



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Hellen Natalia Cardoso Malheiro

**Solubilização de fosfato por *Aspergillus* sp e *Penicillium*
sp em condições de déficit hídrico**

CAMPO GRANDE – MS

JUNHO – 2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL – UFMS
Campus de CAMPO GRANDE
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - INBIO

**Solubilização de fosfato por *Aspergillus* sp e *Penicillium*
sp em condições de déficit hídrico**

**Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de Mato
Grosso do Sul, como parte dos requisitos para
a obtenção do título de bacharel em Ciências
Biológicas.**

Aluna: Hellen Natalia Cardoso Malheiro

Orientadora: Fabiana Fonseca Zanoelo

CAMPO GRANDE – MS

JUNHO – 2025

FOLHA DE APROVAÇÃO

Hellen Natalia Cardoso Malheiro

Solubilização de fosfato por *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp em condições de déficit hídrico

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências (INBIO) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), como parte dos requisitos para a obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a Fabiana Fonseca Zanoelo - Orientadora

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS

Dr^a Clarice Rossato Marchetti

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS

Prof Dr Douglas Chodi Masui

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS

Campo Grande

16 de Junho de 2025

AGRADECIMENTOS

A realização deste Trabalho de Conclusão de Curso representa a concretização de uma importante etapa da minha vida acadêmica e pessoal. Gostaria de expressar minha sincera gratidão a todos que, de alguma forma, contribuíram para que este momento se tornasse possível.

Primeiramente, agradeço a Deus, por me conceder força, saúde e sabedoria ao longo desta caminhada.

Aos meus pais e minha irmã, pelo apoio em todos os momentos e por acreditarem em mim, mesmo quando eu mesmo duvidei.

A minha orientadora, Fabiana Fonseca Zanoelo, por toda a paciência, dedicação e orientação ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Sua experiência e inteligência foram fundamentais para a construção deste projeto.

Aos professores e colegas do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos, que contribuíram com conhecimentos, debates e amizade durante toda a jornada acadêmica.

Por fim, agradeço às minhas amigas Evelyn e Kiara que me acompanharam nos momentos difíceis e celebraram comigo cada pequena conquista. Vocês tornaram essa trajetória mais leve e significativa.

Resumo

O fósforo é essencial para o desenvolvimento vegetal, mas sua baixa disponibilidade nos solos compromete a produtividade agrícola, exigindo o uso intensivo de fertilizantes fosfatados. No entanto, até 70% do fósforo aplicado torna-se indisponível para as plantas, favorecendo a contaminação ambiental. A escassez hídrica é outro fator que afeta a produtividade agrava esse cenário, tornando relevante o uso de microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) com tolerância à seca. Dessa maneira, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial dos fungos *Aspergillus sp* e *Penicillium sp* como solubilizadores de fosfato sob déficit hídrico simulado com PEG. Os fungos foram mantidos em laboratório através de repiques periódicos em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) a 35° C. A capacidade de solubilização de fosfato foi avaliada em meio líquido Pikovskaya contendo $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 , FePO_4 e fertilizantes comerciais (Termo Fino, Termo Forte, Termo Gran, Tal Qual e MV27), com e sem PEG. Também foi avaliada a produção das enzimas fitase e fosfatase ácida em meio TLE, utilizando casca de arroz, farinha de soja e palha de milho como fontes de carbono em 3, 5, 7 e 10 dias. Ambos os fungos solubilizaram as três fontes de fosfato inorgânico, com valores entre 12 e 367 $\mu\text{g P/mL}$. *Penicillium sp.* apresentou os maiores índices, alcançando 367 $\mu\text{g P/mL}$ com AlPO_4 na presença de PEG. A solubilização de fertilizantes variou de 0,27 a 733 $\mu\text{g P/mL}$, sendo os maiores valores registrados com *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.* em sete dias com PEG, nos fertilizantes Termo Forte Simplex e Termofosfato Gran, respectivamente. Na produção de fosfatase ácida, *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.* atingiram 173,5 e 208 U/mL, respectivamente, com farinha de soja em 5 dias. Para fitase, os maiores valores foram 2,230 U/mL para *Aspergillus sp.* e 1,720 U/mL para *Penicillium sp.*, ambos com casca de arroz em 10 dias. Os resultados evidenciam o potencial desses fungos como bioinsumos promissores para promover a disponibilidade de fósforo em condições de estresse hídrico, reduzindo a dependência de fertilizantes químicos.

Palavras-chave: agricultura, enzimas, fungos promotores de crescimento vegetal e seca.

ABSTRACT

Phosphorus is essential for plant development, but its low availability in soils compromises agricultural productivity, requiring intensive use of phosphate fertilizers. However, up to 70% of applied phosphorus becomes unavailable to plants, contributing to environmental contamination. Water scarcity further exacerbates this scenario, making the use of drought-tolerant phosphate-solubilizing microorganisms (PSMs) particularly relevant. Thus, this study aimed to evaluate the potential of *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. as phosphate solubilizers under water deficit simulated with PEG. The fungi were maintained in the laboratory through periodic subculturing on Potato-Dextrose-Agar (PDA) at 35°C. Phosphate solubilization capacity was assessed in liquid Pikovskaya medium containing $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 , FePO_4 , and commercial fertilizers (Termo Fino, Termo Forte, Termo Gran, Tal Qual, and MV27), with and without PEG. Additionally, the production of phytase and acid phosphatase enzymes was evaluated in TLE medium using rice husk, soybean meal, and corn stover as carbon sources at 3, 5, 7, and 10 days. Both fungi solubilized the three inorganic phosphate sources, with values ranging from 12 to 367 $\mu\text{g P/mL}$. *Penicillium* sp. showed the highest indices, reaching 367 $\mu\text{g P/mL}$ with AlPO_4 in the presence of PEG. Fertilizer solubilization ranged from 0.27 to 733 $\mu\text{g P/mL}$, with the highest values recorded for *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. after seven days with PEG, in the fertilizers Termo Forte Simplex and Termofosfato Gran, respectively. Regarding acid phosphatase production, *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. reached 173.5 and 208 U/mL, respectively, using soybean meal on day 5. For phytase, the highest values were 2.230 U/mL for *Aspergillus* sp. and 1.720 U/mL for *Penicillium* sp., both with rice husk on day 10. The results highlight the potential of these fungi as promising bioinputs to enhance phosphorus availability under water stress conditions, reducing the dependence on chemical fertilizers.

Keywords: Agriculture, Drought, Enzymes and Plant Growth-Promoting Fungi.

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcento
µg	micrograma
p-NPP	para-nitrofenolfosfato
µL	microlitro
AlPO ₄	fosfato de alumínio
BDA	ágar dextrose batata
Ca ₃ (PO ₄) ₂	fosfato de tricálcio
DNS	ácido 3,5-dinitrosalicílico
Fe	ferro
FePO ₄	fosfato de ferro
g	grama
KH ₂ PO ₄	fosfato de potássio monobásico
M	molar
MgSO ₄	sulfato de magnésio
mL	mililitro
mM	milimolar
MnSO ₄	sulfato de manganês
N	nitrogênio
NaOH	hidróxido de sódio
NaCl	cloreto de sódio
nm	nanômetro

°C	grau Celsius
P	fósforo
pH	potencial de hidrogênio iônico rotação
TLE	Trichoderma liquid enzyme

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Microorganismos solubilizadores de fosfato	12
1.2 Solubilização do fosfato	14
1.3 Mineralização do fósforo	15
2 OBJETIVO GERAL	19
2.1 Objetivos específicos	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Origem e manutenção dos microrganismos	20
3.2 Avaliação da solubilização de fosfato	20
3.3 Quantificação de P solúvel	21
3.4 Preparação de reagente colorimétrico de Murphy e Riley (1962)	21
3.5 Produção de enzimas fitase e fosfatase	21
3.6 Dosagem de fitase	22
3.7 Dosagem de fosfatase ácida	22
3.8 Análise dos resultados	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1 Solubilização de P	23
4.2 Solubilização de fosfato utilizando fertilizantes comerciais	25
4.3 Produção de ácidos orgânicos	27
4.4 Fosfatase ácida e fitase	28
5 CONCLUSÃO	32

1- Introdução

Para atender à crescente demanda por alimentos de uma população mundial que pode alcançar 9,6 bilhões de pessoas até 2050 (ONU, 2013), a agricultura tem intensificado o uso de fertilizantes químicos. Em 2019, o consumo global desses insumos chegou a 188,2 milhões de toneladas (IFA, 2020), refletindo a busca por maior produtividade. No entanto, esse modelo de intensificação agrícola levanta sérias preocupações quanto à sustentabilidade e aos impactos ambientais.

A fertilidade do solo é um fator crucial para o desenvolvimento saudável das plantas e o sucesso das atividades agrícolas, pois está diretamente relacionada à disponibilidade de nutrientes essenciais ao crescimento vegetal. Contudo, muitos solos ao redor do mundo, incluindo os do Brasil, apresentam deficiências naturais desses nutrientes, o que limita o potencial produtivo das lavouras. Para contornar esse problema, a agricultura moderna recorre amplamente aos fertilizantes químicos, que corrigem essas carências nutricionais e elevam os rendimentos, especialmente diante do aumento populacional e da pressão sobre a produção de alimentos. Entretanto, é fundamental buscar um equilíbrio entre o suprimento adequado de nutrientes e a adoção de práticas sustentáveis, que preservem a fertilidade do solo a longo prazo e reduzam os impactos negativos ao meio ambiente (CHANDRASEKARAN et al., 2021).

No Brasil, aproximadamente 7,6% a 7,8% do território nacional é destinado à agricultura, e o país figurou, em 2020, como o quarto maior produtor agrícola do mundo, atrás apenas de China, Estados Unidos e Índia. Contudo, a guerra entre Rússia e Ucrânia provocou a suspensão da exportação de fertilizantes ao Brasil, gerando uma crise no setor. Essa interrupção resultou em aumentos expressivos nos preços dos insumos, afetando a produção agrícola global e ampliando a instabilidade no setor agropecuário (SEIXAS, 2022).

Além disso, o crescimento populacional tem impulsionado não apenas a demanda por alimentos, mas também a geração de resíduos orgânicos. Nesse cenário, torna-se cada vez mais importante desenvolver estratégias que aliem o reabastecimento dos solos com nutrientes essenciais à reutilização de resíduos, promovendo uma agricultura mais eficiente e ambientalmente responsável (PAJURA, 2024).

A baixa fertilidade natural dos solos brasileiros, sobretudo pela limitação em fósforo (P), representa um dos principais entraves à alta produtividade agrícola (OLIVEIRA et al., 2021). Esse nutriente é essencial para o desenvolvimento vegetal, mas sua disponibilidade é particularmente reduzida em regiões tropicais e subtropicais, devido à elevada capacidade de fixação dos íons fosfato por óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio, formando compostos estáveis e pouco acessíveis às plantas (SOUCHIA, 2005).

Diante dessa limitação, torna-se necessária a aplicação de fertilizantes fosfatados para suprir as demandas nutricionais das culturas. No entanto, o uso excessivo e, por vezes, ineficiente desses insumos pode gerar sérios impactos ambientais, como a acidificação do solo, a contaminação de corpos hídricos por lixiviação e o aumento da emissão de gases de efeito estufa (GUO et al., 2025). Em sistemas de cultivo perenes, visando à redução de custos, é comum a utilização de fertilizantes de baixa solubilidade, o que pode acentuar ainda mais o problema da fixação do fósforo no solo. Com o constante crescimento populacional e a conseqüente intensificação da demanda por alimentos, torna-se urgente otimizar o uso dos recursos naturais. Isso implica em adotar práticas agrícolas que promovam o uso racional de fertilizantes e a conservação do solo, contribuindo para a sustentabilidade da produção agrícola (XU et al., 2024).

1.1 Microrganismos solubilizadores de fosfato (MSP)

Embora os fertilizantes sintéticos contribuam para o crescimento das culturas, sua eficiência na absorção de nutrientes pelas plantas é limitada. Grande parte dos nutrientes aplicados, como nitrogênio, fósforo e potássio, acaba se perdendo antes de alcançar as raízes, devido a processos como lixiviação (é o processo de carreamento de nutrientes pelo excesso de água (chuvas ou irrigação) para camadas mais profundas do solo, afastando-os das raízes das plantas. Isso reduz a absorção e pode causar contaminação de águas subterrâneas), imobilização (refere-se à retenção de nutrientes pelos microrganismos do solo, que os utilizam para sua própria sobrevivência. Esses nutrientes ficam temporariamente indisponíveis para as plantas, mesmo estando presentes no solo), fotólise (é a quebra de moléculas pela ação da luz solar. Alguns nutrientes, como o nitrogênio em determinadas formas, podem ser degradados ou perdidos da superfície do solo devido à luz, diminuindo sua disponibilidade para as plantas) e decomposição microbiana (Microrganismos do solo quebram compostos dos fertilizantes, transformando-os em outras substâncias. Em alguns casos, isso pode levar à volatilização ou perda de nutrientes, antes que as plantas consigam absorvê-los). Essa ineficiência representa um desafio importante para a agricultura moderna, comprometendo a sustentabilidade dos sistemas produtivos (KLIMASMITHI & KENT, 2022).

Nesse contexto, os microrganismos solubilizadores de fosfato (MSP) surgem como alternativa promissora e sustentável. Esses organismos, que incluem bactérias e fungos, são capazes de converter formas insolúveis de fósforo presentes no solo em formas assimiláveis pelas plantas. Além disso, muitos MSPs produzem hormônios vegetais como auxinas, giberelinas e citocininas, que promovem o crescimento vegetal, além de enzimas e

compostos com ação contra patógenos, contribuindo para a resistência das plantas a estresses bióticos e abióticos (ETESAMI et al., 2021).

Os MSP se destacam como bioinoculantes eficazes (é um tipo específico de inoculante, formado exclusivamente por microrganismos vivos benéficos, usados na agricultura), com potencial para reduzir o uso de fertilizantes químicos e aumentar a eficiência nutricional. Eles atuam de forma direta na solubilização de fosfatos, mas também desempenham outras funções importantes, como a fixação biológica de nitrogênio, disponibilização de potássio e biorremediação de solos contaminados por metais pesados (RAWAT et al., 2020). Sua aplicação pode ser feita de diversas formas: diretamente no solo, no tratamento de sementes ou por meio de compostos orgânicos, visando aumentar a população de microrganismos benéficos no ambiente agrícola (DIN et al., 2019).

A interação entre raízes e microrganismos da rizosfera, como fungos e bactérias, é outro mecanismo relevante para a nutrição das plantas. Esses microrganismos vivem próximos ou aderidos às raízes e estabelecem relações simbióticas ou associativas que beneficiam ambos os organismos. Fungos micorrízicos, por exemplo, colonizam as raízes e funcionam como uma extensão delas, ampliando significativamente a área de absorção de água e nutrientes, especialmente o fósforo, que tem baixa mobilidade no solo. Além disso, esses fungos produzem ácidos orgânicos (como cítrico e oxálico) e enzimas (como fosfatases e fitases), que atuam na solubilização de fosfatos insolúveis, facilitando sua assimilação pelas plantas. Essa interação também contribui para a estruturação do solo, proteção contra patógenos e maior tolerância ao estresse ambiental (GADD, 2014; REICHERT et al., 2022).

O uso desses microrganismos contribui não apenas para o aumento da produtividade agrícola, mas também para a saúde do solo e a sustentabilidade dos agroecossistemas. Estudos demonstram que a aplicação conjunta de MSP com fertilizantes fosfatados pode reduzir a dosagem de insumos necessários, melhorar a absorção de fósforo e aumentar os rendimentos das culturas (RAWAT et al., 2021). Além disso, eles participam do controle biológico de doenças por meio de múltiplos mecanismos, como a competição por nutrientes e espaço na rizosfera, a produção de enzimas líticas (como quitinases e glucanases que degradam a parede celular de fitopatógenos), a liberação de compostos antimicrobianos (ex. sideróforos, antibióticos naturais), e a indução de resistência sistêmica nas plantas, que ativa respostas de defesa. Essas interações benéficas também promovem a biodiversidade microbiana no solo e ajudam a restaurar áreas degradadas, tornando os MSP aliados importantes para práticas agrícolas mais resilientes e de baixo impacto ambiental.

A simbiose entre fungos e plantas desempenha papel fundamental tanto em ecossistemas naturais quanto agrícolas, auxiliando as plantas a lidar com o estresse hídrico e melhorando sua tolerância à seca. Essa interação simbiótica envolve diversos mecanismos, como a produção de substâncias que protegem contra o estresse oxidativo, a promoção do crescimento vegetal e o aumento da absorção de água e nutrientes. Plantas resistentes à seca apresentam estratégias para minimizar danos nas membranas celulares e sintetizam proteínas que elevam a capacidade de retenção hídrica das células, adaptando-se às condições ambientais adversas. A associação entre fungos micorrízicos e plantas constitui uma aliança vital para essa adaptação, já que fungos endófitos auxiliam as plantas a prosperar em solos pobres, tolerar a seca e a salinidade, além de contribuírem para a obtenção de ferro e outros nutrientes essenciais. Dessa forma, os fungos simbiotes representam um recurso genético importante para o desenvolvimento de plantas com maior resistência a estresses ambientais, como a dessecação (BAHADUR et al, 2019; PERUMAL et al., 2025).

Portanto, os MSP representam uma estratégia inovadora e ecologicamente viável para otimizar o uso do fósforo nos sistemas agrícolas, contribuindo para a sustentabilidade da produção e a preservação dos recursos naturais (XU et al., 2024).

1.2 Solubilização do fosfato

É amplamente aceito que a solubilização microbiana do fosfato baseia-se principalmente na produção de ácidos orgânicos ou na liberação de prótons, os quais atuam sobre a estrutura dos fosfatos inorgânicos presentes no solo. Um dos mecanismos mais importantes envolve a quelação de cátions, especialmente o cálcio, pelos grupos hidroxila e carboxila dos ácidos orgânicos produzidos por microrganismos. Essa quelação rompe os complexos fosfatados, convertendo o fosfato insolúvel em formas assimiláveis pelas plantas (VASSILEVA et al., 2022). A produção desses ácidos também acidifica o meio, o que intensifica a solubilização do fosfato.

A liberação de ácidos orgânicos pelos microrganismos solubilizadores de fosfato (MSPs) ocorre principalmente por vias metabólicas como fermentação, respiração de compostos orgânicos de carbono e oxidação direta. Durante a fermentação, especialmente em condições de baixa disponibilidade de oxigênio, os microrganismos convertem açúcares simples (como glicose) em compostos como ácido láctico, ácido acético e ácido succínico, que são liberados no meio. Na respiração aeróbica, o carbono de compostos orgânicos é degradado com a presença de oxigênio, gerando energia e liberando subprodutos como

ácido cítrico e ácido málico. Já na oxidação direta, os microrganismos podem converter compostos reduzidos (como álcoois ou açúcares) em ácidos orgânicos por meio de reações enzimáticas específicas, mesmo sem completar o ciclo respiratório. Entre os ácidos mais comumente excretados estão o ácido cítrico, ácido glucônico, ácido oxálico e ácido tartárico. Esses compostos de baixo peso molecular promovem a acidificação localizada ao redor dos microrganismos, liberando o fosfato de complexos minerais por meio da troca de prótons com cátions (como Fe^{3+} e Al^{3+}) ou pela substituição direta do fosfato (PO_4^{3-}) por ânions orgânicos. Embora também se observe a liberação de ácidos inorgânicos — como ácido clorídrico (HCl), ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido nítrico (HNO_3) e ácido carbônico (H_2CO_3) — e de gás sulfídrico (H_2S), esses mecanismos apresentam menor eficiência na solubilização do fosfato em comparação aos ácidos orgânicos (SHARMA et al., 2013).

Outro mecanismo relevante é a extrusão de prótons durante a assimilação de amônio (NH_4^+). Quando o NH_4^+ presente no solo é incorporado pelos MSPs para a síntese de aminoácidos, ele é convertido intracelularmente em amônia (NH_3), liberando prótons (H^+) no citoplasma. Esses prótons são exportados para o meio externo, acidificando a rizosfera e promovendo a solubilização de fosfatos insolúveis (ZHANG et al., 2022).

Além dos mecanismos diretos, os MSP também contribuem indiretamente para a liberação de fosfato por meio da lise celular em condições de estresse, liberando o fosfato intracelular, que pode então ser absorvido por plantas e outros organismos do solo. Entre as rotas metabólicas específicas, destaca-se a oxidação direta da glicose, que é convertida em ácido glucônico pela ação da glicose desidrogenase e posteriormente transformada em ácido 2-cetoglucônico pela gluconato desidrogenase. Esses ácidos agem como quelantes de minerais como Ca^{2+} e Fe^{2+} , liberando o fosfato antes associado a eles (ALORI et al., 2017).

Outros mecanismos complementares incluem a produção de exopolissacarídeos (EPS) — polímeros excretados por microrganismos em resposta ao estresse — que formam complexos com íons metálicos do solo, aumentando a biodisponibilidade de nutrientes. Além disso, os microrganismos podem produzir sideróforos, compostos quelantes de ferro de baixo peso molecular e alta afinidade, que capturam íons férricos (Fe^{3+}) e os tornam disponíveis em ambientes com deficiência de ferro. Esses sideróforos são os agentes complexantes de ferro mais eficientes conhecidos e também desempenham papel relevante na dinâmica do fósforo (ETESAMI, 2021).

1.3 Mineralização do fosfato

O fosfato presente em material biológico em decomposição e/ou na forma de fitato pode ser clivado e absorvido pelos microrganismos e plantas, por um processo conhecido como mineralização. Esse processo envolve a ação de enzimas como fitases e fosfatases (LI J et al., 2021).

As fitases microbianas são enzimas que desempenham um papel crucial na decomposição do ácido fítico (ou fitato), uma forma comum de armazenamento de fósforo presente tanto no solo quanto em sementes. Essas enzimas hidrolisam o ácido fítico, liberando mio-inositol e fosfatos inorgânicos, que se tornam disponíveis para absorção pelas plantas, especialmente em solos com baixos teores de fósforo assimilável (JOUDAKI et al., 2023). E são conhecidas tecnicamente como mio-inositol hexafosfato fosfohidrolases, também apresentam elevada atividade catalítica em uma faixa de pH que varia entre 2,5 e 6,5 e são termoestáveis, funcionando eficientemente em temperaturas de 50 a 60 °C. Elas são predominantemente extraídas de fungos filamentosos, embora também sejam amplamente encontradas em bactérias, plantas e animais (DOTSENKO et al., 2022). As fitases são classificadas de acordo com sua estrutura proteica e mecanismo catalítico, iniciando a remoção sequencial dos grupos fosfato do fitato em diferentes posições, dependendo do tipo de enzima. As fitases microbianas, em especial, destacam-se por sua alta estabilidade e atividade prolongada, o que as torna promissoras (RIX et al., 2022).

Embora o fitato represente uma importante reserva de fósforo orgânico no solo e em tecidos vegetais como sementes e pólen, sua utilização direta pelas plantas é limitada. Nesse contexto, os microrganismos desempenham um papel essencial na mineralização do fitato, contribuindo significativamente para a liberação de fósforo assimilável, o que melhora a nutrição vegetal e a eficiência do uso de fertilizantes (RAWAT et al., 2021).

As fosfatases pertencem às classes das hidrolases, responsáveis por catalisar a quebra de ésteres de fosfato, desempenhando um papel essencial na liberação de fósforo inorgânico (Pi). Assim como as fitases, são enzimas distribuídas na natureza, sendo encontradas em plantas, animais, fungos e bactérias, o que evidencia sua importância em diversos processos metabólicos (ALSHAMI et al., 2022). As fosfatases fazem parte do grupo de enzimas conhecidas como fosfo-monoesterases, e podem ser classificadas em dois tipos principais de acordo com o pH ótimo de atuação: fosfatases ácidas e fosfatases alcalinas. Microrganismos solubilizadores de fosfato produzem ambas, sendo que as ácidas predominam em solos com pH baixo, enquanto as alcalinas são mais ativas em solos neutros ou alcalinos. Essas enzimas atuam na mineralização do fósforo orgânico, quebrando compostos como fosfoésteres e fosfoanidridos, e liberando fósforo disponível para absorção pelas plantas (RAWAT et al., 2020).

Em solos com maior presença de matéria orgânica, as fosfatases alcalinas têm destaque, podendo ser responsáveis por hidrolisar até 90% do fósforo orgânico presente. A

produção dessas enzimas por microrganismos do solo está relacionada à sua afinidade por fósforo orgânico (é a forma de fósforo que está ligada a moléculas orgânicas, como fitato, ácidos nucleicos, fosfolipídios e resíduos de plantas ou microrganismos), sendo regulada principalmente pela demanda das plantas e pela disponibilidade do nutriente no ambiente.

Durante condições de deficiência de fósforo, ocorre a indução da fosfatase ácida intracelular (IAP), cuja principal função é reciclar o fósforo orgânico presente no interior das células, contribuindo para a manutenção da homeostase do Pi e permitindo a adaptação das plantas ao estresse nutricional (DENG et al., 2022).

Em regiões onde o intemperismo geológico é acentuado (as rochas e minerais sofrem grande decomposição), a disponibilidade de fósforo inorgânico facilmente assimilável tende a ser limitada. Nessas condições, o fósforo orgânico mineralizado por fosfatases se torna uma fonte crucial para a nutrição vegetal. No entanto, a expressão e a atividade dessas enzimas também dependem de fatores ambientais como pH, temperatura, e a concentração de nitrogênio no solo — este último podendo limitar sua síntese (GILES et al., 2022). Essa dinâmica é particularmente crítica em regiões semiáridas, onde a seca prolongada reduz a atividade microbiana e a disponibilidade de nutrientes, agravando as limitações nutricionais das plantas.

Em contextos de estresse hídrico, os microrganismos solubilizadores de fosfato (MSP) assumem papel fundamental na promoção do crescimento vegetal. Esses organismos, incluindo bactérias (ex: *Pseudomonas* e *Bacillus*) e fungos (ex: *Aspergillus* e *Penicillium*), atuam na solubilização de formas insolúveis de fósforo, tornando-o disponível para as plantas mesmo em condições de seca (PANG et al., 2024; WANG et al., 2025). Estudos demonstram que solos sob estresse hídrico apresentam maior dependência desses microrganismos para a ciclagem de nutrientes, destacando seu potencial como estratégia de mitigação dos efeitos da seca na agricultura (ALIKHAN et al., 2022). Portanto, entender como a seca afeta o fósforo no solo e a ação dos microrganismos solubilizadores (MSP) é crucial para criar uma agricultura mais resistente, principalmente em regiões, onde esses problemas são mais graves.

A seca impõe desafios significativos à disponibilidade e absorção de fósforo pelas plantas, uma vez que limita a atividade biológica no solo e reduz a mobilidade dos nutrientes. Nesse cenário, os microrganismos solubilizadores de fosfato (MSP) desempenham um papel vital, pois são capazes de persistir e continuar a liberar fósforo disponível mesmo sob déficit hídrico. A resistência desses microrganismos ao estresse causado pela seca, associada à sua capacidade de solubilizar fosfatos insolúveis, torna-os agentes-chave para melhorar a nutrição vegetal em condições adversas (KOUR, D. et al.

(2019). Assim, a utilização de MSP representa uma estratégia promissora para aumentar a resiliência dos sistemas agrícolas frente às condições semiáridas e áridas.

2 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial dos fungos *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.* como solubilizadores de fosfato em condições normais e de déficit hídrico.

2.1 Objetivos específicos

- Testar a solubilização de fosfato *in vitro* por *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.* em condições normais e de déficit hídrico;
- Avaliar diferentes fontes fosfatadas e fertilizantes comerciais para solubilização de fosfato em condições normais e de déficit hídrico em diferentes tempos de incubação;
- Avaliar a capacidade de produção de enzimas (fitase e fosfatase ácida) em condições normais e de déficit hídrico utilizando diferentes fontes de carbono.

3. Material e Métodos

3.1 Origem e manutenção dos microrganismos

Os fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp utilizados neste estudo foram isoladas de amostras de raízes de *Discocactus ferricola* Buining & Brederoo (Cactaceae) de um afloramento rochoso localizado na Fazenda São João (19° 10'46.2"S, 57° 32'19.1"W), em Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil. Após o isolamento, os fungos foram submetidos à identificação morfológica, em seguida foram depositados na Micoteca do Instituto de Biociências (INBIO) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Os microrganismos foram mantidos em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) a 35°C de 7-10 dias e depois armazenados em geladeira a 4°C podendo ser utilizados até 20 dias após a semeadura. O preparo do meio BDA se deu utilizando 200 g de batata sem casca, 13g de ágar-ágar, 20g de dextrose/glicose e 1000 mL de água destilada. A batata foi cozida, depois filtrada e amassada em gaze, e com o sumo resultante foi adicionado a dextrose, ágar e completado o volume até 1000 mL. O material foi autoclavado por 20 minutos a 1,5 kgf/cm².

3.2 Avaliação da solubilização de fosfato

A padronização seguiu a metodologia *one-factor-at-a-time* (OFAT), a qual foi empregada um teste por vez a fim de padronizar as melhores condições para avaliar a solubilização de fosfato dos fungos em condições normais e de déficit hídrico.

A capacidade dos isolados em solubilizar fosfato foi avaliada em meio líquido Pikovskaya(1948), na presença de fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), fosfato de alumínio (AlPO_4) e fosfato de ferro (FePO_4). Também foram testados os fertilizantes comerciais: Termo Fino (14% P_2O_5), MV27 (27% P_2O_5), Termo Forte (11% P_2O_5), Tal Qual (11% P_2O_5) e Termo Gran (17% P_2O_5). Em frascos erlenmeyers de 250 mL, foram adicionados 50 mL de meio contendo: Glicose 1%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,05%; NaCl 0,02%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01%; KCl 0,02%; Extrato de levedura 0,05%; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,0002%; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0002%; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 0,05% e 1% da fonte fosfatada citada anteriormente. Também foi adicionado 29,9 g de Polietilenoglicol 6000 (PEG) -0,1 mPa (6%) em 500 ml de meio, que é um polímero de alto peso molecular que não é absorvido pelos microrganismos, mas reduz o potencial osmótico do meio, dificultando a absorção de água e simulando condições de seca, sem alterar o volume ou a composição do meio. Qi et al. (2023) demonstraram que o uso de PEG-6000 promove uma redução eficaz do potencial hídrico, sendo amplamente aplicável em testes de tolerância ao estresse hídrico em sistemas vegetais e microbiológicos. O pH do meio foi ajustado para 7.

O inóculo foi realizado utilizando-se um disco de micélio de 5 mm (contendo aproximadamente 1×10^7 de esporos/mL) da cultura, incubados a 35 °C por sete dias com agitação a 110 rpm. Após a incubação o meio foi filtrado em papel filtro, com uma bomba a vácuo, e realizado a mensuração do pH final com auxílio de um pHmetro. O sobrenadante foi utilizado para quantificação de P solúvel.

3.3 Quantificação de P solúvel

A quantificação de P solúvel foi determinada em 4, 7 e 10 dias para as fontes fosfatadas fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, fosfato de alumínio (AlPO_4) e fosfato de ferro (FePO_4), e 4 e 7 dias para os fertilizantes comerciais. O sobrenadante final após a filtração foi utilizado para determinar o pH final e o fósforo solúvel foi quantificado pelo método do ácido ascórbico descrito por MURPHY E RILEY (1962), utilizando-se uma curva de calibração com KH_2PO_4 para calcular a concentração de fósforo.

3.4 Preparação de reagente colorimétrico de Murphy e Riley (1962)

Foram preparados separadamente os seguintes reagentes: 70 ml de H_2SO_4 5N diluídos em 500 ml de água destilada; 1,3715 g de tartarato de antimônio e potássio $\text{K}_2(\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_6\text{Sb})2.3\text{H}_2\text{O}$ e diluído em 400 mL, completando o final para 500 mL. 20 g de Molibdato de Amônio $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ foram dissolvidos em 500 ml de água destilada; e por fim preparar uma solução de 1,76 g de ácido ascórbico 0,1 M em 100 mL de água destilada. Com os reagentes obtidos foi feito um mix com 50 ml de H_2SO_4 , 5 mL de $\text{K}_2(\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_6\text{Sb})2.3\text{H}_2\text{O}$, 15 ml de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, e 30 mL de ácido ascórbico fechando um volume de 100 mL. Para o preparo da curva padrão foi utilizado KH_2PO_4 nas concentrações: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; e 0,6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

3.5 Produção de enzimas fitase e fosfatase

A produção das enzimas fitases e fosfatases, foi realizada em 50mL de meio *Trichoderma liquid enzyme* (TLE) (RAMADA et al. 2016) composto por: 0,1% de peptona, 0,03% de uréia, 0,2% KH_2PO_4 , 0,14% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,03% $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e uma solução de elementos traços a 2% contendo 0,025% FeSO_4 , 0,0085% MnSO_4 , 0,007% ZnSO_4 e 0,01% de CaCl_2 . Como fonte de carbono foram utilizados 1% de substratos triturados de pastagem em produções agrícolas, como casca de arroz, palha de milho e farinha de soja. O inóculo foi realizado utilizando-se um disco de micélio de 5 mm (contendo aproximadamente 1×10^7 de esporos/mL) da cultura, incubados a 35 °C por sete dias com agitação a 110 rpm. Após 3, 5, 7 e 10 dias de crescimento o sobrenadante obtido foi utilizado para quantificação enzimática. O pH do meio foi ajustado para 5.

3.6 Dosagem de fitase

Para dosagem da atividade de fitase foi utilizado o método descrito por HEINONEN (1981). Em um tubo de ensaio foi adicionado 250 µL de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 com ácido fítico (Sigma-Aldrich) 10 mM, 45 µL de H₂O destilada e 5 µL do extrato enzimático. O material foi incubado por 30 minutos a 45 °C. Após esse período foi adicionado a solução de parada contendo 1,5 mL de H₂SO₄ 5N, molibdato de amônio 10 mM e acetona nas proporções 1:1:2, e 100 µL de ácido cítrico 1 M. A absorbância foi medida a 355 nm utilizando-se um Leitor de microplacas (SpectraMax Plus 384®). Para a curva de calibração foi empregado uma solução de KH₂PO₄. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de 1 µmol de produto (fosfato inorgânico (PO₄³⁻)) por minuto de reação.

3.7 Dosagem de fosfatase ácida

A atividade da fosfatase ácida foi determinada conforme descrito por LEITÃO et al (2010) com modificações. A reação consiste em 50 µL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,8, 40 µL do substrato *p*-nitrofenil fosfato sódio (Sigma-Aldrich) 5mM e 10 µL do extrato enzimático. As amostras foram incubadas por 10 min a 37 °C, e após esse período a reação foi interrompida pela adição de 100 uL de NaOH 0,1 M. Para o branco a solução da enzima foi substituída pelo tampão de acetato. A absorbância foi medida a 405 nm utilizando-se um Leitor de microplacas (SpectraMax Plus 384®). Uma unidade de atividade (1U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de *p*-nitrofenolato por minuto. Para a realização da curva foi utilizado-se *p*-nitrofenol a 36 mM.

3.8 Análise dos resultados

Ao todo, foram analisados 296 extratos provenientes das diferentes combinações de fungos, condições de estresse, fontes de carbono, fontes fosfatadas e tempos de incubação. As análises incluíram ensaios de produção enzimática e solubilização de fosfatos, realizados em triplicata ou duplicata, conforme o experimento. Os dados foram analisados usando Graphpad Prism 8 (Graphpad Software, San Diego, CA, EUA).

4. Resultados e Discussão

4.1 Solubilização de P

Os fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. apresentaram capacidade de solubilização de diferentes fontes de fosfato inorgânico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 e FePO_4 avaliadas em 4, 7 e 10 dias de incubação, na presença e ausência de polietilenoglicol (PEG), com valores variando de 12 a 367 $\mu\text{g P/mL}$. Os resultados encontram-se representados nas Figuras 1a, b e c.

De modo geral, *Penicillium* sp. mostrou-se eficiente na solubilização, especialmente na presença de PEG e AlPO_4 , com valor máximo de 367 $\mu\text{g P/mL}$, após sete dias de incubação. Na ausência de PEG, o mesmo fungo apresentou alta solubilização de AlPO_4 , atingindo 340 $\mu\text{g P/mL}$, no mesmo período. Em relação ao $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, *Penicillium* sp. apresentou solubilização de 26 $\mu\text{g P/mL}$ após quatro dias na ausência de PEG e de 62 $\mu\text{g P/mL}$ após sete dias com PEG (Figura 1c).

Para o fosfato de ferro (FePO_4), *Aspergillus* sp. foi o microrganismo com maior desempenho, atingindo 144 $\mu\text{g P/mL}$ em dez dias na ausência de PEG. Na presença de PEG, a solubilização de FePO_4 por esse fungo foi reduzida, alcançando 80 $\mu\text{g P/mL}$ no mesmo intervalo de tempo. Os valores de solubilização obtidos por *Aspergillus* sp. para as demais fontes fosfatadas (AlPO_4 e $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) variaram entre 20 e 240 $\mu\text{g P/mL}$, dependendo do tempo de incubação e da condição osmótica imposta (Figura 1b).

A manutenção da atividade solubilizadora de *Penicillium* sp. mesmo sob estresse osmótico (PEG) está alinhada com os estudos de Bakhshandeh et al. (2020), que relataram a capacidade desse gênero em manter a produção de ácidos orgânicos sob condições de stress. Por outro lado, o comportamento mais sensível de *Aspergillus* sp. frente ao PEG, especialmente na solubilização de FePO_4 , vai ao encontro das observações de Rinu et al. (2014), que identificaram uma maior vulnerabilidade metabólica (ou seja, uma redução na eficiência dos processos bioquímicos fundamentais, como a síntese de metabólitos e enzimas) desse gênero a estresses abióticos.

A variação temporal observada nos perfis de solubilização, com picos em diferentes tempos de incubação para cada fungo segue o padrão descrito por Mendes et al. (2021) que associam tais flutuações às diferentes fases do crescimento microbiano e à regulação metabólica ao longo do tempo.

No contexto agrícola, os resultados obtidos reforçam as conclusões de Oliveira et al. (2021) quanto ao potencial desses microrganismos como bioinoculantes. A eficiência

variável na solubilização de distintos tipos de fosfato ressalta a importância da seleção criteriosa de microrganismos de acordo com as características específicas do solo, conforme defendido por Alori e Babalola (2018) em sua revisão sobre o manejo microbiano do fósforo em solos tropicais.

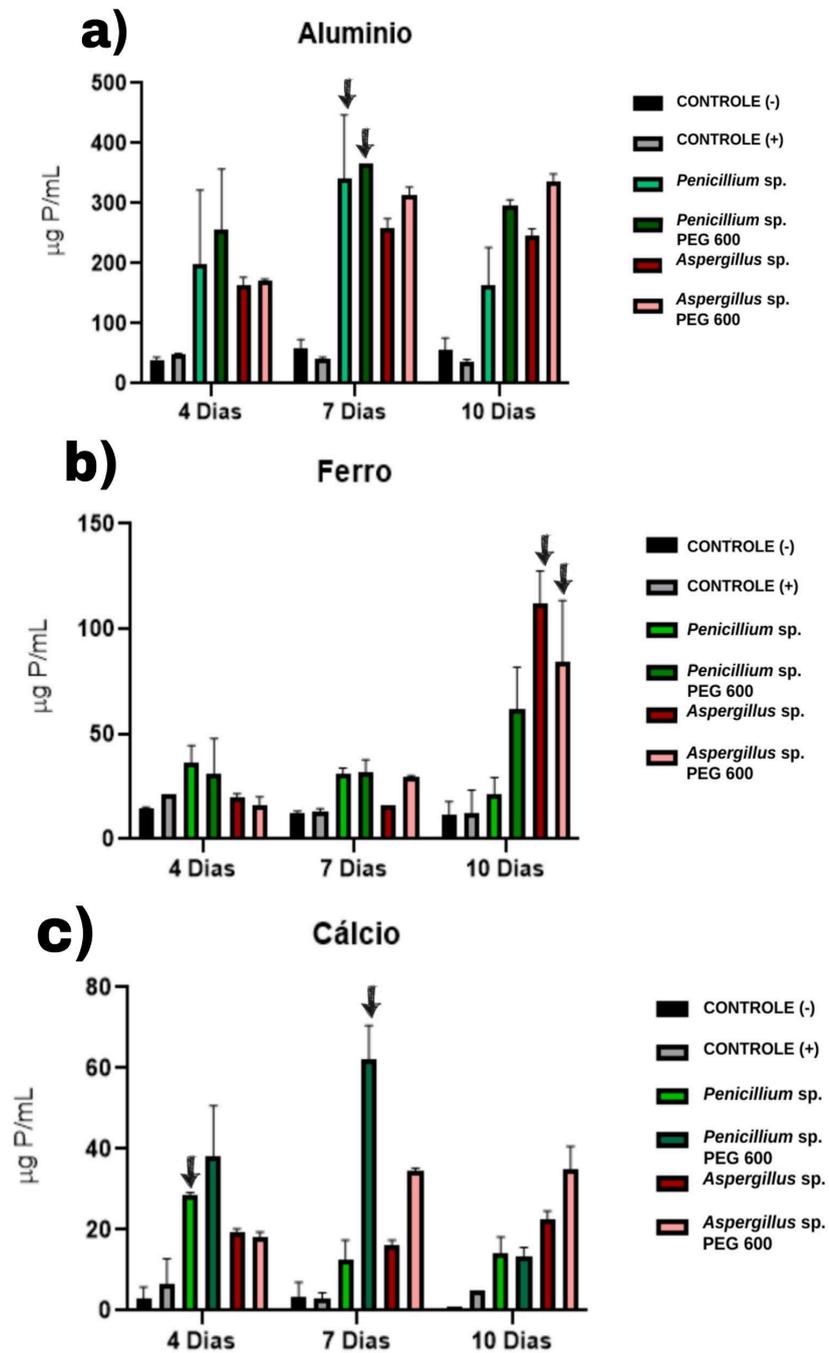


Figura 1. a) Solubilização do fosfato de alumínio (AlPO_4); **b)** Solubilização do fosfato de ferro (FePO_4); **c)** Solubilização do fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), pelos isolados de *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.* na presença e ausência de PEG. C- e C+ são controles sem fungos, com e sem PEG respectivamente.

4.2 Solubilização de Fosfatos utilizando Fertilizantes comerciais

Todos os fertilizantes testados foram solubilizados pelos fungos *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.*, tanto na presença quanto na ausência de PEG, com concentrações de fósforo solubilizado variando entre 0,27 e 733 $\mu\text{g P/mL}$. Os resultados estão apresentados na Figura 2.

De maneira geral, os maiores índices de solubilização foram observados para os fertilizantes Termo Forte Simplex e Termo Gran, com valores máximos de 733 e 705 $\mu\text{g P/mL}$, respectivamente, obtidos por *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.*, na presença de PEG, após sete dias de incubação.

Para o fertilizante Termo Gran, *Penicillium sp.* atingiu 493 $\mu\text{g P/mL}$ sem PEG e 705 $\mu\text{g P/mL}$ com PEG, aos sete dias. Na presença do fertilizante Tal Qual, o *Aspergillus sp.* apresentou valores de 364 $\mu\text{g P/mL}$ sem PEG e 439 $\mu\text{g P/mL}$ com PEG, também em sete dias. Quando avaliado o fertilizante Termofosfato Simplex, *Aspergillus sp.* novamente foi o isolado mais eficiente, com solubilizações de 434 $\mu\text{g P/mL}$ sem PEG e 733 $\mu\text{g P/mL}$ com PEG. Para o fertilizante MV27, *Penicillium sp.* apresentou os maiores valores de solubilização, com 140 $\mu\text{g P/mL}$ sem PEG em sete dias e 312 $\mu\text{g P/mL}$ com PEG em quatro dias. Já para o fertilizante Termofosfato Fino, *Penicillium sp.* alcançou 473 $\mu\text{g P/mL}$ sem PEG após quatro dias e o *Aspergillus sp.* atingiu 677 $\mu\text{g P/mL}$ com PEG após sete dias.

Os resultados obtidos evidenciam a capacidade significativa dos isolados fúngicos *Penicillium sp.* e *Aspergillus sp.* em solubilizar diferentes fertilizantes fosfatados de baixa solubilidade, mesmo sob condições de estresse hídrico simulado pela adição de PEG. A amplitude dos valores de fósforo solubilizado (0,27 a 733 $\mu\text{g P/mL}$) demonstra variabilidade dependente tanto da fonte fosfatada quanto do microrganismo e das condições de cultivo. *Penicillium sp.* apresentou desempenho superior à *Aspergillus sp.* na maioria das condições testadas, especialmente na presença de PEG, o que sugere uma maior tolerância osmótica e capacidade metabólica associada à produção de ácidos orgânicos ou outras estratégias de solubilização em condições adversas, como mostra os estudos de Alori et al. (2017).

Esse comportamento é particularmente evidente nos fertilizantes Termo Forte Simplex e Termofosfato Gran, nos quais os valores máximos de solubilização (733 e 705 $\mu\text{g P/mL}$ e foram obtidos por *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.* após sete dias com PEG. Esses fertilizantes parecem ser mais susceptíveis à ação microbiana, possivelmente devido à sua composição mineral, estrutura físico-química ou grau de reatividade.

A adição de PEG influenciou positivamente a solubilização de algumas fontes, como Termofosfato Gran, Termo Forte Simplex e Termofosfato Fino, concordando com Bakhshandeh et al. (2020) sugerindo que o estresse hídrico simulado pode estimular mecanismos adaptativos nos microrganismos, promovendo maior produção de metabólitos solubilizantes. Por outro lado, para o fertilizante MV27, *Penicillium sp.* obteve melhor desempenho em menor tempo (312 $\mu\text{g P/mL}$ em 4 dias com PEG), indicando que, apesar de sua menor eficiência geral, esse fungo pode ter mais resposta a certos tipos de fertilizante ou a curtos períodos de incubação sob estresse.

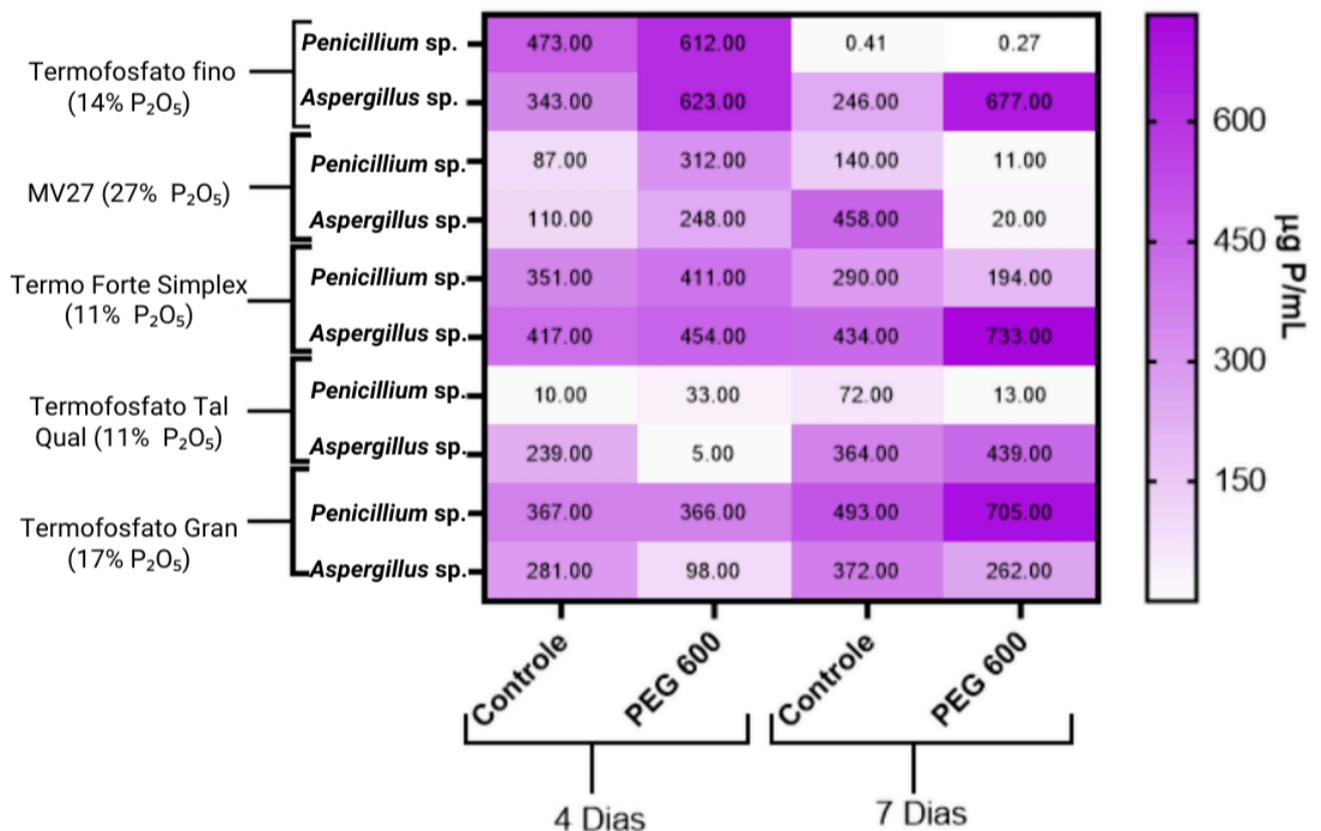


Figura 2. Heatmap do tempo de solubilização em diferentes fertilizantes comerciais: Termofosfato Fino (14% P_2O_5), MV27 (27% P_2O_5), Termo Forte Simplex (11% P_2O_5),

Termofosfato Tal Qual (11% P₂O₅) e Termofosfato Gran (17% P₂O₅), com os fungos *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp., na presença e ausência de PEG.

4.3 Produção de ácidos orgânicos

A produção de ácidos orgânicos por microrganismos é um dos principais mecanismos envolvidos na solubilização de fosfatos minerais, especialmente em ambientes com baixa disponibilidade de fósforo assimilável pelas plantas. Esses ácidos, como o glucônico, cítrico e málico, atuam reduzindo o pH do meio, o que favorece a liberação do fósforo anteriormente indisponível ao solubilizar compostos fosfatados pouco solúveis. Além da acidificação, alguns desses ácidos também podem formar complexos com cátions como cálcio, ferro e alumínio, promovendo a liberação adicional do fósforo ligado a esses íons.

Nos experimentos realizados, ambos os fungos demonstraram produção de ácidos e consequente acidificação do meio, onde o pH do meio foi inicialmente ajustado para 7,0. Com destaque para *Penicillium* sp., que no tratamento MV27 reduziu o pH para 2,9 após 4 dias, evidenciando uma intensa produção de ácidos orgânicos. Os resultados são apresentados na Tabela 1. Resultados semelhantes foram obtidos com *Penicillium* sp. em presença de PEG nos tratamentos com Termo Forte Simplex (pH 2,9) e Termofosfato Tal Qual (pH 2,8). Esses dados estão em plena concordância com os achados de Alori et al. (2017), que demonstraram que espécies de *Penicillium* são capazes de produzir grandes quantidades de ácido glucônico e oxálico, levando a uma queda acentuada do pH em meios contendo fosfatos insolúveis.

A capacidade de *Penicillium* sp. em acidificar o meio mesmo na presença de PEG (polietilenoglicol) corrobora os resultados de Bakhshandeh et al. (2020), que observaram que *Penicillium* sp. mantém sua produção de ácidos orgânicos sob estresse osmótico devido à regulação positiva de enzimas-chave no metabolismo de carboidratos. Além disso, Mendes et al. (2021) relataram que a acidificação extrema (pH < 3,0) está diretamente associada à maior eficiência na solubilização de fosfatos de cálcio e alumínio, o que explica os altos valores de P liberado observados nos experimentos.

Vale destacar que a rápida acidificação observada em apenas 4 dias com *Penicillium* sp. nos fertilizantes MV27 e Termo Forte Simplex está alinhada com os estudos de Oliveira et al. (2021), que identificaram em *Penicillium* spp. uma resposta metabólica acelerada quando comparada a outros fungos solubilizadores, como *Aspergillus*. Essa característica é particularmente vantajosa para aplicações agrícolas, onde uma rápida disponibilização de P pode ser crucial para o desenvolvimento inicial das culturas.

A formação de complexos com cátions, como Al^{3+} e Fe^{3+} , mencionada como um dos mecanismos complementares à acidificação, foi amplamente documentada por Vassilev et al. (2017) em estudos com *Aspergillus niger*. No entanto, nossos resultados sugerem que *Penicillium* sp. pode ser ainda mais eficiente nesse processo, uma vez que manteve altas taxas de solubilização mesmo em condições de estresse, diferentemente do observado para *Aspergillus* sp.

Tabela 1. pH dos fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. em 4 e 7 dias, com e sem PEG, para os fertilizantes comerciais.

Fertilizantes	Fungos	Dia 4	Dia 7
Termofosfato Fino	<i>Aspergillus</i> sp.	3.8	3.7
	<i>Aspergillus</i> sp. PEG	3.8	3.9
	<i>Penicillium</i> sp.	3.7	3.6
	<i>Penicillium</i> sp. PEG	3.6	3.3
MV27	<i>Aspergillus</i> sp.	3.3	3.7
	<i>Aspergillus</i> sp. PEG	3.1	4.9
	<i>Penicillium</i> sp.	2.9	3.6
	<i>Penicillium</i> sp. PEG	3	4.9
Termo Forte Simplex	<i>Aspergillus</i> sp.	3.1	3.4
	<i>Aspergillus</i> sp. PEG	3.1	3.5
	<i>Penicillium</i> sp.	3	3.3
	<i>Penicillium</i> sp. PEG	2.9	2.9
Termofosfato Tal Qual	<i>Aspergillus</i> sp.	3.4	3.3
	<i>Aspergillus</i> sp. PEG	3.2	3.1
	<i>Penicillium</i> sp.	2.8	3.2
	<i>Penicillium</i> sp. PEG	2.8	3
Termofosfato Gran	<i>Aspergillus</i> sp.	3.7	3.3
	<i>Aspergillus</i> sp. PEG	3.6	3.4
	<i>Penicillium</i> sp.	3.5	3.2
	<i>Penicillium</i> sp. PEG	3.4	3.2

4.4 Enzimas: produção de Fosfatase ácida e Fitase

Os fungos *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp apresentaram capacidade de produção de fitase e fosfatase ácida em 3, 5, 7 e 10 dias na presença e ausência de PEG com valores que variaram de 6,5 a 208 U/mL de fosfatase ácida e 0,235 a 2,230 U/mL de fitase (Figura 3).

Para fosfatase ácida, os resultados demonstram que a adição de resíduos orgânicos influencia significativamente a mineralização de fosfatos por *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp., com variações dependentes do tipo de resíduo e da presença de PEG. Na presença de casca de arroz, *Penicillium* sp. alcançou 92,5 U/mL (sem PEG) e 103 U/mL (com PEG) em 5 dias, mostrando que o estresse osmótico potencializou sua eficiência. Esse efeito positivo do PEG está alinhado com os achados de Bakhshandeh et al. (2020), que observaram que o estresse moderado pode estimular a produção de ácidos orgânicos em *Penicillium* spp. Com farinha de soja, *Penicillium* sp. manteve alta eficiência, atingindo 208 U/mL (sem PEG) e 202 U/mL (com PEG) em 5 dias, indicando que a qualidade nutricional desse resíduo (rico em carbono e nitrogênio) favoreceu a atividade microbiana independentemente do PEG. Resultados similares foram reportados por Alori et al. (2017), que destacaram o papel de substratos ricos em nutrientes no metabolismo fúngico. Já com palha de milho, *Aspergillus* sp. obteve melhor desempenho: 100 U/mL (sem PEG, 7 dias) e 139,5 U/mL (com PEG, 3 dias), sugerindo que esse resíduo, combinado ao PEG, acelerou o processo de mineralização. Essa resposta rápida com PEG corrobora Oliveira et al. (2021), que associaram a palha de milho à maior disponibilidade de carbono, que pode ser rapidamente metabolizado sob estresse.

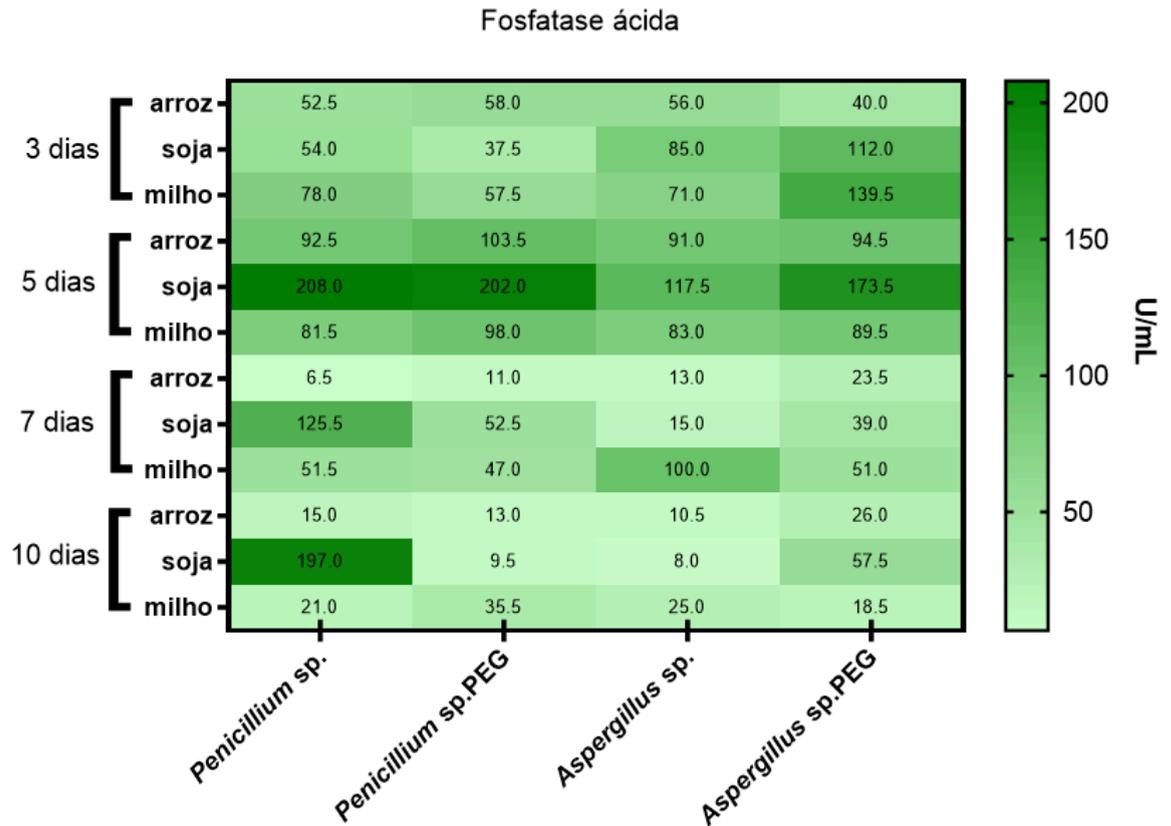


Figura 3. Heatmap do tempo de produção de fosfatase ácida em diferentes fontes de carbono: casca de arroz, farinha de soja e palha de milho em 3, 5, 7 e 10 dias, com os fungos *Penicillium sp.* e *Aspergillus sp.*

Para a fitase, os resultados demonstram variações significativas na eficiência de solubilização conforme o resíduo orgânico utilizado, como demonstrado na Figura 4. Na presença de casca de arroz, *Aspergillus sp.* apresentou aumento na solubilização com PEG (foi de 0,625 para 2,230 U/mL), concordando com Sharma et al. (2020) que observaram maior produção de ácidos orgânicos por *Aspergillus sp.* em condições de estresse osmótico. Com farinha de soja, *Penicillium sp.* mostrou resposta distinta, maior eficiência em 3 dias com PEG (1.485 U/mL) e 10 dias sem PEG (1.135 U/mL). Este padrão foi descrito por Chen et al. (2021), que relataram a ativação precoce de vias metabólicas em *Penicillium sp.* sob estresse. Para palha de milho, a superioridade de *Penicillium sp.* com PEG em 5 dias (1.570 U/mL) corrobora Zhang et al. (2022), que atribuíram este efeito à maior capacidade deste gênero em degradar fibras lignocelulósicas sob condições adversas. A eficiência de *Aspergillus sp.* sem PEG em 5 dias (1.215 U/mL) está alinhada com os achados de Wang et al. (2024) para solos tropicais.

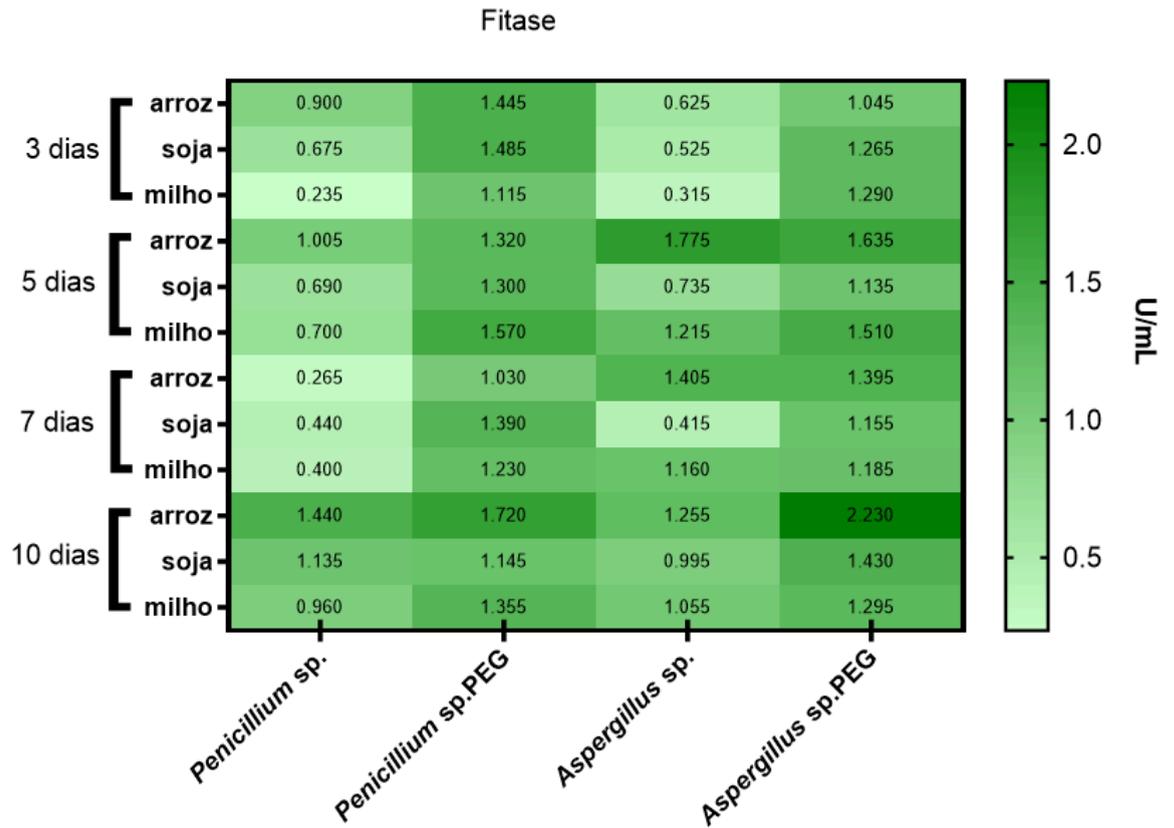


Figura 4. Heatmap do tempo de produção de fitase em diferentes fontes de carbono: casca de arroz, farinha de soja e palha de milho em 3, 5, 7 e 10 dias, com os fungos *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp.

Conclusão

O trabalho demonstrou o potencial dos fungos *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp em solubilizar diferentes tipos de fontes fosfatadas e fertilizantes comerciais na presença e ausência de PEG, a adição de PEG, que simula condições de estresse hídrico. Em particular, o fungo *Penicillium* sp. **teve maior eficiência na solubilização dos fosfatos, sendo o maior valor obtido com fosfato de Al em 7 dias (367 µg P/mL), na produção de Fosfatase Ácida, sendo o maior valor na farinha de soja em 5 dias (208 U/mL) e na produção de ácidos orgânicos em 4 dias (de 2, 8 a 2,9)**, mostrando boa adaptação em stress hídrico. Já o *Aspergillus* sp com PEG em 7 dias, nos fertilizantes como Termo Forte e Termo Fino, alcançou as maiores taxas de solubilização (733 e 677 µg P/mL) e na produção de fitase apresentou valores maiores na produção em 5 e 10 dias, na casca de arroz (1,775 U/mL e 2,230, respectivamente). Sendo assim, apresentam grande potencial biotecnológico principalmente na agricultura.

Referências

Alikhan, N. F., Giles, C. D., & Sharma, S. B. (2022). Phosphate solubilizing microorganisms in drought-stressed soils: Mechanisms and biotechnological applications. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1028–1042. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.827688>

Alori, E. T., & Babalola, O. O. (2018). Microbial inoculants for improving crop quality and human health in Africa. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2213. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02213>

Alori, E. T., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 8, 971. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>

Alshami, A., & Varon, J. (2022). Fosfatase ácida. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556039/>

Amri, M., Rjeibi, M. R., Gatrouni, M., Mateus, D. M. R., Asses, N., Pinho, H. J. O., & Abbes, C. (2023). Isolamento, identificação e caracterização de bactérias solubilizadoras de fosfato de solos da Tunísia. *Microorganisms*, 11(3), 783. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030783>

Azene, B., Wang, S., & Reichert, T. (2022). Response of soil phosphorus fractions to land-use change in subalpine ecosystems of the southeastern Qinghai-Tibet Plateau, China. *Ecological Indicators*, 136, 108634. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.109432>

Bahadur, A., Batool, A., Nasir, F., Jiang, S., Mingsen, Q., Zhang, Q., Pan, J., Liu, Y., & Feng, H. (2019). Mechanistic insights into arbuscular mycorrhizal fungi-mediated drought stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17), 4199. <https://doi.org/10.3390/ijms20174199>

Chandrasekaran, M., Boopathi, T., & Manivannan, P. (2021). Comprehensive assessment of AMF diversity, technological prospecting, and their abiotic stress alleviation in tomato plants. *Journal of Fungi*, 7(4), 303. <https://doi.org/10.3390/jof7040303>

Chen, X. D., Wei, Q., & Zhang, X. (2023). Impact of ryegrass cover crops on soil phosphorus and bacterial communities harboring *pqqC* and *phoD* genes. *Soil and Tillage Research*, 225, 105542. <https://doi.org/10.1016/j.still.2023.105823>

Chowdhury, R. B., Moore, G. A., & Jakhar, A. M. (2017). Key sustainability challenges for the global phosphorus resource, their implications for global food security, and options for mitigation. *Journal of Cleaner Production*, 140, 945–963. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.07.012>

Deng, P., Zhou, Y., Chen, W., Tang, F., & Wang, Y. (2024). Microbial mechanisms for improved soil phosphorus mobilization in monoculture conifer plantations by mixing with broadleaved trees. *Journal of Environmental Management*, 359, 120955. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.120955>

Deng, S., Duan, L., & Reichert, T. (2021). Rice ACID PHOSPHATASE 1 regulates Pi stress adaptation by maintaining intracellular Pi homeostasis. *Plant, Cell & Environment*, 45(1), 191–205. <https://doi.org/10.1111/pce.14191>

Din, M., Nelofer, R., Salman, M., Abdullah, Khan, F. H., Khan, A., Ahmad, M., Jalil, F., Din, J. U., & Khan, M. (2019). Produção de *Azotobacter* fixador de nitrogênio (SR-4) e solubilizador de fósforo *Aspergillus niger* e sua avaliação em *Lagenaria siceraria* e *Abelmoschus esculentus*. *Biotechnology Reports*, 22, e00323. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00323>

Dotsenko, A. S., Rix, G. D., & Mendes, G. O. (2022). Enhancement of activity and thermostability of *Aspergillus niger* ATCC 10864 phytase A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 634, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.10.010>

Etesami, H., Jeong, B. R., & Glick, B. R. (2021). Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi, phosphate-solubilizing bacteria, and silicon to P uptake by plants. *Frontiers in Plant Science*, 12, 699618. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.699618>

Gadd, K. H. G. (2014). Fungal and bacterial contributions to soil phosphorus solubilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 69, 163–173. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.699618>

García-Berumen, J. A., Flores de la Torre, J. A., de los Santos-Villalobos, S., Espinoza-Canales, A., Echavarría-Cháirez, F. G., & Gutiérrez-Bañuelos, H. (2025). Phosphorus dynamics and sustainable agriculture: The role of microbial solubilization and innovations in nutrient management. *Current Research in Microbial Sciences*, 8, 100326. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2024.100326>

Guo, Q., Ma, Q., & Klimasmith, I. M. (2025). Coexisting fertilizers increase metolachlor persistence in soil: Insights from mobility, metabolism and microbiome. *Environmental Pollution*, 371, 125918. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2025.125918>

Heinonen, J. K., & Lahti, R. J. (1981). A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate. *Analytical Biochemistry*, 113(2), 313–317. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90082-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90082-8)

International Fertilizer Association (IFA). (2020). Fertilizer outlook 2020–2024. IFASTAT Partnership. <https://www.fertilizer.org/resource/fertilizer-outlook-2020-2024/>

Jakhar, A. M., Rawat, P., & Rizwanuddin, S. (2022). Nano-fertilizers: A sustainable technology for improving crop nutrition. *NanoImpact*, 27, 100411. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2022.100411>

Joudaki, H., Leitão, V. O., & Ramada, M. H. S. (2023). Microbial phytases: Properties and applications in food industry. *Current Microbiology*, 80(12), 374. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03471-1>

Kerbauy, R. (2019). *Fisiologia vegetal* (3rd ed.). Artmed.

Klimasmith, I. M., & Kent, A. D. (2022). Micromanaging the nitrogen cycle in agroecosystems. *Trends in Microbiology*, 30(11), 1045–1055. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.04.006>

Kour, D., Rana, K. L., Yadav, A. N., Yadav, N., Kumar, M., Kumar, V., Vyas, P., Dhaliwal, H. S., & Saxena, A. K. (2019). Drought-tolerant phosphorus-solubilizing microbes: Biodiversity and biotechnological applications for alleviation of drought stress in plants. In R. Sayyed, N. Arora, & M. Reddy (Eds.), *Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable stress management: Volume 1: Rhizobacteria in abiotic stress management* (pp. 255–308). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6536-2_13

Leitão, V. O., Ramada, M. H. S., & Rix, G. D. (2010). Purification and characterization of an acid phosphatase from *Trichoderma harzianum*. *Biotechnology Letters*, 32(8), 1083–1088. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0264-2>

Li, J., Li, Z., Wang, F., Zou, B., Chen, Y., Zhao, J., Mo, Q., Li, Y., Li, X., & Xia, H. (2021). Alkaline phosphatase activity mediates soil organic phosphorus mineralization in a subalpine forest ecosystem. *Geoderma*, 404, 115376. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2021.115376>

Ma, Q., Wei, Q., & Wang, S. (2024). Co-utilization of carbon sources in microorganisms for bioproduction. *Biotechnology Advances*, 73, 108380. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2024.108380>

Mendes, G. O., Vassilev, N., & Oliveira, C. A. (2021). Optimization of *Aspergillus niger* rock phosphate solubilization. *Microbial Biotechnology*, 14(3), 1020–1030. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12289>

Murphy, J., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for phosphate determination. *Analytica Chimica Acta*, 27, 31–36. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)

Novais, R. F., & Smyth, T. J. (1999). Fósforo em solo e planta em condições tropicais. UFV.

Oliveira, L. C. A., Vinha, A. P. C., & Seixas, M. A. (2021). Frações de fósforo em função do uso de fertilizantes fosfatados. *Revista Agronegócio e Meio Ambiente*, 14(4), 1025–1035. <https://doi.org/10.17765/2176-9168.2021v14n4e8921>

Pajura, R. (2024). Composting municipal solid waste in response to fertilizer crisis. *Science of the Total Environment*, 912, 169221. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169221>

Pang, F., Li, Q., Solanki, M. K., Wang, Z., Xing, Y. X., & Dong, D. F. (2024). Soil phosphorus transformation and plant uptake driven by phosphate-solubilizing microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1383813>

Perumal, S., Hariharan, M., Arun, M., & Radhakrishnan, R. (2025). Plant growth enhancing activity of endophytic fungus to alleviate drought stress in soybean plants. *South African Journal of Botany*, 181, 446–457. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2025.04.036>

Pikovskaya, R. I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil by microorganisms. *Mikrobiologiya*, 19, 362–370.

Qi, Y., Ma, L., Ghani, M. I., Peng, Q., Fan, R., Hu, X., & Chen, X. (2023). Effects of hypertonic polyethylene glycol (PEG-6000)-induced water stress on physiological properties of *Passiflora edulis* Sims. *Plants*, 12(12), 2296. <https://doi.org/10.3390/plants12122296>

Ramada, M. H., Steindorff, A. S., Bloch, C., Jr., & Ulhoa, C. J. (2016). Análise do secretoma do fungo micoparasita *Trichoderma harzianum* ALL 42 cultivado em diferentes meios suplementados com parede celular de *Fusarium solani* ou glicose. *Proteomics*, 16(3), 477–490. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400546>

Rawat, P., Sharma, S. B., & Etesami, H. (2021). Phosphate-solubilizing microorganisms: Mechanism and role. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 21, 49–68. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00342-7>

Reed, S. C., Townsend, A. R., Taylor, P. G., & Cleveland, C. C. (2011). Ciclagem de fósforo em florestas tropicais crescendo em solos altamente intemperizados. In E. K. Bünemann, A. Oberson, & E. Frossard (Eds.), *Fósforo em ação: Da biologia do solo ao ecossistema* (pp. 311–328). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-15271-9_14

Reichert, T., Reichardt, S., & Wang, S. (2022). Plant phosphorus acquisition strategies in Amazonia. *New Phytologist*, 234(4), 1126–1143. <https://doi.org/10.1111/nph.17985>

Rinu, K., & Pandey, A. (2011). Solubilização lenta e constante de fosfato por uma cepa psicrotolerante de *Paecilomyces hepiali* (MTCC 9621). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5), 1055–1062. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0550-0>

Rix, G. D., Sprigg, C., Whitfield, H., Hemmings, A. M., Todd, J. D., & Brearley, C. A. (2022). Caracterização de uma fitase MINPP do solo com notável estabilidade e atividade a longo prazo de *Acinetobacter* sp. *PLoS ONE*, 17(8), e0272015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272015>

Rizwanuddin, S., Kumar, V., Singh, P., Naik, B., Mishra, S., Chauhan, M., Saris, P. E. J., Verma, A., & Kumar, V. (2023). Visão sobre microrganismos produtores de fitase para solubilização de fitato e sustentabilidade do solo. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1127249. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1127249>

Seixas, M. A. (2022). A crise dos fertilizantes e a insegurança alimentar global. EMBRAPA. <https://www.embrapa.br>

Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Micróbios solubilizadores de fosfato: abordagem sustentável para o manejo da deficiência de fósforo em solos agrícolas. *SpringerPlus*, 2, 587. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>

Souchia, E. L., Oliveira, C. A., & Mendes, G. O. (2005). Solubilização de fosfatos por bactérias e fungos do solo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40(11), 1149–1152. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2005001100015>

United Nations Department of Economic and Social Affairs, Population Division. (2013). World population projected to reach 9.6 billion by 2050 [Press release]. <https://www.un.org/en/development/desa/news/population/un-report-world-population-projected-to-reach-9-6-billion-by-2050.html>

Vasileva, M., Dotsenko, A., & Rix, G. D. (2022). Fungi, P-Solubilization, and Plant Nutrition. *Microorganisms*, 10(9), 1716. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091716>

Vassilev, N., Vassileva, M., & Azcon, R. (1997). Solubilization of rock phosphate by immobilized *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 59(1), 1–4. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(96\)00137-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(96)00137-X)

Vassileva, M., Mendes, G. d. O., Deriu, M. A., Benedetto, G. d., Flor-Peregrin, E., Mocali, S., Martos, V., & Vassilev, N. (2022). Fungos, P-Solubilização e Nutrição de Plantas. *Microorganismos*, 10(9), 1716. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091716>

Wang, S., Chen, X. D., & Reichert, T. (2024). Rhizosphere microbial functions in phosphorus cycle during Chinese fir successive plantations. *Forest Ecology and Management*, 570, 122227. <https://doi.org/10.1016>

"A formatação das citações e referências bibliográficas seguiu as normas da revista *Frontiers in Microbiology* (disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology>)."