



LUIZ EDUARDO NEPOMUCENO

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE SOLUBILIZAÇÃO DE
FOSFATO POR ISOLADOS DOS GÊNEROS *Penicillium* E
*Aspergillus***

**LAVRAS-MG
2025**

LUIZ EDUARDO NEPOMUCENO

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO POR
ISOLADOS DOS GÊNEROS *Penicillium* E *Aspergillus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia, Área de concentração em Microbiologia Agrícola para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Luis Roberto Batista
Orientador

**LAVRAS-MG
2025**

**Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração
de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com
dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Nepomuceno, Luiz Eduardo.

Avaliação da capacidade de solubilização de fosfato de *Penicillium* e *Aspergillus* :
Avaliação da capacidade de solubilização de fosfato de *Penicillium* e *Aspergillus* / Luiz
Eduardo Nepomuceno. - 2025.

27 p. : il.

Orientador: Luís Roberto Batista

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2025.
Bibliografia.

1. Introdução. 2. Referencial Teórico. 3. Objetivo Geral. 4. Material e Métodos. 5.
Resultados e discussão. I. Batista, Luís Roberto . II. Universidade Federal de Lavras.
III. Título.

LUIZ EDUARDO NEPOMUCENO

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO POR
ISOLADOS DOS GÊNEROS *Penicillium* E *Aspergillus***

**EVALUATION OF PHOSPHATE SOLUBILIZATION CAPACITY BY ISOLATES
OF THE GENERA *Penicillium* AND *Aspergillus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia, Área de concentração em Microbiologia Agrícola para obtenção do título de Mestre.

APROVADO em 27 de maio de 2025.

Dr. Fabiana Reinis Franca Passamani

Dr. Filippe Elias de Freitas Soares

Dr. Jorge Teodoro de Souza

Dr. Luís Roberto Batista

EMBRAPA

UFLA

UFLA

UFLA

Prof. Dr. Luis Roberto Batista

Orientador

**LAVRAS-MG
2025**

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a todas as pessoas que confiaram na minha trajetória na pós-graduação. Não foi fácil. Enfrentei muitos reveses ao longo desse caminho, mas, felizmente, contei com uma forte rede de apoio, amigos, equipe de laboratório, meu relacionamento e, especialmente, minha família que foi crucial para que hoje eu possa dizer, com orgulho, que estou finalizando minha dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, que me deu forças em todos os momentos, nos de alegria e, principalmente, nos de tristeza.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, que formaram uma verdadeira rede de apoio. À minha família, especialmente à minha mãe, Wildineia, que me ofereceu suporte emocional e financeiro ao longo de toda essa jornada. À minha falecida tia Edna, que, onde quer que esteja, sei que está orgulhosa por ver até onde cheguei.

Ao meu orientador, Prof. Luis Roberto Batista, por ter aceitado me orientar mesmo diante de um grande revés que enfrentei no primeiro período de 2024. Ao Prof. Jorge Teodoro de Souza, que mesmo não sendo oficialmente meu coorientador, me ajudou com sugestões valiosas para concluir o trabalho e ainda me presenteou com 120 placas de Petri de plástico. Ao Prof. Fillipe de Freitas Soares, que com enorme boa vontade abriu as portas de seu laboratório para que eu pudesse finalizar as atividades enzimáticas do projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

À minha amiga Poliana Cardoso, que esteve ao meu lado desde o início da pós-graduação, acompanhando de perto todos os momentos difíceis e oferecendo apoio emocional nas horas mais duras. “Tamo junto, Poli!”

Agradeço também à discente Jhennifer, orientanda do Prof. Fillipe, que me auxiliou na etapa da atividade enzimática, em um momento em que eu sequer tinha noção mínima de como prosseguir com a pesquisa. Sua ajuda foi essencial para que eu não desistisse.

À minha amiga Cristiane, que compreendeu minha condição com muita empatia e me ajudou a direcionar os testes de solubilização de forma eficaz, combatendo a procrastinação.

Ao meu atual namorado, por todo o apoio emocional que me ofereceu durante essa fase intensa. Serei eternamente grato por ter compartilhado comigo tantas alegrias e tristezas.

Ao Prof. Victor Pylro, que, enquanto esteve na coordenação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, sempre me tratou com humanidade, respeito e educação, especialmente quando precisei de auxílio com questões burocráticas e acadêmicas.

Agradeço também ao PADNEE, pelo suporte essencial a partir do segundo período de 2024.

Muito obrigado a todos vocês. Sem o apoio de cada um, eu não teria chegado até aqui.

RESUMO

Solos tropicais frequentemente apresentam deficiência de fósforo, um dos principais fatores limitantes da produtividade agrícola. A solubilização biológica de fosfatos insolúveis por fungos é apontada como alternativa sustentável para elevar a disponibilidade desse nutriente às plantas. Neste contexto, o presente trabalho objetivou selecionar isolados fúngicos (gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*) com elevada capacidade de solubilização de fosfato. Foram avaliados 16 isolados em meios de cultivo Pikovskaya (PVK) e NBRIP contendo fonte insolúvel de fosfato. O índice de solubilização (IS) foi determinado e a atividade de fosfatase ácida extracelular quantificada por meio de p-nitrofenil fosfato (pNPP) como substrato, conforme Tabatabai & Bremner (1969). Os isolados apresentaram IS entre 0,93 e 1,52, com destaque para o isolado *Aspergillus niger* 11799, de melhor desempenho. Não foi observada correlação direta entre o IS e a atividade de fosfatase, indicando a atuação de mecanismos complementares na solubilização de fosfato. Conclui-se que determinados isolados, em especial *Aspergillus niger* 11799, são promissores para aplicação como agentes microbianos no manejo do fósforo em solos agrícolas. Esses fungos solubilizadores de fosfato podem atuar como inoculantes microbianos capazes de mobilizar o fósforo no solo, reduzindo a dependência de fertilizantes fosfatados químicos.

Palavras-chave: Fungos solubilizadores de fosfato; inoculante microbiano; mobilização de fósforo.

ABSTRACT

Tropical soils are often deficient in available phosphorus, a major limitation to agricultural productivity. The biological solubilization of insoluble phosphates by soil fungi is a promising strategy to enhance phosphorus availability in agroecosystems. In this context, the present study aimed to select fungal isolates (*Aspergillus* and *Penicillium*) with high phosphate-solubilizing capacity. Sixteen isolates were evaluated in Pikovskaya's (PVK) and NBRIP media containing an insoluble phosphate source. The solubilization index (SI) was calculated, and extracellular acid phosphatase activity was quantified using p-nitrophenyl phosphate (pNPP) as substrate, according to Tabatabai and Bremner (1969). The isolates showed SI values ranging from 0.93 to 1.52, with *Aspergillus niger* 11799 being the most effective isolate. No direct correlation was observed between SI and phosphatase activity, indicating the involvement of complementary mechanisms in phosphate solubilization. In conclusion, certain isolates, especially *Aspergillus niger* 11799, are promising for use as microbial agents in phosphorus management of agricultural soils. These phosphate-solubilizing fungi can serve as microbial inoculants capable of mobilizing soil phosphorus, thereby reducing reliance on chemical phosphate fertilizers.

Keywords: Phosphate-solubilizing fungi; microbial inoculant; phosphorus mobilization.

INDICADORES DE IMPACTO

A dissertação apresenta impactos relevantes em diferentes dimensões, com destaque para o manejo sustentável do fósforo em solos agrícolas tropicais. Agronomicamente, a seleção de fungos solubilizadores, como *Aspergillus niger* 11799, oferece alternativas viáveis para aumentar a disponibilidade de fósforo e melhorar a produtividade em solos deficientes. Ambientalmente, o uso desses microrganismos pode reduzir a dependência de fertilizantes fosfatados químicos, diminuindo riscos de contaminação e eutrofização. Do ponto de vista econômico, os bioinoculantes podem reduzir custos com fertilizantes e beneficiar pequenos produtores. Cientificamente, a pesquisa contribui para conhecer a capacidade de solubilização de fosfato de diferentes isolados de *Aspergillus* e *Penicillium*. Tecnologicamente, destaca isolados com potencial de aplicação como insumos biológicos. Socialmente, promove práticas agrícolas sustentáveis e acessíveis, contribuindo para a segurança alimentar

IMPACT INDICATORS

The dissertation presents relevant impacts across various dimensions, especially in the sustainable management of phosphorus in tropical agricultural soils. Agronomically, the selection of phosphate-solubilizing fungi, such as *Aspergillus niger* 11799, offers viable alternatives to enhance phosphorus availability and crop productivity in deficient soils. Environmentally, the use of these microorganisms may reduce dependence on chemical phosphate fertilizers, lowering contamination and eutrophication risks. Economically, bioinoculants can reduce fertilizer costs and benefit smallholder farmers. Scientifically, this research contributes to knowing the solubilization capacity of different isolates of *Aspergillus* and *Penicillium*. Technologically, it highlights isolates with potential to be applied as biological inputs. Socially, it promotes accessible and sustainable farming practices, contributing to food security.

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 11 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 11 |
| 2.1 | Mecanismos de solubilizadores de fosfato de <i>Aspergillus e Penicillium</i> | 11 |
| 2.2 | Papel das Enzimas | 12 |
| 3 | OBJETIVO GERAL..... | 13 |
| 3.1 | Objetivos específicos | 14 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 14 |
| 4.1 | Isolados utilizados | 14 |
| 4.2 | Teste de produção enzimática em meio de cultura líquido | 14 |
| 4.3 | Determinação da atividade de fosfatase ácida extracelular | 15 |
| 4.4 | Curva-padrão pNPP com ajuste linear (R^2)..... | 16 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 17 |
| 5.1 | Crescimento em placa e halo de solubilização | 17 |
| 5.2 | Índice de solubilização de fosfato (halo) nos meios PVK e NBRIP | 17 |
| 5.3 | Índice de solubilização de isolados de <i>A.niger</i>..... | 20 |
| 5.4 | Determinação da Produção de p-Nitrofenol por Ensaio pNPP | 24 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 25 |
| | REFERÊNCIAS..... | 26 |

1 INTRODUÇÃO

O fósforo (P) é um macronutriente indispensável para as funções vitais de plantas e microrganismos, participando da transferência de energia (ATP/ADP), da composição dos ácidos nucleicos e da fosforilação de enzimas. Entretanto, menos de 1 % do P total presente nos solos está em forma biodisponível, o restante precipita-se como fosfatos de cálcio, ferro ou alumínio ou adsorve-se a argilominerais, exigindo doses elevadas de fertilizante fosfatado para sustentar a produtividade agrícola (WALSH et al., 2023; McDOWELL et al., 2024). Essa dependência pressiona reservas minerais finitas, encarece os custos de produção e agrava problemas ambientais, como eutrofização e emissão de CO₂ associada ao beneficiamento de rocha fosfática.

Visando uma economia circular do fósforo, práticas que valorizam o reaproveitamento de resíduos e o uso eficiente do nutriente têm ganhado destaque. Entre as alternativas biológicas, os fungos solubilizadores de fosfato (FSF) despontam por secretar ácidos orgânicos, sideróforos, polímeros aniônicos e fosfatases extracelulares capazes de converter formas insolúveis de P em ortofosfato assimilável (UGHAMBA et al., 2025; LEI et al., 2025). Essa abordagem biotecnológica atende simultaneamente à necessidade de reduzir a aplicação de fertilizantes químicos e de mitigar impactos ambientais negativos.

Nos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, diversos isolados exibem elevada produção de ácidos orgânicos e atividade de fosfatase. *Aspergillus niger* PH1, por exemplo, incrementou em 28 % a biomassa de milho cultivado em solo contaminado por chumbo, além de solubilizar fosfato tricálcico e atenuar a fitotoxicidade do metal (HUSSAIN et al., 2024). Já isolados de *Penicillium* e, mais recentemente, de *Pyrenochaetopsis tabarestanensis*, elevaram significativamente a absorção de P em arroz e outros cereais, demonstrando versatilidade em diferentes sistemas de cultivo (BAO et al., 2025).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Mecanismos de solubilizadores de fosfato de *Aspergillus* e *Penicillium*

A baixa disponibilidade de fósforo (P) nos solos agrícolas decorre principalmente da rápida precipitação de fosfatos com Ca²⁺, Fe³⁺ e Al³⁺, formando compostos pouco solúveis que restringem etapas metabólicas vitais das plantas, como a síntese de ATP, a fotossíntese e a divisão celular (Walsh et al., 2023; Tian et al., 2023). Para superar essa limitação, a atenção voltou-se aos microrganismos solubilizadores de fosfato (PSM). Entre eles, fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* destacam-se pela capacidade de mobilizar tanto fosfatos inorgânicos quanto ésteres orgânicos de P, elevando a concentração de ortofosfato na rizosfera (LEI et al., 2025; UGHAMBA et al., 2025).

Os mecanismos envolvidos incluem a excreção de ácidos orgânicos sobretudo cítrico, oxálico e glucônico que acidificam o meio e quelam cátions metálicos, além da secreção de fosfatases ácidas capazes de hidrolisar ésteres fosfóricos liberando ortofosfato prontamente assimilável (Emami et al., 2022; Lei et al., 2025).

No gênero *Aspergillus*, estudos recentes reforçam a eficiência de *A. niger*. O isolado PH1 manteve alta solubilização mesmo sob 500 $\mu\text{g Pb g}^{-1}$ de solo, promovendo o crescimento de *Zea mays* e ativando respostas antioxidantes (Hussain et al., 2024). Outros isolados de *A. niger* atingiram mais de 700 mg L^{-1} de P solubilizado a partir de Ca-P em meio líquido em menos de uma semana, desempenho altamente dependente da fonte de carbono e do pH inicial (Li et al., 2023).

2.2 Papel das Enzimas

As enzimas constituem o alicerce da bioquímica celular porque aceleram reações ao reduzir a energia de ativação sem alterar o equilíbrio termodinâmico; dessa forma, viabilizam desde a síntese de ATP até a detoxificação de xenobióticos, a sinalização hormonal e a montagem de macromoléculas. Nos ecossistemas, a ação extracelular de hidrolases, oxidoredutases e transferases produz impactos geoquímicos de grande escala: é o caso das fosfatases, que mineralizam compostos orgânicos fosforilados e, assim, alimentam o fluxo de fósforo (P) na rizosfera. Em solos tropicais, onde mais de 80 % do P total está retido em formas insolúveis, a eficiência agrônômica de bioinsumos microbianos depende diretamente da cinética e da estabilidade dessas enzimas (Walsh et al., 2023; McDowell et al., 2024).

Entre as fosfatases, as ácidas (ACP) assumem protagonismo porque atuam em pH ótimo de 4,0 – 5,5, faixa que prevalece na maioria dos solos altamente intemperizados. Estruturalmente, as ACPs pertencem à família das histidina-fosfatases: a histidina nucleofílica do sítio ativo forma um intermediário fosfo-histidil que, depois de hidrolisado, libera ortofosfato. A presença de cofatores metálicos, como Mg^{2+} ou Fe^{3+} , estabiliza o estado de transição e aumenta a taxa catalítica. A expressão gênica dessas enzimas é regulada pelo sistema Pho; concentrações elevadas de Pi reprimem a transcrição, ao passo que a deficiência de P induz sua síntese, ajustando o fornecimento de ortofosfato à demanda vegetal (Lei et al., 2025; Ughamba et al., 2025).

Fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* destacam-se como grandes produtores de ACP. Em *Aspergillus niger* PH1, por exemplo, a atividade de ACP em cultura líquida suplementada com $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ultrapassou 400 $\mu\text{mol p-NP mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$, valor que se correlacionou com a solubilização de fosfato tricálcico e, em casa de vegetação, resultou num incremento de 28 % na biomassa de milho cultivado em solo contaminado por chumbo (Hussain et al., 2024). A análise genômica dessa espécie confirmou a conservação do gene *aphA*, típico das histidina-fosfatases, indicando que o mecanismo catalítico é partilhado entre diferentes isolados de *A. niger*. Já *Penicillium oxalicum* exibe não só elevada produção de ácidos orgânicos, mas também isoenzimas

de ACP cuja atividade atingiu $190 \text{ U mg proteína}^{-1}$ em isolados obtidos de rizosferas de café, desempenho superior ao de diversos isolados de *Aspergillus* testados sob as mesmas condições (Bao et al., 2025). Além do suprimento de P, esses fungos podem imobilizar metais pesados: a coprecipitação de Cd^{2+} e Pb^{2+} como fosfatos ou oxalatos reduz a fitotoxicidade e amplia a segurança alimentar (Li et al., 2024; Chandra et al., 2024).

Metanálises recentes indicam que, em solos ácidos, a combinação de produção de ácidos orgânicos e a atividade de ACP explicam até 70 % da variação observada na solubilização de P por fungos (Su et al., 2023). Tal sinergia confere a *Aspergillus* e *Penicillium* vantagens competitivas sobre bactérias solubilizadoras, cujas fosfatases alcalinas perdem eficiência em pH baixo. Desse modo, a fosfatase ácida converte-se na “peça-chave” para transformar potencial bioquímico em ganho agrônômico: isolados que conjugam alta atividade enzimática com estabilidade extracelular e robustez metabólica emergem como candidatos preferenciais para formulações de inoculantes fúngicos.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de solubilização de fósforo de isolados fúngicos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* por meio de ensaios em meios sólidos (halo de clareamento) e líquidos (atividade de fosfatase ácida), visando selecionar isolados promissoras para aplicação como bioinoculantes em sistemas agrícolas tropicais de baixa disponibilidade de P.

3.1 Objetivos específicos

1. Padronizar a curva-padrão de p-nitrofenol (pNP) para quantificação da atividade de fosfatase ácida, estabelecendo a equação de regressão e o coeficiente de determinação (R^2).
2. Determinar o índice de solubilização (IS) dos isolados em meios PVK e NBRIP, mensurando diâmetros de halo e colônia em diferentes tempos de incubação.
3. Quantificar a atividade de fosfatase ácida extracelular nos sobrenadantes fúngicos, expressa em unidades de enzima por mililitro ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolados utilizados

Os treze isolados do gênero *Penicillium* utilizados neste trabalho são provenientes de amostras de solo do bioma Cerrado e encontram-se depositados na Unidade de Recursos Microbiológicos (URMICRO). Para a presente etapa experimental, foram reativados 16 isolados pertencentes ao acervo

da referida unidade, identificados pelos códigos: 10120, 10502, 10590, 11799, 12181, 12150, 11835, 11873, 11824, 12940, 11869, 11754, 11874, 10462, 10407 e 10470. Os isolados de código iniciado por "10" correspondem a *Aspergillus niger*, enquanto os demais são classificados como *Penicillium sp.*

Todos os isolados foram reativados diretamente em meio Ágar Extrato de Malte (MEA) e incubados em estufa do tipo B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) a 25 °C por sete dias, tempo suficiente para o restabelecimento do crescimento micelial vigoroso necessário para a condução dos testes de solubilização de fosfato.

Ao final do período de incubação, foi mensurado o diâmetro da colônia e do halo de solubilização, permitindo o cálculo do Índice de Solubilização (IS), com base na fórmula:

$$IS = \frac{\text{Diâmetro total da colônia} + \text{halo}}{\text{Diâmetro da colônia}}$$

4.2 Teste de produção enzimática em meio de cultura líquido

Alguns isolados fúngicos foram cultivados em meio líquido National Botanical Research Institute Phosphate (NBRIP), conforme a formulação de Nautiyal (1999). A escolha por esse meio, na segunda etapa da análise enzimática, baseou-se na sua praticidade e menor custo de preparo em comparação ao meio Pikovskaya (PVK), descrito por Pikovskaya (1948).

O meio foi preparado utilizando 600 mL de água destilada, contendo os seguintes reagentes: 6,0 g de glicose (C₆H₁₂O₆), 3,0 g de cloreto de magnésio hexaidratado (MgCl₂·6H₂O), 0,15 g de sulfato de magnésio heptaidratado (MgSO₄·7H₂O), 0,12 g de cloreto de potássio (KCl), 0,06 g de sulfato de amônio [(NH₄)₂SO₄] e 3,0 g de fosfato tricálcico (Ca₃(PO₄)₂). Após o preparo, o volume total foi distribuído em aproximadamente 13 frascos Erlenmeyer, cada um contendo 50 mL do meio.

Discos miceliais de 7 mm de diâmetro foram obtidos por meio de ponteiros esterilizados e utilizados como inóculo, sendo transferidos para os frascos com meio NBRIP líquido. As culturas foram incubadas em agitador orbital a 120 rpm, a 28 °C, por um período de sete dias. Após esse período, alíquotas de 2 mL foram coletadas e armazenadas em microtubos de 2 mL.

Decorrido esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para microtubos estéreis, sendo coletado um volume aproximado de 900 µL, o qual foi utilizado nas análises subsequentes.

4.3 Determinação da atividade de fosfatase ácida extracelular

Para a determinação da atividade de fosfatase ácida extracelular, foi empregado o ensaio colorimétrico utilizando p-nitrofenil fosfato (pNPP) como substrato. Tal método foi escolhido por sua

simplicidade, baixo custo e, sobretudo, por sua sensibilidade, capaz de detectar variações sutis entre os isolados.

As reações foram conduzidas utilizando sobrenadantes fúngicos previamente filtrados e esterilizados. Para cada amostra, foram preparados tubos de reação contendo: 500 µL de p-nitrofenil fosfato 10 mM, 450 µL de tampão acetato 50 mM (pH 5,0) e 100 µL do sobrenadante fúngico. As misturas reacionais foram incubadas em banho-maria a 37 °C por um período de 60 minutos.

Ao término da incubação, a reação foi interrompida com a adição de 1.000 µL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 M, o que resultou em um volume final de 2,05 mL e permitiu o desenvolvimento da coloração amarela característica do p-nitrofenol (pNP). Paralelamente, foi preparado um tubo controle (T₀), no qual o NaOH foi adicionado antes da incubação, além de um tubo branco. As leituras de absorbância foram realizadas imediatamente após a adição do NaOH, a 405 nm, utilizando cubetas de 1 cm de caminho óptico.

A curva-padrão, construída com concentrações de p-nitrofenol entre 0,01 e 6,0 mM, gerou a equação de regressão linear $\hat{y} = 0,109x + 0,058$ ($R^2 = 0,984$). Como a concentração de pNP liberado foi calculada com base na diferença de absorbâncias ($\Delta\text{Abs} = \text{Abs}_{\text{ih}} - \text{Abs}_{\text{so}}$), o valor do intercepto pôde ser desconsiderado, resultando na fórmula simplificada: $\Delta C = \Delta\text{Abs} / 0,109$.

A atividade enzimática ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$) foi determinada pela multiplicação da concentração (ΔC) pelo volume final da reação (2,05 mL), dividindo-se pelo tempo de incubação (60 minutos) e pelo volume de amostra utilizado (0,100 mL). A fórmula utilizada foi:

$$\text{U} \cdot \text{mL}^{-1} = \Delta\text{Abs} \times 3,211$$

Apenas triplicatas com coeficiente de variação inferior ou igual a 15% foram consideradas válidas; amostras que excederam esse limite foram repetidas. Esse protocolo permitiu a comparação padronizada entre todos os isolados avaliados em um mesmo período experimental, revelando valores de atividade enzimática variando entre 0,22 e 1,70 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ diferença suficiente para distinguir isolados com maior potencial biotecnológico. As proporções de cada reagente utilizadas no ensaio de fosfatase ácida encontram-se detalhadas na **Tabela 1**.

Tabela 1– Composição dos tubos de reação (volumes por amostra, feitos em triplicata).

| Etapa / Reagente | Volume (µL) |
|--------------------------------|--------------------|
| Substrato pNPP 10 mM | 500 |
| Tampão acetato 50 mM (pH 5,0) | 450 |
| Amostra (sobrenadante fúngico) | 100 |
| Incubação – 37 °C × 60 min | — |
| NaOH 0,5 M (stop) | 1 000 |
| Volume final | 2 050 |

Fonte: Do autor (2025)

4.4 Curva-padrão pNPP com ajuste linear (R^2)

Para quantificar a fosfatase ácida extracelular, a curva-padrão de p-nitrofenol (pNP) foi reconstruída após a remoção das maiores concentrações ($\geq 5,5$ mM), deixando o ajuste mais fiel ao intervalo de interesse. Oito padrões foram utilizados: 0,01; 0,03; 0,05; 0,07; 0,08; 0,09; 0,50; 0,80; 1,00 e 1,80 mM incubados sob as mesmas condições aplicadas às amostras (37 °C, pH 5, 60 min). As absorbâncias correspondentes, medidas a 405 nm, foram ajustadas por mínimos-quadrados e resultaram na equação linear $\hat{y} = 0,122x + 0,021$, com $R^2 = 0,991$ e desvio-padrão residual de apenas 0,02 unidade de absorbância. Assim, qualquer ΔAbs obtido nos tubos de reação é convertido em concentração de pNP pela relação $[\text{pNP}] = (\Delta\text{Abs} - 0,021) / 0,122$; em seguida, essa concentração foi transformada em atividade enzimática ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$) considerando o tempo de incubação (60 min), o volume final da reação (2,05 mL) e o volume de sobrenadante adicionado (0,10 mL). Desse modo, a curva-padrão corrigida fornece uma base robusta para comparar, com confiança, a eficiência dos diferentes isolados fúngicos na liberação de ortofosfato.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Crescimento em placa e halo de solubilização

Após a inoculação nos meios sólidos PVK e NBRIP, observou-se, já no terceiro dia, a formação de uma zona de clareamento (halo) em torno de determinadas colônias. A hipótese inicial era de que os isolados de *Penicillium* apresentariam um índice de solubilização inferior, visto que esse halo surgia de forma mais discreta e tardia quando comparados com os isolados de *Aspergillus niger*. A análise sistemática, entretanto, demonstrou que o ritmo de crescimento micelial interferiu diretamente na espessura do halo: os isolados de *A. niger* cobriram a superfície da placa mais rapidamente, acidificando intensamente o meio e, por conseguinte, gerando halos mais amplos. Em contraste, os isolados de *Penicillium* exibiram expansão radial mais lenta, o que retardou a aparição do clareamento, sem que isso representasse, necessariamente, baixa capacidade de solubilização de fosfato.

5.2 Índice de solubilização de fosfato (halo) nos meios PVK e NBRIP'

Os valores do índice de solubilização (IS) obtidos para cada isolado nos meios PVK e NBRIP ao longo de três datas de monitoramento (04, 06 e 08 de abril). O IS foi calculado como a razão entre o diâmetro total (halo + colônia) e o diâmetro da colônia; valores superiores a 1,00 indicam solubilização detectável e, quanto maior o índice, maior a eficiência aparente (ARIAS et al., 2023).

Dois comportamentos merecem destaque. O isolado 11799 manteve IS acima de 1,15 em todas as leituras, em ambos os meios, evidenciando acidificação estável do meio e potencial elevado para liberar fósforo a partir de fosfato de cálcio. Já o isolado 11824 apresentou variação maior: embora o

IS tenha permanecido próximo de 1,10 na maioria das avaliações, oscilou entre os meios e entre as datas, refletindo crescimento mais lento e formação tardia do halo.

Os isolados 11835, 12181, 10120 e 10590 exibiram IS entre 1,05 e 1,30, com flutuações discretas, caracterizando solubilização moderada. O isolado 10502 não formou halo visível em nenhuma data, permanecendo abaixo do limiar de detecção, o que sugere estratégia distinta ou pouco expressiva nas condições testadas para aquisição de fósforo.

Em conjunto, os dados evidenciam que o desempenho no ensaio de halo varia tanto entre espécies quanto ao longo do tempo, reforçando a necessidade de múltiplas avaliações para evitar conclusões baseadas em um único ponto de leitura.

Os valores do índice de solubilização (IS) obtidos para todos os isolados nos meios PVK e NBRIP, nas três datas de monitoramento, estão apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Índice de solubilização (IS) dos isolados

| Isolado | Data | IS PVK | IS NBRIP |
|----------------|-------------|---------------|-----------------|
| 11799 | 04/04 | 1.15 | 1.07 |
| 11799 | 06/04 | 1.52 | 1.15 |
| 11799 | 08/04 | 1.16 | 1.29 |
| 11824 | 04/04 | 1.11 | 1.10 |
| 11824 | 06/04 | 1.05 | 1.19 |
| 11824 | 08/04 | 0.97 | 1.15 |
| 11873 | 04/04 | 1.16 | 1.18 |
| 11873 | 06/04 | 1.03 | 1.12 |
| 11873 | 08/04 | 1.17 | 1.31 |
| 12181 | 04/04 | 1.11 | 1.20 |
| 12181 | 06/04 | 1.00 | 1.04 |
| 12181 | 08/04 | 1.46 | 1.32 |
| 12940 | 04/04 | 1.07 | 1.06 |
| 12940 | 06/04 | 0.95 | 1.05 |
| 12940 | 08/04 | 1.36 | 1.11 |
| 11754 | 08/04 | - | - |
| 11754 | 10/04 | - | - |
| 11754 | 14/04 | - | - |
| 11835 | 08/04 | 1.14 | 1.13 |
| 11835 | 10/04 | 1.12 | 1.00 |
| 11835 | 14/04 | 1.09 | - |
| 11869 | 08/04 | - | - |
| 11869 | 10/04 | - | - |
| 11869 | 14/04 | - | - |
| 11874 | 08/04 | 1.09 | - |
| 11874 | 10/04 | 1.08 | - |
| 11874 | 14/04 | - | - |
| 12150 | 08/04 | - | - |
| 12150 | 10/04 | - | - |
| 12150 | 14/04 | - | - |

IS = (diâmetro halo + colônia) ÷ (diâmetro colônia). Dados agrupados dos dias 04, 06, 08, 10 e 14 de abril. (Quadros com “-“ significa que não houve halo de solubilização).

Fonte: Do autor (2025)

Conforme mostrado na Tabela 3, valores de IS variaram de 1,03 a 1,52 em PVK e de 1,0 a 1,32 em NBRIP ao longo das diferentes datas. Na literatura, Sarker et al. (2017) relataram que fungos rizosféricos considerados solubilizadores exibem IS entre 1,10 e 3,05, adotando 1,1 como valor-limite mínimo para classificar um isolado como positivo PMC.

Todos os isolados que mantiveram $IS \geq 1,1$ em pelo menos um dos dois meios podem ser considerados aptos a solubilizar fosfato de cálcio em placa. Isolados como 11799 ($IS \geq 1,15$ em todas as datas) destacam-se dentro dessa faixa, sugerindo ter capacidade de acidificar o meio; já valores próximos de 1,0, caso de 11824 em algumas leituras indicam atividade mais modesta e requerem confirmação em ensaio líquido. As médias de IS, foram calculadas com base em 3 repetições.

Os isolados de *Aspergillus* e *Penicillium* avaliados apresentaram índices de solubilização (IS) entre 0,95 e 1,52 em PVK e 0,93 e 1,44 em NBRIP. Tais valores se alinham ao intervalo de 1,10 – 3,05 relatado para fungos rizosféricos de café por Arias et al. (2023), confirmando que parte dos nossos isolados atinge o patamar mínimo operacional ($IS \geq 1,1$) necessário para classificação como solubilizadores de fosfato.

A cinética de halo distinguiu claramente os gêneros analisados. Isolados de *Aspergillus niger* acidificaram o meio rapidamente, gerando halos visíveis já nas primeiras 48 h, comportamento semelhante ao observado para o isolado PH1, que reduziu o pH do meio de 7,0 para 2,1 em 48 h e promoveu $IS > 3,0$ no estudo de Hussain et al. (2024). Em contraste, *Penicillium* formou halos apenas após 72 h, mas alguns isolados, como 12181, alcançaram IS próximos a 1,5 até o 8º dia, indicando uma liberação de ácidos orgânicos mais gradual.

A análise da atividade de fosfatase ácida extracelular (ACP) revelou ausência de correlação direta com o tamanho do halo. Por exemplo, o isolado *Penicillium* 11824 exibiu IS moderado ($\sim 1,15$) enquanto registrou a maior ACP ($\sim 2 \text{ U mL}^{-1}$). Já *A. niger* 11799 apresentou halos amplos, mas ACP intermediária ($\sim 0,85 \text{ U mL}^{-1}$). A independência parcial desses mecanismos também foi demonstrada por Zhang et al. (2023), que obtiveram mutantes de *Penicillium brocae* incapazes de secretar ácidos orgânicos (sem halo) mas com ACP preservada.

Sob perspectiva fisiológica, a convergência de acidificação e ACP explica grande parte da solubilização total de P. Ma et al. (2025) afirmaram que, em solos ácidos, a soma desses processos responde por até 70 % da variação na disponibilidade de P mobilizado por fungos. Desse modo, isolados que combinam IS elevado e ACP estável, casos de *A. niger* 11799, *Penicillium* 10120 e 12181 se destacam como potenciais candidatos na formulação de bioinoculantes capazes de fornecer P de forma rápida e contínua às culturas.

A secreção de ácidos orgânicos, sobretudo oxálico, também contribui para a imobilização de metais tóxicos no solo. Li et al. (2016) demonstraram que *Penicillium oxalicum* libera grandes

quantidades de ácido oxálico, formando precipitados de fosfato de metais pesados e reduzindo sua fitotoxicidade. Assim, os fungos com perfil duplo (alta acidificação e ACP) podem atuar simultaneamente como biofertilizantes de P e agentes de biorremediação.

Em síntese, o protocolo multiparamétrico adotado permitiu selecionar isolados com diferentes perfis de solubilização. *Aspergillus niger* 11799, *Penicillium* 10120 e 12181 reúnem atributos que justificam ensaios em casa de vegetação e campo para validar sua eficácia na redução de doses de fertilizante fosfatado em ambientes tropicais com baixa disponibilidade de P.

5.3 Índice de solubilização de isolados de *A.niger*

Durante as avaliações de halo nos meios sólidos, constatou-se que apenas nos dias 16/04 e 18/04 as zonas de clareamento puderam ser mensuradas com confiabilidade. A partir do terceiro dia de incubação, os isolados exibiram crescimento micelial tão vigoroso que o micélio cobriu quase toda a superfície da placa, fundindo-se ao halo de solubilização e impedindo qualquer leitura precisa do diâmetro de clareamento. Em outras palavras, nesses primeiros dois pontos temporais ainda havia contraste suficiente entre o halo e o micélio para determinar o índice de solubilização (IS). Logo depois, a expansão radial das colônias, especialmente dos isolados de *Aspergillus niger*, tornou impossível distinguir onde o halo terminava e onde o micélio começava, pois o micélio passou a invadir completamente a área antes ocupada pelo clareamento do meio.

Os índices de solubilização determinados exclusivamente para os isolados de *Aspergillus niger* estão resumidos na **Tabela 3**

Tabela 3 – Índice de Solubilização (IS) dos Isolados de *A.Niger*.

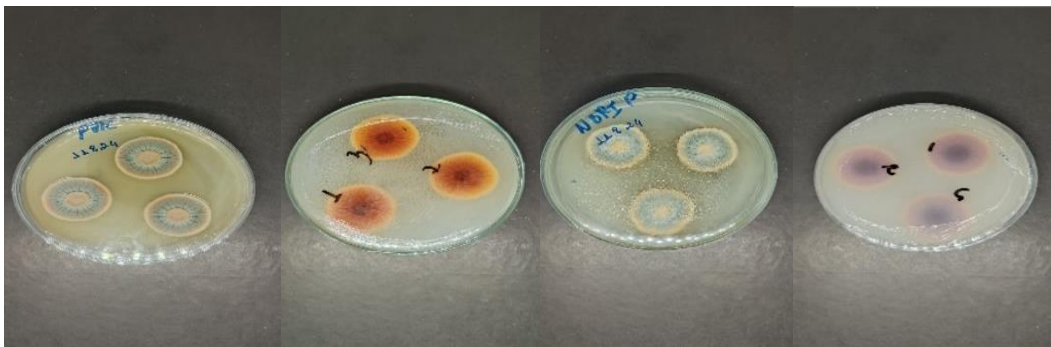
| Isolado | Data | IS PVK | IS NBRIP |
|---------|-------|--------|----------|
| 10120 | 16/04 | 1.23 | 1.00 |
| 10120 | 18/04 | 1.10 | 1.44 |
| 10407 | 16/04 | 1.13 | - |
| 10407 | 18/04 | 1.17 | - |
| 10462 | 16/04 | - | - |
| 10462 | 18/04 | - | - |
| 10470 | 16/04 | - | 0.93 |
| 10470 | 18/04 | - | 0.71 |
| 10502 | 16/04 | - | - |
| 10502 | 18/04 | - | - |
| 10590 | 16/04 | 1.27 | 1.12 |
| 10590 | 18/04 | 1.15 | 0.98 |

IS calculado como (diâmetro total de halo + colônia) ÷ (diâmetro da colônia). Ausência de valor indica ausência de halo detectável. Quadros marcados com “-“ significam ausência de halo de solubilização.

Fonte: Do autor (2025)

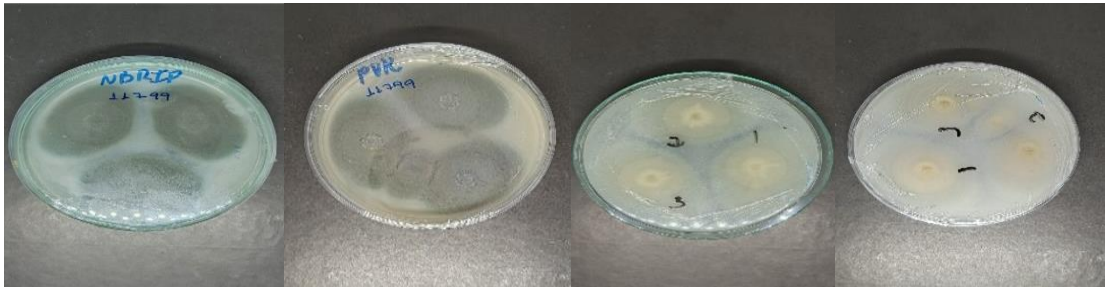
A Figura 1 mostra isolado 11824 em placas de PVK (imagens 1a e 1d) e de NBRIP (imagens 1b e 1c), fotografadas três dias após a medição final do halo de solubilização. Nesses registros, o micélio já se expandiu completamente pela superfície do meio, ocultando qualquer sinal visível de halo em ambos os meios. A face inferior das placas reforça essa invasão do agar pelo tecido fúngico, confirmando que, após esse período, torna-se inviável distinguir e mensurar o halo de clareamento. As imagens apresentadas na figura 2 retratam a placa do isolado 11799, três dias após a primeira medição do halo. A face superior mostra a ausência ou sutileza do halo em cada meio, enquanto a face inferior evidencia a distribuição do micélio e possíveis vestígios de clareamento.

Figura 1 – Placas do isolado 11824 em meios sólidos PVK e NBRIP)



Fonte: Do autor (2025)

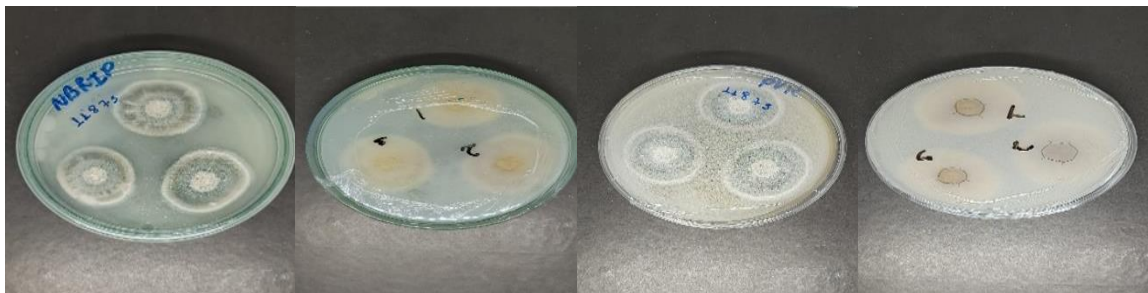
Figura 2 – Placa do isolado 11799, três dias após avaliação do halo, em meios PVK e NBRIP



Fonte: Do autor (2025)

As imagens presentes na Figura 3 ilustram o comportamento do isolado 11873, três dias após a medição final do halo, em placas de PVK e NBRIP, exibindo-se tanto a face superior quanto a face inferior. Nas imagens da face superior (3a e 3b) vê-se apenas o micélio ocupando integralmente o agar, sem qualquer sinal de halo visível em torno dos pontos de inoculação. Entretanto, ao inverter a placa de NBRIP (3c), percebe-se um halo sutil, uma ligeira zona de clareamento além da borda micelial que escapa à observação direta pela face superior. Já na face inferior da placa de PVK (3d), confirma-se a cobertura total do agar pelo micélio e a ausência de qualquer clareamento, evidenciando como, após esse período de crescimento vigoroso, apenas a translucidez do verso permite reconhecer vestígios de solubilização.

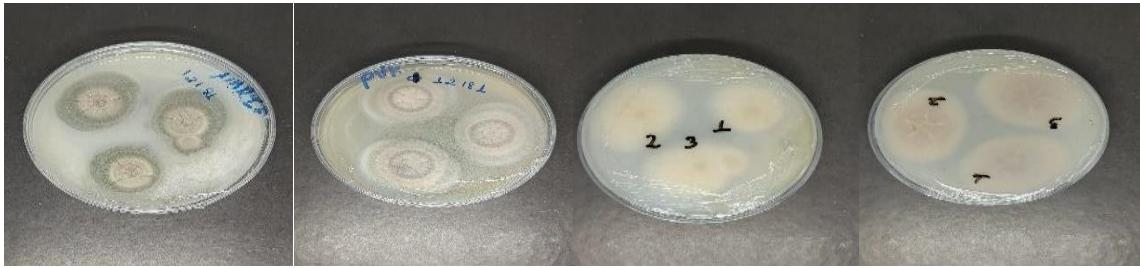
Figura 3 – Placa do isolado 11873, três dias após avaliação do halo, em meios PVK e NBRIP



Fonte: Do autor (2025)

A Figura 4 apresenta o isolado 12181 em placas de PVK e NBRIP, fotografadas três dias após a medição final do halo. Nas imagens da face superior, observa-se apenas o micélio cobrindo integralmente o agar, sem qualquer clareamento para delimitar o halo de solubilização. Ao inverter a placa (face inferior), confirma-se que o tecido fúngico preencheu toda a superfície, tornando impossível distinguir um halo visível, sinalizando que, após esse período, o crescimento vigoroso do micélio impede a mensuração do clareamento do meio.

Figura 4 – Placa do isolado 12181, três dias após a medição do halo, em meios PVK e NBRIP



Fonte: Do autor (2025)

O comportamento do isolado 12940 três dias após a mensuração inicial do halo, em placas de PVK e NBRIP, apresentadas em suas faces superior e inferior é mostrado na Figura 5. Na face superior das placas (5a e 5b), observa-se apenas o micélio cobrindo toda a superfície do agar, sem indícios visíveis de clareamento pericelular em nenhum dos meios. No entanto, ao inverter a placa de NBRIP (5c), torna-se possível distinguir, por translucidez, um halo extremamente tênue adjacente à borda do micélio, sinalizando uma atividade de solubilização muito discreta. A face inferior da placa de PVK (5d) reafirma que o micélio ocupou integralmente o meio, não havendo vestígios de halo, o que confirma que, após esse período de desenvolvimento fúngico intenso, a mensuração direta do clareamento do agar se torna inviável.

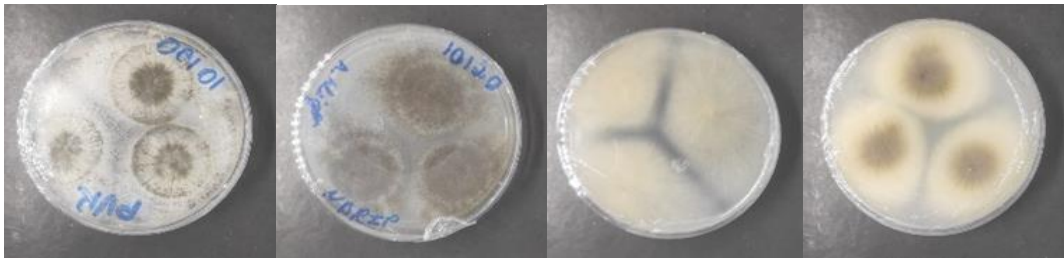
Figura 5 – Placa do isolado 12181, três dias após a medição do halo, em meios PVK e NBRIP



Fonte: Do autor (2025)

O isolado 10120 exibiu claramente halo de solubilização nos primeiros dois dias de incubação; contudo, a partir do terceiro dia o micélio cresceu de tal forma que se fundiu ao halo de clareamento, impossibilitando a distinção entre tecido fúngico e zona solubilizada (Figura 6) Por essa razão, não foi viável obter medições confiáveis além desse período inicial.

Figura 6 – Placa do isolado 10120, três dias após a medição do halo, em meios PVK e NBRIP



Fonte: Do autor (2025)

5.4 Determinação da Produção de p-Nitrofenol por Ensaio pNPP

Para calcular a atividade de fosfatase ácida extracelular de cada isolado, determinou-se, inicialmente, a variação de absorvância líquida (ΔA) subtraindo-se a leitura ao tempo zero (A_0) daquela obtida após 60 min de incubação a 37 °C (A_{1h}). Em seguida, aplicou-se a equação da curva-padrão:

$$\text{Abs} = 0,122 [\text{pNP}] + 0,021 \quad (R^2 = 0,991)$$

Aplicando a equação revisada da curva-padrão às réplicas de cada isolado, obtiveram-se as seguintes atividades médias: 10502 apresentou a menor atividade, cerca de 0,21 U·mL⁻¹, e 10590 registrou 0,35 U·mL⁻¹. O isolado 11824 destacou-se como o maior produtor de fosfatase, alcançando 1,97 U·mL⁻¹; entretanto, esse valor resultou de replicatas altamente discrepantes, exigindo nova verificação. Os isolados 12181 (0,77 U·mL⁻¹), 10120 (0,77 U·mL⁻¹) e 11799 (0,85 U·mL⁻¹) exibiram atividades intermediárias, próximas de 0,8 U·mL⁻¹, com coeficientes de variação entre 3 % e 13 %, indicando reprodutibilidade satisfatória. O isolado 11835, analisado em duplicata por limitação de reagente, atingiu 0,80 U·mL⁻¹; as duas leituras praticamente idênticas conferem confiança à média, embora uma terceira réplica ainda seja recomendável para estatística plena.

A atividade de fosfatase ácida extracelular medida para cada isolado, expressa em U·mL⁻¹, encontra-se na **Tabela 4**

Tabela 4 Atividade Enzimática dos Isolados

| Isolado | Réplicas (U·mL ⁻¹) | Média | DP | CV (%) |
|---------|--------------------------------|-------|-------|--------|
| 10502 | 0,241 • 0,260 • 0,126 | 0,209 | 0,073 | 35 |
| 10590 | 0,305 • 0,386 • 0,347 | 0,346 | 0,041 | 12 |
| 11824 | 2,814 • 2,814 • 0,294 | 1,970 | 1,450 | 74 |
| 12181 | 0,674 • 0,843 • 0,798 | 0,772 | 0,087 | 11 |
| 10120 | 0,722 • 0,700 • 0,885 | 0,769 | 0,101 | 13 |
| 11799 | 0,868 • 0,826 • 0,843 | 0,846 | 0,021 | 2,5 |
| 11835* | 0,801 • 0,804 | 0,802 | 0,002 | 0,3 |

Observação: A amostra 11835 foi feita em duplicata.

Fonte: Do autor (2025)

Os índices de solubilização (IS) obtidos neste trabalho, de 0,95 a 1,52 em PVK e 0,93 a 1,44 em NBRIP enquadram-se na faixa descrita recentemente para fungos rizosféricos. Para os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* oriundos de agroecossistemas tropicais, o IS costuma variar de ~1,1 até valores acima de 3 quando isolados de alto desempenho são testados em PVK ou NBRIP (ARIAS et al., 2023; BAO et al., 2024). Embora os nossos valores médios estejam mais próximos do limiar mínimo (1,10), isolados como 11799 e 10120 ultrapassaram 1,15 em pelo menos uma leitura, caracterizando-se como candidatos promissores para mobilizar fosfato insolúvel em placas.

A cinética do halo diferiu marcadamente entre os gêneros: *A. niger* formou clareamento já no primeiro dia de incubação, enquanto *Penicillium* só apresentaram halos nítidos a partir de 72 h, reflexo da maior taxa de crescimento micelial e da liberação súbita de ácidos orgânicos pelo primeiro (ARIAS et al., 2023). Ensaio recente com o isolado *A. niger* PHI, inclusive sob estresse por Pb, confirmam essa rapidez: em 48 h o pH do meio caiu de 7,0 para 2,1 e o IS superou 3,0, enquanto fungos de outros gêneros responderam mais lentamente (MORAIS-TANAKA et al., 2024).

Apesar de IS elevados sugerirem acidificação intensa, não se observou correlação direta com a atividade de fosfatase ácida extracelular. O isolado 11824, por exemplo, exibiu IS médios de 1,11–1,19 em PVK, mas apresentou a maior atividade enzimática (1,97 U mL⁻¹). Já 11799 manteve IS estável (> 1,15) e atividade moderada (~0,85 U mL⁻¹). Relações semelhantes foram relatadas por BAO et al. (2024) ao comparar *Pyrenochaetopsis tabarestanensis* e *A. niger*, reforçando que acidificação e hidrólise enzimática são mecanismos complementares, porém regulados por vias distintas.

As atividades de fosfatase registradas (0,21 a 1,97 U mL⁻¹) situam-se no intervalo usual compilado por JIA et al. (2024), que analisaram mais de cem ensaios e constataram que, em meios líquidos de pH ≈ 5, o pico raramente excede 2 U mL⁻¹. O alto coeficiente de variação de 11824 (≈ 74 %) indica que turbidez residual ou flutuações de pH podem ter superestimado a leitura, por isso

recomenda-se repetir o ensaio com clarificação do sobrenadante.

A ausência de halo no isolado 10502, concomitante a uma atividade enzimática residual de 0,21 U mL⁻¹, ilustra rotas alternativas de aquisição de fósforo. Mutantes de *Penicillium brocae* com inserção em gene de enolase perdem a secreção de ácidos orgânicos e, portanto, o halo mas preservam níveis basais de fosfatase, demonstrando que a regulação dessas enzimas pode ser independente do pH (ZHANG et al., 2023).

6. CONCLUSÃO

Os resultados confirmam que isolados de *Penicillium e Aspergillus niger* são capazes de transformar fosfato de cálcio insolúvel em formas assimiláveis, combinando acidificação do meio com atividade de fosfatase. Entre eles, destacaram-se especialmente os isolados 11799, 10120 e 12181 (*Penicillium*) e 10590 (*A. niger*), que aliaram halos amplos a taxas enzimáticas consistentes. Esses achados reforçam o potencial dos fungos solubilizadores como biofertilizantes para reduzir a dependência de fosfatos químicos, abrindo caminho para testes em casa de vegetação, formulações de inoculantes estáveis e ensaios de campo que avaliem ganhos reais de produtividade agrícola de forma sustentável.

REFERÊNCIAS

- ADNAN, M. et al. **Phosphate-solubilizing bacteria nullify the antagonistic effect of soil calcification on phosphorus bioavailability**. Scientific Reports, London, v. 7, art. 16131, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16537-5>.
- ALORI, E. T.; FAWOLE, O.; AFOLAYAN, A. **Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture**. Frontiers in Microbiology, Lausanne, v. 8, art. 971, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>.
- ARIAS, R. M. et al. **Selection and characterization of phosphate-solubilizing fungi and their effects on coffee plantations**. Plants, Basel, v. 12, art. 3395, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants12193395>.
- ASEA, P. E. A.; KUCEY, R. M. N.; STEWART, J. W. B. **Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil**. Soil Biology & Biochemistry, Oxford, v. 20, n. 5, p. 459-464, 1988. DOI: [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(88\)90058-2](https://doi.org/10.1016/0038-0717(88)90058-2).
- EIVAZI, F.; TABATABAI, M. A. **Phosphatases in soils**. Soil Biology & Biochemistry, Oxford, v. 9, n. 2, p. 167-172, 1977.
- GYANESHWAR, P. et al. **Viability and effectiveness of phosphate-solubilizing microorganisms as biofertilizers: prospects and challenges**. Plant and Soil, Dordrecht, v. 245, n. 1, p. 83-93, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1020663916259>.
- HUSSAIN, I. et al. **Phosphate-solubilizing *Aspergillus niger* PH1 ameliorates growth and alleviates lead stress in maize through improved photosynthetic and antioxidant response**. BMC Plant Biology, London, v. 24, art. 642, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05361-5>.
- ILLMER, P.; SCHINNER, F. **Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils**. Soil Biology & Biochemistry, Oxford, v. 24, p. 389-395, 1992. DOI: [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(92\)90199-8](https://doi.org/10.1016/0038-0717(92)90199-8).
- JATANA, B. S. et al. **Dual inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus-solubilizing fungi synergistically enhances the mobilization and plant uptake of phosphorus from meat and bone meal**. Frontiers in Soil Science, Lausanne, v. 1, art. 757839, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fsoil.2021.757839>.
- LI, Z. et al. **A study of organic-acid production in contrasts between two phosphate-solubilizing fungi: *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger***. Scientific Reports, London, v. 6, art. 25313, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep25313>.
- MA, Y. et al. **Phosphate-solubilizing fungi enhance insoluble-phosphate dissolution via organic-acid production: mechanisms and applications**. Frontiers in Microbiology, Lausanne, v. 16, art. 1600231, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1600231>.
- MAYADUNNA, Y. M. H. et al. **Complete genome sequence of *Nguyenibacter* sp. L1, a phosphate-solubilizing bacterium isolated from agricultural soil**. Frontiers in Microbiology, Lausanne, v. 14, art. 1257442, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1257442>.
- MENDES, G. O. et al. **Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources**. Annals of Microbiology, Berlin, v. 64, p. 239-249, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0656-3>.
- NANNIPIERI, P.; GIAGNONI, L.; LANDI, L.; RENELLA, G. **Role of phosphatase enzymes in soil**.

In: BÜNEMANN, E. K.; OBERSON, A.; FROSSARD, E. (org.). *Phosphorus in Action: Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling*. Berlin: Springer, 2011. p. 215-243.

OLIVEIRA, A. G. et al. **Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp.** *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, Mossoró, v. 7, n. 3, p. 149-155, 2012. DOI: <https://doi.org/10.18378/rvads.v7i3.1338>.

OLIVEIRA, L. M. de et al. **Diversity and multifunctional potential for plant-growth promotion in bacteria from soil and the rhizosphere.** *Soil Use and Management*, Hoboken, v. 40, e13082, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1111/sum.13082>.

PEÑALVA, M. A.; ARST JR., H. N. **Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Washington, v. 66, n. 3, p. 426-446, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.426-446.2002>.

PENG, Q. et al. **Mutation breeding of *Aspergillus niger* by atmospheric room-temperature plasma to enhance phosphorus-solubilization ability.** *PeerJ*, London, v. 10, e13076, 2022. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.13076>.

PEREA ROJAS, Y. del C. et al. **Effects of native arbuscular mycorrhizal and phosphate-solubilizing fungi on coffee plants.** *Agroforestry Systems*, Dordrecht, v. 93, n. 3, p. 961-972, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10457-019-00361-w>.

RAJANI, L. et al. **Plant growth promotion under phosphate deficiency and improved phosphate acquisition by new fungal strain *Penicillium olsonii* TLL1.** *Frontiers in Microbiology*, Lausanne, v. 14, art. 1285574, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1285574>.

RICHARDSON, A. E. **Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants.** *Australian Journal of Plant Physiology*, Melbourne, v. 28, n. 9, p. 897-906, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1071/PP01084>.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. **Phosphate-solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion.** *Biotechnology Advances*, Oxford, v. 17, n. 4-5, p. 319-339, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2).

SHARMA, S. B.; SAYYED, R. Z.; TRIVEDI, M. H.; GOBI, T. A. **Phosphate-solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils.** SpringerPlus, Berlin, v. 2, art. 587, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>.

SINSABAUGH, R. L.; FAGE, C.; HINES, A.; et al. **Ecoenzymatic stoichiometry of microbial organic nutrient acquisition.** *Ecology Letters*, Hoboken, v. 11, n. 10, p. 1252-1264, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01244.x>.

SUN, R. et al. **Influencing factors of phosphate-solubilizing capacity of *Aspergillus niger* and optimization of its culture condition.** *Chinese Journal of Applied Ecology*, Shenyang, v. 31, n. 6, p. 1963-1970, 2020. DOI: <https://doi.org/10.13287/j.1001-9332.202006.033>.

TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. **Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity.** *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, v. 1, p. 301-307, 1969.

TIAN, D. et al. **The utilization of phosphogypsum as a sustainable phosphate-based fertilizer by *Aspergillus niger*.** *Agronomy*, Basel, v. 12, art. 646, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy12030646>.

TIAN, D. et al. **Lead remediation is promoted by phosphate-solubilizing fungi and apatite via the**

enhanced production of organic acid. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Lausanne, v. 11, art. 1180431, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1180431>.

TIAN, D. et al. **Heavy-metal remediation using phosphate-solubilizing fungi: from bioprocess to application.** *Agronomy*, Basel, v. 14, n. 11, art. 2638, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy14112638>.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. **Manual de normalização e estrutura de trabalhos acadêmicos: TCCs, monografias, dissertações e teses.** 5. ed. Lavras: UFLA, 2024. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/58933>. Acesso em: 18 maio 2025.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; FENICE, M.; FEDERICI, F. **Immobilized-cell technology applied in solubilization of insoluble inorganic (rock) phosphates and P-plant acquisition.** *Bioresource Technology*, Oxford, v. 79, n. 3, p. 263-271, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00017-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00017-7).

XU, K. et al. **Effects of phosphate-solubilizing fungus *Aspergillus flavus* AF-LRH1 on promoting phosphorus solubilization, wheat growth and soil heavy-metal remediation.** *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Amsterdam, v. 12, n. 6, art. 114357, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.114357>.

ZHANG, J. et al. **T-DNA insertion mutagenesis in *Penicillium brocae* identifies an enolase mutant impaired in organic-acid secretion and phosphate solubilization.** *Microbiology*, Reading, v. 169, 001325, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.001325>.