácidos orgânicos (Seção 4.2), onde a maior solubilização da  $RK_{\text{Feldspato}}$  ocorreu em ácido oxálico (20%) em 25 dias, é possível afirmar que o processo de solubilização biológica tem sido capaz de acelerar a solubilização da  $RK_{\text{Feldspato}}$ .

**Figura 15** - Micrografias por microscópio eletrônico de varredura (MEV) da  $RK_{Feldspato}$  após diferentes tratamentos. A-B)  $RK_{Feldspato}$  após tratamento “Extrato líquido + RK” (com pré-cultivo); C-D)  $RK_{Feldspato}$  após tratamento “Extrato líquido + RK” (sem pré-cultivo); E-F)  $RK_{Feldspato}$  após tratamento “Fungo + RK + Meio” (com pré-cultivo); G-H)  $RK_{Feldspato}$  após tratamento “Fungo + RK + meio” (sem pré-cultivo)



Fonte: autoria própria.



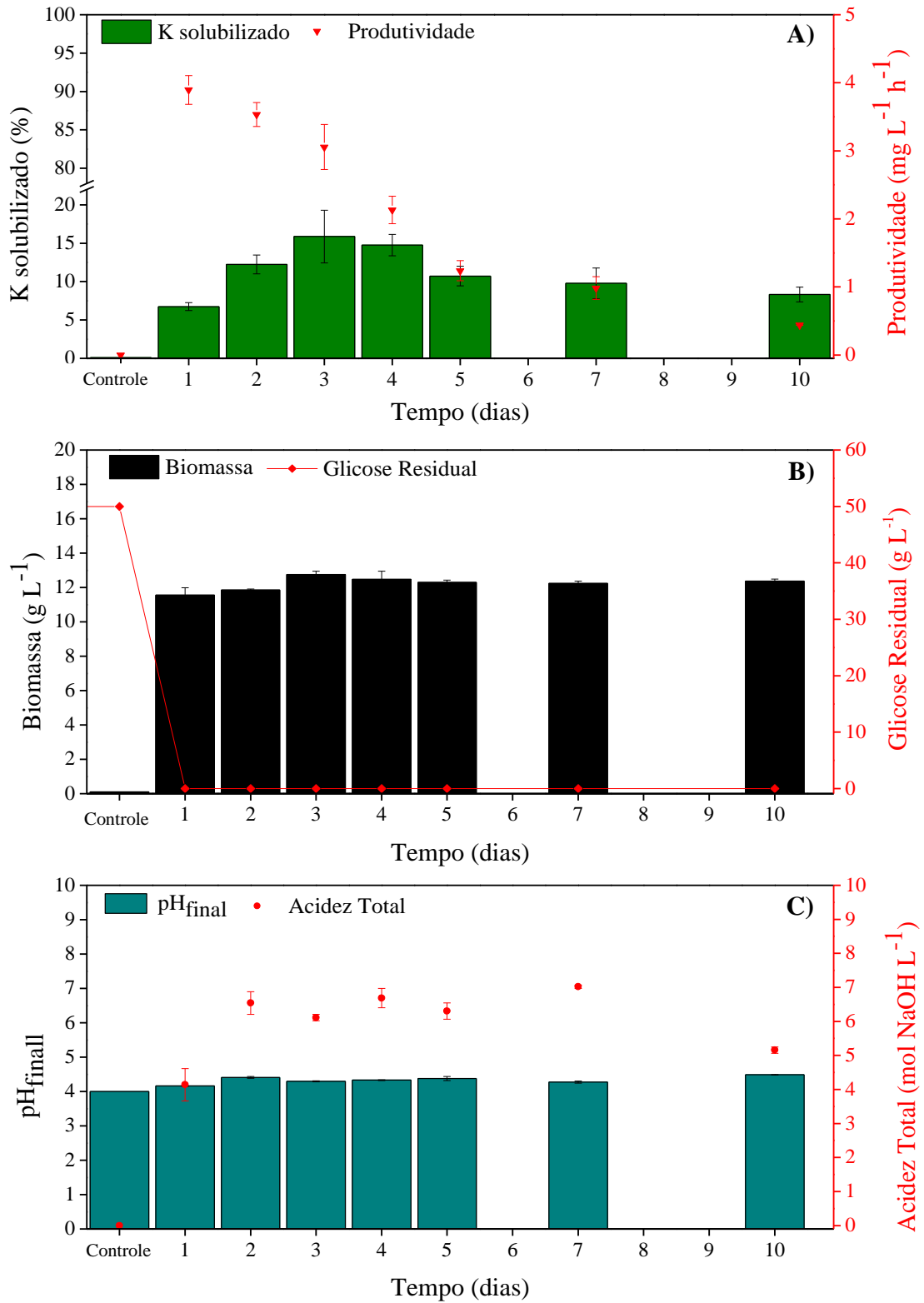
Portanto, a partir dos ensaios realizados até a presente etapa o *A. niger* C, a fonte de carbono glicose a 5%, o pH<sub>inicial</sub> 4 e cultivo sem a etapa de pré-cultivo foram selecionados como os melhores parâmetros de solubilização do K presente na RK. Estes parâmetros foram utilizados para avaliar a cinética de solubilização da RK<sub>Feldspato</sub>.

#### 4.3.5 Cinética de Solubilização da RK<sub>Feldspato</sub>

A Figura 16 apresenta a cinética de solubilização biológica da RK<sub>Feldspato</sub> em 10 dias. Monitorar a cinética de solubilização biológica da rocha potássica é uma etapa importante para entender como o microrganismo influencia a solubilização do K ao longo do tempo. Neste processo, a máxima solubilização de K alcançada foi de 15,87% (Figura 16A) e ocorreu no terceiro dia de cinética. Já a produtividade apresentou um perfil de decaimento ao longo dos 10 dias avaliados, sendo o maior valor referente ao dia 1 (3,89 mg L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>). A glicose (Figura 16 B) adicionada ao meio de cultivo foi completamente consumida como o esperado. No entanto, o consumo ocorreu de forma rápida, já no primeiro dia de cinética. A produção de biomassa (Figura 16B) variou entre 11,55 – 12,47 g L<sup>-1</sup>. E, por fim, o pH<sub>final</sub> (Figura 16C) manteve-se entre 4,2 e 4,5 ao longo dos dias avaliados e a acidez total média variou entre 4,13 e 7,02 mol NaOH L<sup>-1</sup>.

O processo de solubilização biológica acelerou a solubilização do K em um pequeno intervalo de dias, se comparado ao tempo dos ensaios de dissolução em ácidos orgânicos (Figura 8, Seção 4.2) e isso se deu, provavelmente, pelo sinergismo existente entre o “Fungo + RK + Meio” (Figura 15 G-H). Os percentuais de solubilização obtidos nesta etapa são bastante interessantes quando comparados a outros trabalhos da literatura que utilizam RKs. Lian et al. (2008) realizaram a cinética de solubilização de uma rocha K-feldspato, semelhante à utilizada neste trabalho, e em 30 dias obtiveram uma máxima solubilização de 8,81% de K. Song et al. (2015b) alcançaram 1,82% de K solubilizado ao longo de uma cinética de 15 dias a partir da RK moscovita. Por sua vez, Xue et al. (2018), ao avaliar a cinética de solubilização de diversas RKs, obtiveram os seguintes percentuais de solubilização, biotita (6,27%) > ilita (3,87%) > moscovita (1,93%) > feldspato (1,27%) > nefelina (1,12%).

**Figura 16** - Cinética de solubilização da  $RK_{Feldspato}$  em meio Aleksandrov, 5% de glicose como fonte de carbono, 2% de  $RK_{Feldspato}$  (m/v),  $pH_{inicial}$  4, 30°C e 220 rpm. A) Percentual do K solubilizado e perfil da produtividade; B) Perfil de biomassa produzida e glicose residual; C)  $pH_{final}$  e acidez total final



Fonte: autoria própria.

Portanto, o estudo da cinética de solubilização mostrou que a máxima solubilização da  $RK_{\text{Feldspato}}$  foi de 15,87% em três dias de cultivo. Embora esse resultado seja superior a muitos trabalhos da literatura (Lian et al., 2008; Lopes-Assad et al., 2006; Song et al., 2015b; Xue et al., 2018), a solubilização da RK ainda é considerada baixa mesmo após a seleção do microrganismo e o estudo e otimização das variáveis de cultivo concentração e tipo de fonte de carbono e  $pH_{\text{Inicial}}$ . Portanto, o efeito do pré-tratamento da rocha potássica foi avaliado na etapa a seguir como uma estratégia para aumentar/potencializar a solubilização do potássio.

#### **4.3.6 Efeito do pré –tratamento da rocha potássica na cinética de solubilização biológica**

Embora os ácidos orgânicos proporcionem um aumento de solubilidade do K comparado ao efeito da água, a dissolução do K na  $RK_{\text{Feldspato}}$  não ultrapassou o teor de 20,05% nos experimentos de solubilização da Seção 4.2 (Figura 8C). O aumento da concentração de ácido também não influenciou significativamente a quantidade total de K solubilizada da  $RK_{\text{Feldspato}}$  (Figura 8 E-F). E isso ocorre principalmente pelas características físicas apresentadas por esta RK que é considerada de uma rocha de baixa solubilidade (Seção 4.1).

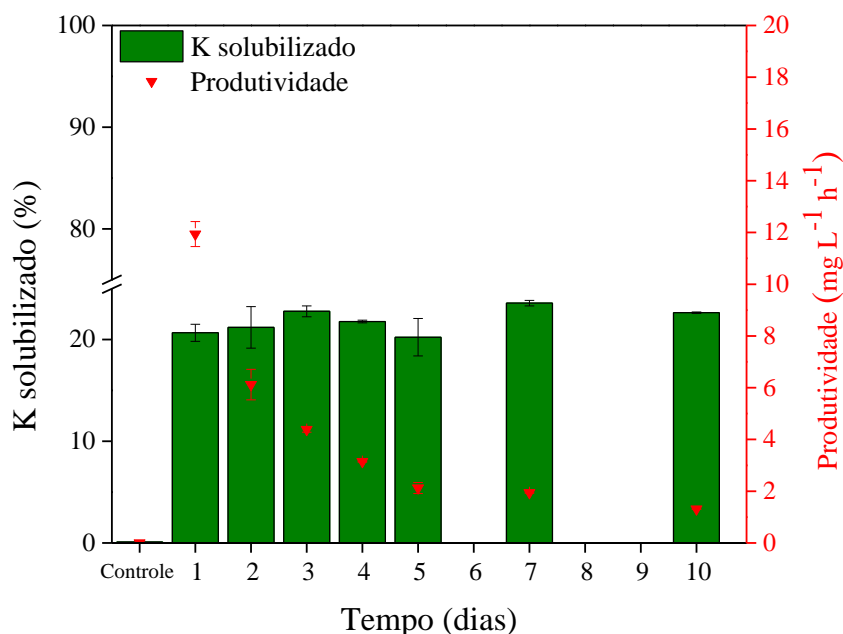
Nesse contexto, visando o aumento da solubilidade da RK, a literatura relata que os ácidos orgânicos, o pH e o pré-tratamento da rocha (através da temperatura ou ativação mecânica) são estratégias que influenciam diretamente a liberação dos nutrientes presentes nos minerais (Skorina and Allanore, 2015). Dentre essas estratégias, o efeito do pH (Seção 4.3.3) e dos ácidos orgânicos (Seção 4.2) foram avaliados neste trabalho anteriormente. Já o efeito do pré-tratamento em rochas potássicas como estratégia para potencializar a solubilização biológica do K ainda é pouco explorado na literatura. Portanto, nesta etapa do trabalho avaliou-se o efeito da ativação mecânica da RK, por processo de moagem, como uma estratégia de pré-tratamento. É importante salientar que a ativação mecânica é um processo que tem ganhado destaque na literatura, uma vez que comparados a outros, como o uso de temperaturas, é considerado simples, de baixo custo, baixo gasto energético e não gera resíduos químicos, sendo considerado ambientalmente seguro (Singh et al., 2019; Skorina and Allanore, 2015).

A Figura 17 apresenta o perfil da cinética de solubilização da  $RK_{\text{Feldspato}}$  após o pré-tratamento de moagem juntamente com a produtividade do processo. A solubilização máxima do K contido na  $RK_{\text{Feldspato}}$  foi de 23,57% alcançada no sétimo e décimo dia de cultivo. Entretanto, no primeiro dia de cultivo a quantidade de K solubilizado foi de 20,66%, isto mostra que a solubilização manteve constante em torno de 20 – 23% ao longo dos 10 dias avaliados. Logo, observa-se que utilizando a  $RK_{\text{Feldspato}}$  com pré-tratamento a solubilização aumentou de



15% para 20% já no primeiro dia de cinética, um aumento de 35% na quantidade de K solubilizado. Além disso, a maior solubilização no primeiro dia reduziu dois dias de cultivo, se comparado com a cinética da rocha natural, o que proporciona um aumento na produtividade de K solubilizado. A produtividade do processo utilizando a rocha potássica com pré-tratamento teve seu valor máximo no primeiro dia ( $11,93 \text{ mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ), e foi aproximadamente três vezes superior ao processo utilizando a rocha potássica sem pré-tratamento. No dia 10, os valores de  $\text{pH}_{\text{final}}$  (4,49), acidez total final ( $4,92 \text{ mol NaOH L}^{-1}$ ), biomassa ( $8,06 \text{ mg L}^{-1}$ ) e glicose residual ( $< 0,01 \text{ g L}^{-1}$ ) foram medidos, valores semelhantes ao processo utilizando a rocha potássica natural.

**Figura 17** - Percentual de K solubilizado na cinética de solubilização da  $\text{RK}_{\text{Feldspato}}$  moída, 5% de glicose como fonte de carbono, 2% de  $\text{RK}_{\text{Feldspato}}$  (m/v),  $\text{pH}_{\text{inicial}}$  4,  $30^\circ\text{C}$  e 220 rpm

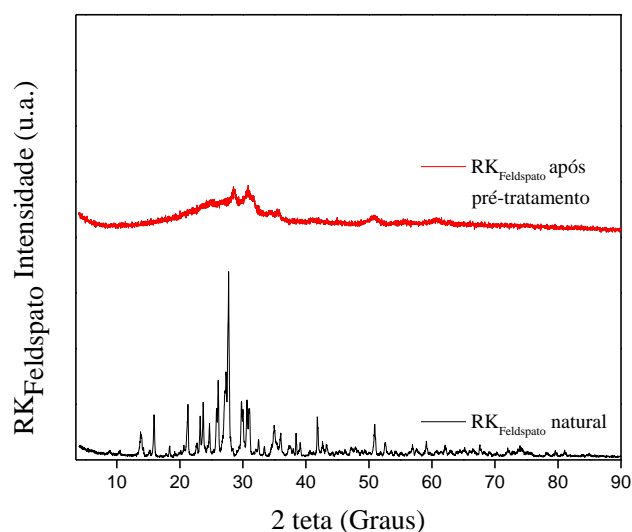


Fonte: autoria própria.

De modo geral, o pré-tratamento realizado na RK proporcionou um aumento de 35% na solubilidade do K, se comparado a cinética com a RK natural. Este aumento se deve a fragmentação da partícula, fazendo com que o K retido na matriz sílica-alumina seja liberado devido a desordem estrutural causada ao sistema. Isso porque a ativação mecânica promove a redução do tamanho de partícula da RK aumentando a área superficial do material e, além disso, quebra as ligações presentes na rede cristalina do mineral resultando assim em um material amorfo (Baláž, 2003; Skorina and Allanore, 2015). O aumento no grau de amorficidade da  $\text{RK}_{\text{Feldspato}}$  foi comprovado realizando uma análise de DRX após o pré-tratamento. A Figura 18 apresenta os padrões de DRX da  $\text{RK}_{\text{Feldspato}}$  após a ativação mecânica em comparação com a

natural, em que é possível observar a consequente amortização dos picos da rocha moída após o pré-tratamento de moagem. Além disso, a RK após o pré-tratamento apresentou uma área superficial de  $6,83 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , cerca de 2,5 vezes maior que a área superficial da RK natural. O aumento na área superficial em consequência da redução de tamanho de partícula promove uma maior interação das partículas de rocha com o microrganismo e com os ácidos orgânicos presente no meio, aumentando assim a solubilização da RK.

**Figura 18** - Padrões de DRX da  $\text{RK}_{\text{Feldspato}}$  natural e  $\text{RK}_{\text{Feldspato}}$  após o pré-tratamento



Fonte: autoria própria.

É possível afirmar que os resultados obtidos nesta etapa são promissores com relação ao aumento da solubilidade da  $\text{RK}_{\text{Feldspato}}$ , uma vez que a avaliação da ativação mecânica como estratégia de pré-tratamento para solubilização do K a partir de rochas silicatadas não é muito reportada na literatura. No entanto, alguns trabalhos tem investigado a influência da ativação mecânica na dissolução/solubilização de rochas ricas em minerais fertilizantes do solo (Klaic et al., 2018; Petrovich, 1981; Singh et al., 2019; Teodosieva and Bojinova, 2016). Estes trabalhos indicam que a área específica, o tamanho de partícula e o tempo de moagem influenciam significativamente na liberação dos nutrientes das rochas, sendo assim necessário a investigação desses parâmetros para potencializar a solubilidade da RK.

Por fim, é importante salientar que a etapa de solubilização biológica, com ênfase na solubilização a partir da  $\text{RK}_{\text{Feldspato}}$  moída, foi capaz de superar os valores de percentuais de liberação do K obtidos na etapa de dissolução das RKs em ácidos orgânicos. A potencialização da liberação do K, juntamente com a aceleração da dissolução da mesma nesta etapa evidencia o efeito benéfico da ação do fungo filamentosos *A. niger* C neste processo.

## 5 CONCLUSÕES

Nas últimas décadas, houve um crescente interesse na busca por estratégias eficientes para a solubilização do K insolúvel presente nos solos a partir do uso de microrganismos promotores de solubilização. Essas estratégias são interessantes, principalmente, quando se utiliza rochas de origem ígnea por sua alta disponibilidade no solo e sua baixa solubilidade. Neste contexto, o melhor entendimento dos mecanismos de dissolução das RKs via ácidos orgânicos e o desenvolvimento de estratégias para potencializar a solubilização biológica do K via cultivo submerso são algumas das contribuições deste estudo. Assim, pelos resultados obtidos neste trabalho e a partir dos objetivos propostos foi possível concluir:

- As rochas modelos, rocha 1 (Polihalita -  $RK_{\text{Polihalita}}$ ) e rocha 2 (K-Feldspato -  $RK_{\text{Feldspato}}$ ), utilizadas neste trabalho apresentaram diferentes perfis de dissolução devido as características físicas e químicas de suas composições. Os ácidos orgânicos influenciam significativamente apenas na dissolução do K da  $RK_{\text{Feldspato}}$  e, mesmo assim, esta RK apresentou os menores valores de dissolução de K se comparada a  $RK_{\text{Polihalita}}$  e ao controle. O maior percentual de dissolução da obtido para a  $RK_{\text{Feldspato}}$  ocorreu em o ácido oxálico (20,05% após 25 dias), sendo aproximadamente cinco vezes maior do que o obtido em água e duas vezes maior que nos ácidos glucônico, cítrico e clorídrico, o que evidencia o potencial do ácido oxálico frente aos outros ácidos.
- Neste âmbito, dada a baixa solubilidade de K apresentada, a  $RK_{\text{Feldspato}}$  foi a utilizada na etapa de solubilização biológica afim de potencializar sua solubilização. Dentre as variáveis estudadas nesta seção, o microrganismo *A. niger* C, 5% de glicose como fonte de carbono e o  $pH_{\text{inicial}}$  4 no cultivo submerso influenciaram significativamente no aumento da solubilidade da  $RK_{\text{Feldspato}}$  e foram as variáveis selecionadas para a realização da cinética de solubilização da  $RK_{\text{Feldspato}}$ . Outro fator importante observado foi o efeito da interação física entre o microrganismo e a rocha, responsável por aumentar cerca de 33% a solubilização de K no meio de cultivo, em relação aos cultivos sem a presença do microrganismo. Por fim, a cinética de solubilização da  $RK_{\text{Feldspato}}$  natural alcançou um máximo de solubilização de 15,87% de K (3º dia) enquanto a cinética da  $RK_{\text{Feldspato}}$ , após um pré-tratamento, solubilizou 20,66% de K já no primeiro dia de cinética. Este resultado evidenciou o efeito potencializador das variáveis selecionadas e do pré-tratamento na RK no aumento de sua solubilização.

## 6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Para trabalhos futuros, sugere-se:

- Realizar a quantificação do silício (Si) da  $RK_{\text{Feldspato}}$  para compreensão efetiva do mecanismo de dissolução dos diferentes meios;
- Avaliar o efeito de outras fontes de carbono comercial de baixo custo no processo de solubilização biológica;
- Quantificar os ácidos orgânicos produzidos durante acinética de solubilização da  $RK_{\text{Feldspato}}$ , natural e moída;
- Avaliar o efeito de diferentes tamanhos de partículas e tempo de moagem na solubilização biológica do K;
- Investigar o efeito da aplicação do extrato líquido obtido através das condições otimizadas de cultivo como biofertilizante no sistema solo-planta.

## REFERÊNCIAS

- Aleksandrov, V.G., Blagodyr', R.N., Il'ev, I.P., 1967. Phosphorus acid isolation from apatite produced by silicate bacteria. *Mikrobiol. Zh.* 29, 111–4.
- Alves, L., Oliveira, V.L., Filho, G.N.S., 2010. Utilization of rocks and ectomycorrhizal fungi to promote growth of eucalypt. *Brazilian J. Microbiol.* 41, 676–684. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000300018>
- Atkins, P., de Paula, J., 2008. *Atkins, Físico-Química*, 8th ed. LTC - Livros Técnico e Científicos S.A., Rio de Janeiro.
- Bahadur, I., Maurya, B.R., Kumar, A., Meena, V.S., Raghuwanshi, R., 2016. Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture, in: Meena, Vijay Singh, Maurya, Bihari Ram, Verma, J.P., Meena, R.S. (Eds.), *Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture*. Springer, Nova Delhi, pp. 255–266. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2>
- Bahadur, I., Singh, V., Kumar, S., 2014. Importance and Application of Potassic Biofertilizer in Indian Agriculture. *Int. Res. J. Biol. Sci.* 3, 80–85.
- Baláž, P., 2003. Mechanical activation in hydrometallurgy. *Int. J. Miner. Process.* 72, 341–354. [https://doi.org/10.1016/S0301-7516\(03\)00109-1](https://doi.org/10.1016/S0301-7516(03)00109-1)
- Berner, R.A., 1978. Rate control kinetic in Calcite dissolution under Earth surface conditions. *Am. J. Sci.*
- Bini, D., Lopez, M. V., Cardoso, E.J.B.N., 2016. Metabolismo Microbiano, in: Cardoso, E.J.B.N., Andreote, F.D. (Eds.), *Microbiologia Do Solo*. ESALQ, Piracicaba, pp. 61–80.
- Borges, A.L., Coelho, E.F., 2009. Fertirrigação em fruteiras tropicais. *Embrapa Mandioca e Frutic. Trop.* 179.
- Bortoletto-Santos, R., Ribeiro, C., Polito, W.L., 2016. Controlled release of nitrogen-source fertilizers by natural-oil-based poly(urethane) coatings: The kinetic aspects of urea release. *J. Appl. Polym. Sci.* 133, 1–8. <https://doi.org/10.1002/app.43790>
- Brandão, J.A.V., Lopes-Assad, M.L.R.C., Ceccato-Antonini, S.R., 2014. Solubilization of diabase and phonolite dust by filamentous fungus. *Rev. Ceres* 61, 740–745. <https://doi.org/10.1590/0034-737X201461050018>

- Brasil, 2018. Sumário Mineral 2016. Departamento Nacional de Produção Mineral, Brasília.
- Camargo, O.A., Moniz, A.C., Jorge, J.A., Valadares, J.M.A.S., 2009. Métodos de Análise Química, Mineralógica e Física de Solos do Instituto Agronômico de Campinas, Boletim Técnico. Campinas. <https://doi.org/10.1210/jcem-65-1-105>
- Cara, D.V.C., Rocha, D.L., Cunha, C.D., Rizzo, A.C.L., Servulo, E.F.C., 2012. Solubilização Biológica de Potássio. *Série Tecnologia Ambiental*, 66, Rio de Janeiro.
- Curi, N., Kampf, N., Marques, J.J., 2005. Mineralogia e formas de potássio em solos brasileiros, in: Yamada, T., Roberts, T.L. (Eds.), *Potássio Na Agricultura Brasileira*. Potafos, Piracicaba, pp. 71–91.
- Dias, V.P., Fernandes, E., 2006. Fertilizantes: uma visão global sintética. BNDES Setorial, Rio de Janeiro.
- Duarte, L.M., 2019. Extração de potássio a partir da rocha verde empregando ácidos orgânicos e fungos. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- Fazenda, M.L., Seviour, R., McNeil, B., Harvey, L.M., 2008. Submerged Culture Fermentation of “Higher Fungi”: The Macrofungi, in: Laskin, A.I., Sariaslani, S., Gadd, G.M. (Eds.), *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, pp. 33–103. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(07\)00002-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(07)00002-0)
- Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO, 2018. Fertilizers by Nutrient [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RFN/visualize>
- Gaind, S., Gaur, A.C., 1989. Effect of pH on phosphate solubilization by microbes. *Curr. Sci.* 58, 1208–1211.
- Grecco, M.F., 2018. Dinâmica da liberação de nutrientes de rochas silicatadas em solos de diferentes texturas. Universidade Federal de Pelotas.
- Guimarães, G.G.F., Klaic, R., Giroto, A.S., Majaron, V.F., Avansi, W., Farinas, C.S., Ribeiro, C., 2018. Smart Fertilization Based on Sulfur-Phosphate Composites: Synergy among Materials in a Structure with Multiple Fertilization Roles. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 6, 12187–12196. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b02511>
- Hannig, C., Hamkens, A., Becker, K., Attin, R., Attin, T., 2005. Erosive effects of different acids on bovine enamel : release of calcium and phosphate in vitro. *Arch. Oral Biol.* 50,

541–552. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2004.11.002>

- Helgeson, H.C., Murphy, W.M., Aagaard, P., 1984. Thermodynamic and kinetic constraints on reaction rates among minerals and aqueous solutions. II. Rate constants, effective surface area, and the hydrolysis of feldspar. *Geochim. Cosmochim. Acta* 48, 2405–2432. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(84\)90294-1](https://doi.org/10.1016/0016-7037(84)90294-1)
- Herrera, W.F.B., 2019. The potential of polyhalite as a multi-nutrient fertilizer for sugarcane. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz.”
- Isherwood, K.F., 2000. Mineral Fertilizer Use. International Fertilizer Industry Association Revised, Paris.
- Jaiswal, D.K., Verma, J.P., Prakash, S., Meena, V.S., Meena, R.S., 2016. Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture: A State of the Art, in: Meena, V.S., Maurya, B.R., Verma, J.P., Meena, R.S. (Eds.), *Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture*. Springer, Nova Delhi, pp. 21–29. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2>
- Jongmans, A.G., Van Breemen, N., Lundström, U., Van Hees, P.A.W., Finlay, R.D., Srinivasan, M., Unestam, T., Giesler, R., Melkerud, P.A., Olsson, M., 1997. Rock-eating fungi [4]. *Nature* 389, 682–683. <https://doi.org/10.1038/39493>
- Kasana, R.C., Panwar, N.R., Chandra Bhushan Pandey, U.B., Kumar, P., 2017. Isolation and Identification of Two Potassium Solubilizing Fungi from Arid Soil. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 6, 1752–1762. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.603.201>
- Kemp, S.J., Smith, F.W., Wagner, D., Mounteney, I., Bell, C.P., Milne, C.J., Gowing, C.J.B., Pottas, T.L., 2016. An improved approach to characterize Potash-Bearing evaporite Deposits, Evidenced in North Yorkshire, United Kingdom. *Econ. Geol.* 111, 719–742.
- Klaic, R., Plotegher, F., Ribeiro, C., Zangirolami, T.C., Farinas, C.S., 2018. A Fed-Batch Strategy Integrated with Mechanical Activation Improves the Solubilization of Phosphate Rock by *Aspergillus niger*. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 6, 11326–11334. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b00885>
- Klaic, R., Plotegher, F., Ribeiro, C., Zangirolami, T.C., Farinas, C.S., 2017. A novel combined mechanical-biological approach to improve rock phosphate solubilization. *Int. J. Miner. Process.* 161, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.minpro.2017.02.009>

- Kotani, T., Nakachima, P.M., Ferreira, L.L.H.C., Pereira, A.L., 2019. Matérias-primas do Planalto de Poços de Caldas: Alternativas ao Caulim e ao Feldspato na formulação de Porcelanas e materiais de Revestimento. *Cerâmica Ind.* 24, 45–50. <https://doi.org/10.4322/cerind.2019.009>
- Kpombrekou-a, K., Tabatabai, M.A., 2003. Effect of low-molecular weight organic acids on phosphorus release and phytoavailability of phosphorus in phosphate rocks added to soils. *Agric. Ecosyst. Environ.* 100, 275–284. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(03\)00185-3](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(03)00185-3)
- Kumar, A., Patel, J.S., Bahadur, I., Meena, V.S., 2016. The Molecular Mechanisms of KSMs for Enhancement of Crop Production Under Organic Farming, in: Meena, Vijay Singh, Maurya, B.R., Verma, J.P., Meena, R.S. (Eds.), *Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture*. Springer, Nova Delhi, pp. 61–75. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2>
- Leite, E.M., Cavalcante, Lourival Ferreira Diniz, A.A., Santos, R.V., Alvez, G. da S., Cavalcante, I.H.L., 2007. Correção da sodicidade de dois solos irrigados em resposta à aplicação de gesso agrícola. *Irriga* 12, 168–176.
- Lian, B., Wang, B., Pan, M., Liu, C., Teng, H.H., 2008. Microbial release of potassium from K-bearing minerals by thermophilic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Geochim. Cosmochim. Acta* 72, 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2007.10.005>
- Lopes-Assad, M.L., Avansini, S.H., Rosa, M.M., Carvalho, J.R.P., Ceccato-Antonini, S.R., 2010. The solubilization of potassium-bearing rock powder by *Aspergillus niger* in small-scale batch fermentations. *Can. J. Microbiol.* 56, 598–605. <https://doi.org/10.1139/W10-044>
- Lopes-Assad, M.L., Rosa, M.M., Erler, G., Ceccato-Antonini, S.R., 2006. Espaço e geografia. *Rev. Espaço e Geogr.* 9, 1–17.
- Magalhães, N., Cavalcante, A.V., Andrade, L.S., Wanderley, C.R.P., Marinho, G., Pessoa, K. de A.R., 2019. Citric acid production by *Aspergillus Niger* an 400 from agroindustry waste. *Eng. Sanit. e Ambient.* 24, 101–107. <https://doi.org/10.1590/s1413-41522019167153>
- 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.



- Martins, J.C., Martins, É.D.S., Reatto, A., 2004. Revisão de Intemperismo de Micas. Embrapa Cerrados, Planaltina,DF.
- Masood, S., Bano, A., 2016. Mechanism of Potassium Solubilization in the Agricultural Soils by the Help of Soil Microorganism, in: Meena, V.S., Maurya, B.R., Verma, J.P., Meena, R.S. (Eds.), Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture. Springer, Nova Delhi, pp. 137–147. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2>
- Matthew, T., Tallapragada, P., 2017. Issn: 2277–4998 6, 931–940.
- 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. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2>
- Meena, V.S., Maurya, B.R., Verma, J.P., 2014. Does a rhizospheric microorganism enhance K<sup>+</sup> availability in agricultural soils? *Microbiol. Res.* 169, 337–347. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.003>
- Mendes, G.D.O., Luiz, A., Freitas, M. De, 2014. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Ann. Microbiol.* 64, 239–249. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0656-3>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S1567-7443\(10\)70014-4](https://doi.org/10.1016/S1567-7443(10)70014-4)
- Mohamed, H.M., El-Homosy, R.F., Abd-Ellatef, A.E.H., Salh, F.M., Hussein, M.Y., 2016. Identification of Yeast Strains Isolated from Agricultural Soils for Releasing Potassium-bearing Minerals. *Geomicrobiol. J.* 34, 261–266. <https://doi.org/10.1080/01490451.2016.1186762>
- Motekaitis, R.J., Martell, A.E., 1984. Complexes of Aluminum(III) with Hydroxy Carboxylic Acids. *Am. Chem. Soc.* 1, 18–23.
- Muentz, A., 1890. Sur la decoposition des roches et la formation de la terre arable. *CR Acad Sci* 110, 1370–1372.
- Nascimento, M., Loureiro, F.E.L., 2009. O potássio na agricultura brasileira : fontes e rotas

- alternativas, in: Lapidou-Loureiro, F.E., Melamed, R., Figueiredo Neto, J. (Eds.), *Fertilizantes: Agroindústria & Sustentabilidade*. CETEM/MCT, Rio de Janeiro, pp. 305–355.
- Nascimento, M., Loureiro, F.E.L., 2004. *Fertilizantes e sustentabilidade: o potássio na agricultura brasileira, fontes e rotas alternativas*, Série Estudos e Documentos, 61. CETEM/MCT, Rio de Janeiro.
- Nicol, R.W., Marchand, K., Lubitz, W.D., 2012. Bioconversion of crude glycerol by fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 1865–1875. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3921-7>
- Parmar, P., Sindhu, S.S., 2013. Potassium Solubilization by Rhizosphere Bacteria: Influence of Nutritional and Environmental Conditions. *J. Microbiol. Res.* 3, 25–31. <https://doi.org/10.5923/j.microbiology.20130301.04>
- Pereira, A.C., Gomes, M.R. dos S., Rocha, S.D.F., 2018. Eficácia do tratamento térmico na extração hidrometalúrgica de potássio em rochas contendo feldspato potássico. *Brazilian Appl. Sci. Rev.* 2, 1716–1727.
- Petrovich, R., 1981. Kinetics of dissolution of mechanically comminuted rock-forming oxides and silicates-I. Deformation and dissolution of quartz under laboratory conditions. *Geochim. Cosmochim. Acta* 45, 1665–1674. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(81\)90002-8](https://doi.org/10.1016/0016-7037(81)90002-8)
- Pettigrew, W.T., 2008. Potassium influences on yield and quality production for maize, wheat, soybean and cotton. *Physiol. Plant.* 133, 670–681. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01073.x>
- Plotegher, F., 2014. *Estudo da Cominuição na Solubilidade da Rocha Fosfática Bayóvar*. Universidade Federal de São Carlos.
- Plotegher, F., Ribeiro, C., 2016. Characterization of single superphosphate powders - A study of milling effects on solubilization kinetics. *Mater. Res.* 19, 98–105. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2015-0401>
- Prajapati, K., Sharma, M.C., Modi, H.A., 2012a. Isolation of Two Potassium Solubilizing Fungi From Ceramic Industry Soils. *Life Sci. Leafl.* 5, 71–75.
- Prajapati, K., Sharma, M.C., Modi, H.A., 2012b. Isolation of Two Potassium Solubilizing Fungi From Ceramic Industry Soils. *Life Sci. Leafl.* 5, 71–75.

- Resende, A.V. De, Martins, E.D.S., Oliveira, C., Sena, M.C., Machado, C., Kinpara, D.I., Filho, E.C.D.O., 2006. Suprimento de potássio e pesquisa de uso de rochas “in natura” na agricultura brasileira. *Espaço Geogr.* 9, 19–42.
- Ruijter, G.J.G., Van De Vondervoort, P.J.I., Visser, J., 1999. Oxalic acid production by *Aspergillus niger*: An oxalate-non-producing mutant produces citric acid at pH 5 and in the presence of manganese. *Microbiology* 145, 2569–2576. <https://doi.org/10.1099/00221287-145-9-2569>
- Rymowicz, W., Lenart, D., 2003. Oxalic acid production from lipids by a mutant of *Aspergillus niger* at different pH. *Biotechnol. Lett.* 25, 955–958. <https://doi.org/10.1023/A:1024082130677>
- Sattar, A., Naveed, M., Ali, M., Zahir, Z.A., Nadeem, S.M., 2018. Perspectives of potassium solubilizing microbes in sustainable food production system : A review Perspectives of potassium solubilizing microbes in sustainable food production system : A review. *Appl. Soil Ecol.* 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.09.012>
- Sattar, A., Naveed, M., Ali, M., Zahir, Z.A., Nadeem, S.M., Yaseen, M., Meena, V.S., Farooq, M., Singh, R., Rahman, M., Meena, H.N., 2019. Perspectives of potassium solubilizing microbes in sustainable food production system: A review. *Appl. Soil Ecol.* 133, 146–159. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.09.012>
- Savci, S., 2012. An Agricultural Pollutant: Chemical Fertilizer. *Int. J. Environ. Sci. Dev.* 3, 73–80. <https://doi.org/10.7763/ijesd.2012.v3.191>
- Setiawati, T.C., Mutmainnah, L., 2016. Solubilization of Potassium Containing Mineral by Microorganisms From Sugarcane Rhizosphere. *Agric. Agric. Sci. Procedia* 9, 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.02.134>
- Shanware, A.S., Kalkar, S.A., Trivedi, M.M., 2014. Potassium Solublisers : Occurrence , Mechanism and Their Role as Competent Biofertilizers. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 3, 622–629.
- Silva, D.S., Química, E., Sc, D., 2004. Estudo de Flogopitito da Bahia Como Fertilizante Alternativo de Potássio 1985, 34–40.
- Singh, Y.P., Tanvar, H., Kumar, G., Dhawan, N., 2019. Investigation of planetary ball milling of sericite for potash recovery. *Powder Technol.* 351, 115–121.

<https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.04.013>

- Skorina, T., Allanore, A., 2015. Aqueous alteration of potassium-bearing aluminosilicate minerals: From mechanism to processing. *Green Chem.* 17, 2123–2136. <https://doi.org/10.1039/c4gc02084g>
- Song, M., Pedruzzi, I., Peng, Y., Li, P., Liu, J., Yu, J., 2015a. K-Extraction from Muscovite by the Isolated Fungi. *Geomicrobiol. J.* 32, 771–779. <https://doi.org/10.1080/01490451.2014.985409>
- Song, M., Pedruzzi, I., Peng, Y., Li, P., Liu, J., Yu, J., 2015b. K-Extraction from Muscovite by the Isolated Fungi. *Geomicrobiol. J.* 32, 771–779. <https://doi.org/10.1080/01490451.2014.985409>
- Sterflinger, K., 2000. Fungi as geologic agents. *Geomicrobiol. J.* 17, 97–124. <https://doi.org/10.1080/01490450050023791>
- Strasser, H., Burgstaller, W., Schinner, F., 1994. High-yield production of oxalic acid for metal leaching processes by *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol. Lett.* 119, 365–370. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(94\)90441-3](https://doi.org/10.1016/0378-1097(94)90441-3)
- Teixeira, A.M.D.S., Sampaio, J.A., Garrido, F.M. dos S., Medeiros, M.E., 2012. Avaliação Da Rocha Fonolito Como Fertilizante Alternativo De Potássio. *Holos* 5, 21. <https://doi.org/10.15628/holos.2012.1102>
- Teodosieva, R., Bojinova, D., 2016. Biodecomposition of Jordan phosphorite by Phosphate-Solubilizing Fungi. *Brazilian J. Chem. Eng.* 33, 1–11. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20160331s00003267>
- U. S. Geological Survey, 2019. Mineral Commodity Summaries 2019. U. S. Geological Survey, Reston, Virginia. <https://doi.org/https://doi.org/10.3133/70202434>
- Vassilev, N., Malusa, E., Requena, A.R., Martos, V., López, A., Maksimovic, I., Vassileva, M., 2017. Potential application of glycerol in the production of plant beneficial microorganisms. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 44, 735–743. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1810-2>
- Vassilev, N., Medina, A., Eichler-Löbermann, B., Flor-Peregrín, E., Vassileva, M., 2012. Animal bone char solubilization with itaconic acid produced by free and immobilized *aspergillus terreus* grown on glycerol-based medium. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168,

- 1311–1318. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9859-5>
- Vlach, S.R.F., 2002. A Classe dos Tectossilicatos: Guia Geral da Teoria e Exercício. Rev. do Inst. Geociência - USP 1, 49. <https://doi.org/https://doi.org/10.11606/issn.2316-9109.v1i0p1-49>
- Wu, S.C., Cao, Z.H., Li, Z.G., Cheung, K.C., Wong, M.H., 2005. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: A greenhouse trial. Geoderma 125, 155–166. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.07.003>
- Xu, H., Guo, X., Bai, J., 2017. Thermal behavior of polyhalite: a high-temperature synchrotron XRD study. Phys. Chem. Miner. 44, 125–135. <https://doi.org/10.1007/s00269-016-0842-5>
- Xue, X., Zhang, L., Peng, Y., Li, P., Yu, J., 2018. Effects of Mineral Structure and Microenvironment on K Release from Potassium Aluminosilicate Minerals by *Cenococcum geophilum* fr. Geomicrobiol. J. 36, 11–18.
- Yadav, B.K., Sidhu, A.S., 2016. Dynamics of Potassium and Their Bioavailability for Plant Nutrition, in: Meena, V.S., Maurya, B.R., Verma, J.P., Meena, R.S. (Eds.), Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture. Nova Delhi, pp. 187–201. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2>
- 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.
- Yang, L., Lübeck, M., Lübeck, P.S., 2017. *Aspergillus* as a versatile cell factory for organic acid production. Fungal Biol. Rev. 31, 33–49. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.11.001>
- Yavorskii, V.T., Blazhivskii, K.I., Perekupko, T. V., Kostiv, I.Y., Maksimovich, I.E., 2009. Acid decomposition of difficultly soluble potassium ores with the use of organic solvents. Russ. J. Appl. Chem. 82, 767–771. <https://doi.org/10.1134/S1070427209050036>
- Zhang, C., Kong, F., 2014. Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from tobacco rhizospheric soil and their effect on tobacco plants. Appl. Soil Ecol. 82, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.05.002>