

HAIR SANTIAGO LOZANO PUENTES

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS SOLUBILIZADORES DE
FOSFATO DE SOLO TRATADO COM ÁCIDO MÁLICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Maurício Dutra Costa

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

L951i
2021
Lozano Puentes, Hair Santiago, 1996-
Isolamento e caracterização de fungos solubilizadores de
fosfato de solo tratado com ácido málico / Hair Santiago Lozano
Puentes. – Viçosa, MG, 2021.
1 dissertação eletrônica (54 f.): il.

Orientador: Maurício Dutra Costa.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.139>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Fungos do solo. 2. Ácido málico. 3. Fosfatos -
Solubilidade. 4. Rochas fosfáticas. 5. Fosfatos - Absorção e
adsorção. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 579.5

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523

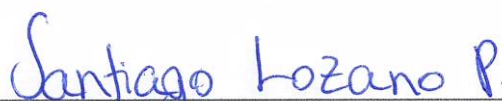
HAIR SANTIAGO LOZANO PUENTES

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS SOLUBILIZADORES DE
FOSFATO DE SOLO TRATADO COM ÁCIDO MÁLICO**

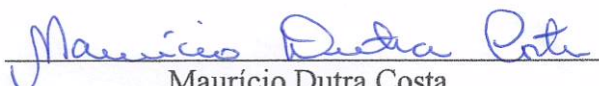
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de julho de 2021.

Assentimento:



Hair Santiago Lozano Puentes
Autor



Maurício Dutra Costa
Orientador

“Meu pai
me disse: “filho sempre entregue o coração”,
no campo e no palco, é o primeiro que
lhes deixo”
Nicolás Barragan

AGRADECIMENTOS

A Deus, por nunca me desamparar.

A meus pais, Janethe e Gustavo, pelo amor e pelo apoio em cada uma das minhas decisões; por lutar dia a dia pelo meu bem-estar.

A meu irmão Nicolás, por ser um motivo de inspiração, por batalhar ao meu lado e porque sempre vai ser meu torcedor número um.

À minha irmã Laura e aos meus irmãos Nichols, Juan y Nicolás, por ser meu motor no dia a dia.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade.

À CAPES, ao CNPq e à FAPEMIG, pelas bolsas de estudo e pelo financiamento da pesquisa realizada durante o mestrado.

Ao professor Maurício, por me acolher desde o primeiro dia, pela confiança, pela orientação, pelo aprendizado, pela paciência, pelos conselhos, pela amizade, pelo incentivo, por ter contribuído tanto na minha formação acadêmica como na minha formação pessoal.

Aos colegas do Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM), pela amizade e pelos bons momentos compartilhados. Especialmente Jaqueline, Victor e Gustavo, com certeza sem suas contribuições, ajudas, dicas, conselhos, apoio, etc., não teria concluído o trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, em especial, Seu Paulo, Célio, Patrícia e Letícia, pela atenção e pela disponibilidade.

A Diego, pela amizade e irmandade que a gente criou, pelo conhecimento, pelo futebol, pelo café, pelos palheiros, pelas viagens, pelas festinhas e, claro, pelo apoio em todos os momentos. Más que un Hermano, eres mi brother.

A Marangoni, grato pelos momentos e pelo futebol, juntos na torcida.

À Mísia, pelo carinho, pela companhia, pelo aprendizado e pelos bons momentos.

Aos amigos que fiz em Viçosa: Argemiro, Helbert, Jhon Heider, Matheus, Jhon Alexander, Diego Bolivar, Sofia, Bianca, Thiago e todos aqueles com que compartilhei boas experiências.

À professora Luciana, pelo apoio e pela confiança sempre.

À minha família, especialmente, meu tio Julian, por me incentivar a aprender e conseguir responder-lhe todas as perguntas.

Meus amigos de AUM, que ficaram torcendo desde Colômbia.

BIOGRAFIA

Hair Santiago Lozano Puentes, filho de Janethe Patricia Puentes Sarmiento e Gustavo Lozano Palacios, nasceu em Chocontá, Colômbia, no dia 16 de abril de 1996. Formou-se em Microbiologia Industrial pela Pontificia Universidad Javeriana da Colômbia em 2017. Durante o ano de 2017, trabalhou em pesquisa com projetos da Pontificia Universidad Javeriana e, em 2018, coordenou o laboratório de produção de fungos entomopatógenos para uma indústria do setor de dendê. Iniciou o mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Estado de Minas Gerais, em agosto do ano 2019, concluindo o curso em julho de 2021.

RESUMO

LOZANO-PUENTES, Hair Santiago, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2021. **Isolamento e caracterização de fungos solubilizadores de fosfato de solo tratado com ácido málico.** Orientador: Maurício Dutra Costa.

Em face do aumento da demanda por alimentos resultante do crescimento populacional, a produção agrícola tem-se intensificado em todo o mundo. Para garantir a segurança alimentar futura, a disponibilidade de P para os cultivos torna-se central. O P desempenha papel importante no desenvolvimento das plantas, atuando como componente estrutural da célula ou desempenhando distintas funções nas reações metabólicas. Nos solos, apenas 0,1 % do P total está presente em formas solúveis disponíveis para as plantas. A aplicação de fertilizantes fosfatados é sempre fundamental para atender a demanda vegetal. No entanto, grande parte do P adicionado ao solo é fixada nas superfícies de argilas ou forma complexos pouco solúveis com Fe, Al e Ca, resultando em aumentos do custo de produção e diminuindo a sustentabilidade agrícola. O uso de microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) pode melhorar esse cenário, uma vez que eles têm a capacidade de disponibilizar P a partir de compostos minerais pouco reativos ou a partir da matéria orgânica do solo. Os MSF podem ser encontrados na rizosfera, região de intensa interação entre as raízes de plantas e a microbiota do solo. As raízes das plantas influenciam diretamente a atividade microbiana nesse local por meio de rizodeposições. As rizodeposições incluem açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, dentre outros, que atraem, selecionam e sustentam populações microbianas específicas. Por exemplo, a liberação de ácido málico no solo aumenta as populações de MSF rizosféricos. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de isolar fungos solubilizadores de fosfato de solo tratado com ácido málico e caracterizar a capacidade dos mesmos em solubilizar fosfatos de rocha e promover a liberação de P adsorvido ao solo, tanto na presença quanto na ausência desse composto. Amostras de solo foram incubadas durante 15 dias a 28 °C, em meio NBRIP modificado, suplementado com 3,99 g L⁻¹ de ácido málico. Após o período de incubação, diluições seriadas até 10⁻⁶ foram realizadas e plaqueadas em ágar NBRIP. Colônias que apresentaram halo de solubilização de fosfato, foram isoladas, purificadas e estocadas para avaliação do potencial de solubilização de diferentes fontes de P, dessorção de P e liberação de P, na ausência ou presença do ácido málico. A suplementação do meio NBRIP com ácido málico favoreceu o aumento das populações de fungos solubilizadores de fosfato. Os maiores valores de P solúvel (mg L⁻¹) obtidos para os isolados obtidos na presença de diferentes fontes de fósforo foram: 563,4 para o Ca₃PO₄; 26,2 para o FePO₄; e 17,8 para o AlPO₄. Para os

fosfatos de rocha, os maiores valores de P solúvel (mg L^{-1}) foram 105,5 para Aipe; 76,3 para Patos; 49,1 para Catalão; e 26,1 para Araxá. Nos tratamentos com P fixado ao solo, o maior valor de P solúvel (mg L^{-1}) obtido foi de 0,24, indicando baixo potencial de dessorção de P pelos fungos testados. Neste trabalho, a suplementação de meio NBRIP modificado com ácido málico não melhorou a capacidade de solubilização de fosfatos dos isolados fúngicos, mas contribuiu para a solubilização abiótica de todas as fontes de P avaliadas e para a dessorção de P do solo. Neste trabalho, o aumento das populações de fungos solubilizadores de fosfatos no solo e a maior solubilização/dessorção de P foram os principais efeitos do ácido málico na disponibilização de P, indicando o potencial desse metabólito em promover a mobilização dos reservatórios de P do solo de forma a contribuir com a nutrição fosfatada de plantas e microrganismos.

PALAVRAS-CHAVE: Ácido málico. Fungos solubilizadores de fosfato. Rochas fosfóricas. P adsorvido.

ABSTRACT

LOZANO-PUENTES, Hair Santiago, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2021. **Isolation and characterization of phosphate solubilizing fungi from soil treated with malic acid.** Advisor: Maurício Dutra Costa.

Considering the increased demand for food resulting from population growth, agricultural production has intensified around the world. To ensure future food security, the availability of P for crops becomes central. P plays an important role in plant development, acting as a structural component of the cell or playing different roles in metabolic reactions. In soils, only 0.1% of the total P is present in soluble forms available to plants. Thus, the application of phosphate fertilizers is essential to meet crop demand. However, much of the P added to the soil is fixed on clay surfaces or forms poorly soluble complexes with Fe, Al and Ca, resulting in production cost increases and decreasing agricultural sustainability. The use of phosphate solubilizing microorganisms (MSF) can improve this scenario, as they have the ability to make P available from poorly reactive mineral compounds or from soil organic matter. MSF can be found in the rhizosphere, a region of intense interaction between plant roots and soil microbiota. Plant roots directly influence microbial activity in this location through rhizodepositions. Rhizodepositions include sugars, amino acids, organic acids, among others, which attract, select and support specific microbial populations. For example, the release of malic acid in the soil increases rhizospheric MSF populations. Thus, the objective of this work was to isolate phosphate solubilizing fungi from soil treated with malic acid and characterize their ability to solubilize rock phosphates and promote the release of P adsorbed to the soil, both in the presence and absence of this compound. Soil samples were incubated for 15 days at 28 °C, in modified NBRIP medium, supplemented with 3.99 g L⁻¹ of malic acid. After the incubation period, serial dilutions up to 10⁻⁶ were made and plated on NBRIP agar. Colonies that showed halo of phosphate solubilization were isolated, purified and stored to evaluate the potential for solubilization of different P sources, P desorption and P release, in the absence or presence of malic acid. The supplementation of the NBRIP medium with malic acid favored the increase in the populations of phosphate solubilizing fungi. The highest values of soluble P (mg L⁻¹) obtained for the isolates obtained in the presence of different phosphorus sources were: 563.4 for Ca₃PO₄; 26,2 for FePO₄; and 17,8 for AlPO₄. For rock phosphates, the highest values of soluble P (mg L⁻¹) were 105,5 for Aipe; 76,3 for Ducks; 49,1 for Catalan; and 26,1 for Araxá. In treatments with P fixed to the soil, the highest value of soluble P (mg

L-1) obtained was 0.24, indicating a low potential for P desorption by the tested fungi. In this work, the supplementation of NBRIP medium modified with malic acid did not improve the phosphate solubilization capacity of the fungal isolates, but it contributed to the abiotic solubilization of all evaluated P sources and to the desorption of P from the soil. In this work, the increased populations of phosphate-solubilizing fungi in the soil and the greater solubilization/desorption of P were the main effects of malic acid on P availability, indicating the potential of this metabolite to promote the mobilization of P reservoirs in the soil of to contribute to the phosphate nutrition of plants and microorganisms.

KEYWORDS: Malic acid. Phosphate solubilizing fungi. Phosphoric rocks. Adsorbed P.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. CAPÍTULO I. REVISÃO DE LITERATURA	13
3. CAPÍTULO II. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO DE SOLO TRATADO COM ÁCIDO MÁLICO	26
3.1 RESUMO	27
3.2 ABSTRACT	28
3.3 INTRODUÇÃO	29
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.4.1 Contagem e isolamento de fungos solubilizadores de fosfato de solo tratado com ácido málico	30
3.4.2 Caracterização de fungos solubilizadores de fosfato	31
3.4.3 Solubilização de fosfato <i>in vitro</i> com e sem ácido málico	31
3.4.4 Solubilização de fosfato <i>in vitro</i> com diferentes concentrações de ácido málico	31
3.4.5 Dessorção de P <i>in vitro</i> com e sem ácido málico	32
3.4.6 Potencial de liberação de P do solo pelos isolados com e sem ácido málico	32
3.4.7 Delineamento experimental e análises estatísticas	33
3.5 RESULTADOS	33
3.5.1 Contagem e isolamento de fungos solubilizadores de fosfato de solo tratado com ácido málico	33
3.5.2 Caracterização de fungos solubilizadores de fosfato	34
3.5.3 Solubilização de fosfato <i>in vitro</i> com e sem ácido málico	34
3.5.4 Solubilização de fosfato <i>in vitro</i> com diferentes concentrações de ácido málico	34
3.5.5 Dessorção de P <i>in vitro</i> com e sem ácido málico	36
3.5.6 Potencial de liberação de P do solo pelos isolados com e sem ácido málico	41
3.6 DISCUSSÃO	42
3.7 CONCLUSÕES	46
3.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO

Em face do aumento da população mundial, que deverá atingir 9,7 bilhões de habitantes em 2050, a disponibilidade de fósforo (P) para uso agrícola torna-se central para a agricultura com vistas a atender a crescente demanda por alimentos. O P é um dos nutrientes mais importantes para o crescimento e metabolismo das plantas. Atualmente, as práticas agrícolas convencionais apresentam limitações frente à crescente demanda por alimentos, e o uso de fertilizantes químicos tem sido explorado ao máximo do potencial. No solo, o P disponível não é, em geral, suficiente para atender as necessidades de crescimento da planta levando a aplicações de doses elevadas do nutriente para manutenção da produção.

Sabe-se que mais de 15 milhões de toneladas de fertilizantes fosfatados são aplicados em todo o mundo a cada ano, dos quais até 80% são perdidos como formas insolúveis. Isso ocorre porque o P solúvel que é aplicado ao solo é rapidamente transformado em formas insolúveis pela precipitação com íons metálicos, a exemplo do cálcio (Ca^{2+}), alumínio (Al^{3+}) e ferro (Fe^{3+}), ou pela adsorção à superfície de minerais de argila e óxidos de ferro e alumínio, formando complexos indisponíveis às plantas. A aplicação excessiva de fertilizante fosfatado também causa problemas ambientais, levando à poluição dos reservatórios de água com o P carregado durante a erosão do solo ou pelo escoamento superficial de água.

Os fertilizantes fosfatados derivam de depósitos geológicos de P não renováveis com estimativas de esgotamento no prazo de 50 a 100 anos. O acesso a fertilizantes fosfatados pode ser ainda mais limitante, haja vista que os maiores depósitos de matéria prima para a fabricação desses insumos estão restritos, principalmente, a uma pequena região do Saara Ocidental e Marrocos, tornando alguns países, a exemplo do Brasil, fortemente dependentes da importação de fertilizantes. Assim, torna-se de grande relevância a melhoria da absorção e do uso de P pelas culturas, tanto do ponto de vista ecológico quanto do econômico.

Os microrganismos rizosféricos (MR) têm sido estudados como abordagem sustentável para a agricultura, melhorando o crescimento e produtividade das culturas. Em geral, os MR auxiliam na solubilização, mobilização e mineralização de nutrientes. Dentre os MR, encontra-se o grupo de microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF), capazes de transformar P de formas insolúveis para P disponível para as plantas. O principal mecanismo de solubilização do P inorgânico é pela produção de ácidos orgânicos. Para a mineralização de P orgânico, o principal mecanismo é a produção de fosfatases ácidas e alcalinas.

Os MR são fortemente influenciados pelos exsudatos da raiz (ER), pois esses compostos aparentemente modificam as características físicas e químicas do solo e, subsequentemente,

regulam a estrutura e a composição das comunidades microbianas da rizosfera. Os ER variam entre as espécies de plantas, mudam ao longo do eixo da raiz e também são modificados em resposta ao estado nutricional da planta, ao estresse e a ataque de patógenos.

Em geral, os ER constituem mistura de ampla variedade de compostos, incluindo metabólitos primários e secundários. Metabólitos primários, incluindo carboidratos, aminoácidos e ácidos orgânicos, são secretados em maiores quantidades do que metabólitos secundários, como flavonoides, glucosinolatos, auxinas, etc. Recentemente foi avaliado o efeito de diferentes compostos relatados como ER no potencial de liberação de P pela microbiota do solo. Foram avaliados diferentes ácidos orgânicos, e foi demonstrado que o ácido málico aumentou a concentração do P liberado, o P da biomassa microbiana e o P total do sistema com solo saturado. Por outro lado, o ácido málico aumento o numero de populações de microrganismos solubilizadores de fosfato (Barrera 2020).

Diante dessas informações, o objetivo deste trabalho foi o de isolar e caracterizar fungos solubilizadores de fosfato de solo tratado com ácido málico e explorar o potencial dos mesmos em solubilizar P a partir de diferentes fontes insolúveis.

2. CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

O fósforo (P) é nutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Esse elemento desempenha papel importante nas atividades de fotossíntese, respiração, formação de membrana celular, glicólise, atividades enzimáticas, transferência de energia, desenvolvimento de novos tecidos e na divisão das células vegetais (Ingle & Padole 2017; Abdel *et al.*, 2019; Billah *et al.*, 2019). O P compõe cerca de 0,2% do peso seco de uma planta (Schachtman *et al.*, 1998), sendo, após o nitrogênio (N), o segundo macronutriente mais requerido para o crescimento vegetal (Wang *et al.*, 2015).

Apesar da ampla distribuição na natureza, os solos tropicais e subtropicais são deficientes nas formas de P facilmente absorvíveis pelas plantas em função da retenção do nutriente nas partículas de argila (Carmo *et al.*, 2019). O teor total médio de P no solo é 0,05% (w/w), e apenas 0,1% desse P está disponível para ser absorvido pelas plantas (Gowami *et al.*, 2019; Hafeez *et al.*, 2019) na forma de ortofosfato (HPO_4^{2-} ou H_2PO_4^-) (Jayakumar *et al.*, 2019). Com a finalidade de se manter a produtividade das culturas e em face da retenção do elemento no solo, grandes quantidades de P deve ser aplicado ao solo como fertilizantes fosfatados solúveis (Roy *et al.*, 2016).

Em geral, a retenção de P no solo pode chegar a 95-99% do total de P (Bhattacharjya *et al.*, 2019), tornando o elemento indisponível para as plantas. O P pode precipitar-se com cátions, a exemplo do ferro (Fe) e do alumínio (Al) em solos ácidos, com o cálcio (Ca), em solos alcalinos, pode ser adsorvido nas partículas do solo, ou ser assimilado em formas orgânicas pela microbiota e pelas plantas (Ingle & Padole 2017; Abdel *et al.*, 2019;).

Quanto aos solos Brasileiros, em geral, são altamente intemperizados com alta capacidade de sorção de P, também chamados de solos fixadores de P, devido à presença de altos teores de oxihidróxidos de Al e Fe ($-\text{AlOH}/\text{FeOH}$) (Damian *et al.*, 2020; Withers *et al.*, 2018) os quais apresentam alta afinidade química com o ortofosfato, levando à formação de ligações coordenadas de alta energia (Pogorzelski *et al.*, 2020). Diante desse cenário, aplicações muito altas de P são recomendadas para aumentar a fertilidade do solo e garantir rendimentos agrícolas ideais (Fisher *et al.*, 2018).

Contudo, estima-se que o P acumulado na biomassa das lavouras corresponde a apenas 52% do total do elemento aplicado como fertilizantes inorgânicos (Roy *et al.*, 2016). Adicionalmente, a eficiência do uso de P tem sido relatada como muito baixa para as culturas de café, baixa para cana-de-açúcar, algodão, feijão e laranja e razoável para soja,

trigo e arroz (Pavinato *et al.*, 2020). Esses dados indicam que os solos fixadores de P, associados ao uso indiscriminado de fertilizantes, contribuem sensivelmente para a baixa eficiência no uso do nutriente no Brasil. O País é o quarto maior consumidor de fertilizantes do mundo, atrás da China, Índia e EUA (Farias *et al.*, 2020), e espera-se que a demanda nacional por fertilizantes fosfatados aumente de 3 a 5% ao ano na próxima década (FAO 2015).

Os fertilizantes fosfatados são tradicionalmente produzidos pelo tratamento químico de rochas fosfáticas, processo caro, que pode causar danos ambientais em função do alto consumo de energia e do tratamento com ácido sulfúrico a altas temperaturas (Klaic *et al.*, 2017; Carmo *et al.*, 2019). Além disso, a aplicação em altas doses de fertilizantes químicos cria impactos negativos no ambiente, como alterações do pH do solo por meio da alcalinização e acidificação, poluição dos recursos hídricos, eliminação de microrganismos e insetos benéficos e degradação da estrutura do solo em função do aumento da decomposição da matéria orgânica (Alori *et al.*, 2017; Billah *et al.*, 2019).

O gerenciamento racional da fertilização fosfatada é cada vez mais importante, uma vez que as rochas fosfóricas são recurso natural não renovável e, de acordo com as estimativas mais recentes, as reservas globais desse material podem se esgotar no prazo de 50 a 100 anos. Além disso, os custos de produção de fertilizantes fosfatados estão aumentando em face da menor disponibilidade de depósitos de rochas fosfóricas de alto grau e das flutuações cambiais (Mendes *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015; Bhattacharjya *et al.*, 2019). O Brasil importa atualmente entre o 50-60% dos fertilizantes fosfatados consumidos pela agricultura brasileira (Pavinato *et al.*, 2020; Withers *et al.*, 2018), o que torna o país susceptível às variações nos preços dos produtos e às flutuações cambiais (Rosa *et al.*, 2020; Pogorzelski *et al.*, 2020). Desse modo, o P é considerado nutriente-chave para a expansão da agricultura brasileira (Pavinato *et al.*, 2020). A melhoria da eficiência do uso de P constitui um dos desafios atuais para o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável (Gouveia *et al.*, 2019).

Os microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) relatados (tabela 1) têm sido considerados como abordagem alternativa para a produção de fertilizantes fosfatados solúveis que promovam o crescimento das plantas (Wang *et al.*, 2020b). Esses microrganismos, por interferirem favoravelmente nas reações químicas envolvendo o P e por melhorarem o microambiente do solo (Rfaki *et al.*, 2020), transformam as formas de P minerais ou orgânicas pouco solúveis ou reativas em formas solúveis e absorvíveis pelas plantas, sendo de grande importância para a melhoria da eficiência de uso de adubos

fosfatados (Sahandi *et al.*, 2019; Mitra *et al.*, 2020).

Tabela 1. Microrganismos solubilizadores de fosfato relatados

Microrganismo	Gênero
Fungos	<p><i>Aspergillus awamori</i>, <i>A. niger</i>, <i>A. terreus</i>, <i>A. flavus</i>, <i>A. nidulans</i>, <i>A. foetidus</i>, <i>A.</i> <i>wentii</i>, <i>Alternaria tenuis</i>, <i>Achrothcium sp.</i>, <i>Penicillium digitatum</i>, <i>P. lilacinium</i>, <i>P.</i> <i>balaji</i>, <i>P. funiculosum</i>, <i>Cephalosporium</i> <i>sp.</i>, <i>Cunninghamella</i>, <i>Candida sp.</i>, <i>Paecilomyces fusisporous</i>, <i>Pythium sp.</i>, <i>Phoma sp.</i>, <i>Populospora mytilina</i>, <i>Myrothecium roridum</i>, <i>Mortierella sp.</i>, <i>Micromonospora sp.</i>, <i>Oidiodendron sp.</i>, <i>Rhizoctonia solani</i>, <i>Rhizopus sp.</i>, <i>Mucor</i> <i>sp.</i>, <i>Trichoderma viride</i>, <i>Torula</i> <i>thermophila</i>, <i>Schwanniomyces</i> <i>occidentalis</i>, <i>Sclerotium rolfsii</i></p>
Bactérias	<p><i>Pseudomonas sp.</i>, <i>Bacillus sp.</i>, <i>Agrobacterium sp.</i>, <i>Achromobacter sp.</i>, <i>Micrococcus sp.</i>, <i>Erwinia sp.</i>, <i>Burkholderia sp.</i>, <i>Rhizobium sp.</i>, <i>Flavobacterium sp.</i>, <i>Azospirillum sp.</i>, <i>Stenotrophomonas sp.</i>, <i>Acinetobacter sp.</i>, <i>Arthrobacter sp.</i>, <i>Enterobacter sp.</i>, <i>Bradyrhizobium sp.</i>, <i>Streptomyces sp.</i> e <i>Actinomyces sp</i></p>

Os MSF têm a capacidade de solubilizar P insolúvel no solo por reações de acidificação, quelatação, troca iônica e, ou produção de enzimas (Wang *et al.*, 2020a). Os MSF produzem compostos dissolventes de minerais e rochas, como ácidos orgânicos, sideróforos e prótons (Alori *et al.*, 2017). Os ácidos orgânicos, por meio de grupos hidroxil e carboxil, quelatam cátions, a exemplo do Fe, Al e Ca, liberando o ortofosfato em solução

(Sajeesh *et al.*, 2019). Os ácidos acético, fórmico, láctico, glucônico, glicólico, 2-ceto glucônico, oxálico, succínico, málico e cítrico, dentre outros, são produzidos normalmente pelos MSF em meios de cultura e no ambiente (Wei *et al.*, 2018). Os sideróforos são agentes quelantes de Fe (Verduzco *et al.*, 2020) que podem favorecer a solubilidade dos fosfatos de Fe no solo. No entanto, até o momento, não foram estabelecidas relações diretas entre a capacidade de produzir sideróforos e a solubilização de fosfato (Prabhu *et al.*, 2019); A acidificação do meio em função da excreção de prótons H^+ , originada da assimilação de NH_4^+ , produção respiratória de H_2CO_3 e extrusão de ânions de ácidos orgânicos constitui, também, mecanismos de solubilização de P (Alori *et al.*, 2017; Prabhu *et al.*, 2019). Finalmente, as fosfatases são enzimas do grupo das hidrolases que catalisam a hidrólise das ligações éster-fosfato, contribuindo para a mineralização do P orgânico (Lipinska & Kucharski 2019).

Os fungos solubilizadores de fosfato (FSF) desenvolvem papel importante na disponibilização do elemento *in vitro*, utilizando fontes insolúveis como única fonte de P (Sarr *et al.*, 2020; Tandom *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2018). A capacidade de solubilização de fontes inorgânicas de P, tais como $(Ca_3(PO_4)_2$ (TCP); $AlPO_4$ (AIP); $FePO_4$ (FeP); $Zn_3(PO_4)_2$ (ZP)) tem sido estudada (Alaylar *et al.*, 2020; Bononi *et al.*, 2020; Jiang *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2020). Foi relatado que 13 isolados fúngicos da rizosfera conseguiram disponibilizar P atingido valores máximos de até 1523 mg L^{-1} , utilizando TCP como única fonte de P no meio (Doilom *et al.*, 2020). Por outro lado, fungos endofíticos disponibilizaram P atingindo valores de $83,42$; $57,63$ e $57,76 \text{ mg L}^{-1}$, utilizando TCP, AIP e FeP, respectivamente como única fonte de P no meio (Adhikari & Pandey 2019). Finalmente, foi relatado que uma cepa *A. niger*, isolada da rizosfera, conseguiu disponibilizar $19,72 \text{ mg L}^{-1}$ de P, utilizando ZP, como única fonte de P (Bakri 2019).

Outra abordagem relativa ao uso de microrganismos solubilizadores de fosfato engloba a solubilização de fosfatos naturais (FN), levando em consideração que a aplicação direta desses materiais ao solo como fonte de P para as plantas é muito restrita devido à baixa reatividade dessas rochas (Soldan *et al.*, 20218; Mendes *et al.*, 2015). Por exemplo, Mendes *et al.*, 2014, avaliaram a solubilização em meio líquido efetuada por fungos isolados da rizosfera, atingido valores de P de até 147 e 127 mg L^{-1} , utilizando FN do Brasil Araxá e Catalão, respectivamente, como única fonte de P no meio. Por outro lado, foi avaliada a solubilização do FN Bayovar em meio líquido e fermentação sólida, onde cepas de *A. niger* conseguiram solubilizar até 280 e 67 mg L^{-1} de P, respectivamente (Klaic *et al.*, 2017). Também foi relatado, que fungos isolados da rizosfera conseguiram disponibilizar P em

substrato sólido, utilizando FN Mussoorie e URP da Índia, como única fonte de P (Kumar & Gaid 2019). Finalmente, foi relatado que 4 isolados fúngicos conseguiram disponibilizar até 693,16 mg L⁻¹ P, utilizando FN como única fonte de P (Qarni *et al.*, 2021).

Finalmente, novas abordagens são exploradas quanto ao uso de fungos e seu potencial para dessorver P do solo. A dessorção de P mediada pelo fungo *A. niger*, em meio líquido, variou de 17 a 23%, o que pode contribuir para melhorar a eficiência de uso de P em solos altamente intemperizados, abrindo perspectivas para o desenvolvimento de técnicas microbianas que possibilitem o acesso das plantas ao P fixado (Nascimento *et al.*, 2021).

FSF também têm sido amplamente estudados diretamente na promoção do crescimento vegetal, especificamente no papel da solubilização de fosfato, avaliando-os sozinhos ou com diferentes tipos de manejo de P (Bilal *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2018; Velázquez *et al.*, 2017). Mendes *et al.*, 2017 relataram que o teor de P no solo e na parte aérea de plantas de trevo foi superior quando fertirrigadas com o produto da fermentação de um FN pelo fungo *A. niger*, quando comparado com o controle com água destilada. Por outro lado, plantas de tomate fertilizadas com TCP e cepas de FSF apresentaram aumento de 191% no P foliar em relação aos controles (Arias 2019). A inoculação de uma cepa de *Trichoderma* sp. solubilizadora de P promoveu o crescimento de plantas de soja (Junior *et al.*, 2019). Também foi demonstrado que isolados de *Trichoderma* sp. tiveram efeitos positivos na germinação de sementes de trigo e cevada, no crescimento e na produtividade de plantas cultivadas em substratos contendo 0, 25 e 50% de FN (Kribel *et al.*, 2020). Finalmente, um trabalho utilizando duas cepas fúngicas demonstrou que, quando combinados com cinzas de madeira, levaram a aumentos significativos do teor de P disponível para as plantas no solo, aumentaram a absorção de P pelas plantas de milho e, conseqüentemente, promoveram maior produção de biomassa da parte aérea dessa planta (Mercl *et al.*, 2020).

Como descrito anteriormente, esses microrganismos são geralmente encontrados na rizosfera (Emami *et al.*, 2020), onde recebem carbono reduzido da planta. Nesse local, as raízes liberam rizodeposições que representam compostos variados, tais como aminoácidos (alanina, β-alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cistina, glutamina, glutâmica, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, mugineico, triptofano, tirosina e valina) ácidos orgânicos (acético, aconítico, ascórbico, cafeico, cítrico, p-cumarico, fórmico, fumárico, láctico, málico, oxalacético, oxálico, p-hidroxibenzoico, pirúvico, succínico, entre outros), açúcares (arabinose, frutose, galactose, glicose, maltose, manose,

rafinose, ramnose e ribose), vitaminas, proteínas, mucilagens de várias composições, oligossacarídeos, dentre outros (Shenoy & Kalagudi 2005; Jayakumar *et al.*, 2019; Peris *et al.*, 2020).

As rizodeposições moldam o microbioma da raiz e desempenham papel importante no recrutamento e atração da comunidade microbiana do solo para a rizosfera (Brescia *et al.*, 2020). Alguns compostos específicos podem atuar como moléculas sinalizadoras para regular a atividade dos microrganismos da rizosfera (Xiong *et al.*, 2020). Recentemente, estudos sobre a influência de compostos comumente encontrados na rizosfera sobre o potencial de solubilização de fósforo do solo revelaram que alguns aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos aumentam o P disponível do solo e o P da biomassa microbiana. Dentre esses compostos, o ácido málico mostrou-se o mais eficiente em induzir a liberação de P do solo. Além disso, o composto foi capaz de provocar aumentos significativos nas populações de MSF (Barrera, 2020). Assim, é possível que os MSF recrutados na presença de ácido málico sejam mais eficientes em disponibilizar P no solo, representando candidatos potenciais para o desenvolvimento de tecnologias microbianas para a melhoria do aproveitamento de fertilizantes fosfatados pelas plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Ghany, T. M., Mohamed, Z. H., Al Abboud, M. A., Helmy, E. A., Al-Rajhi, A. M., & Shater, A. R. M. (2019). Solubilization of inorganic phosphate by rhizospheric fungi isolated from soil cultivated with *Sorghum bicolor* L. *BioResources*, 14(3), 5521-5532.
- Adhikari, P., & Pandey, A. (2019). Phosphate solubilization potential of endophytic fungi isolated from *Taxus allichiana* Zucc. roots. *Rhizosphere*, 9, 2-9.
- Alaylar, B., Egamberdieva, D., Gulluce, M., Karadayi, M., & Arora, N. K. (2020). Integration of molecular tools in microbial phosphate solubilization research in agriculture perspective. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(7), 1-12.
- 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.
- Arias Mota, R. M., Romero Fernández, A. D. J., Bañuelos Trejo, J., & Cruz Elizondo, Y. D. L. (2019). Inoculation of phosphorus solubilizing fungi and arbuscular mycorrhizae in tomato plants. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(8), 1747-1757.
- Bakri, M. M. (2019). Tri-calcium and zinc phosphates solubilization by *Aspergillus niger* and its relation to organic acids production. *BioNanoScience*, 9(2), 238-244.
- Bhattacharjya, S., Adhikari, T., Kundu, S., Sahu, A., & Patra, A. K. (2019). Evaluation of microbial solubilization of nano rock phosphate. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(1), 1055-1069.
- Barrera G, Costa M (2020). Potencial de liberação de fosfato pela microbiota do solo suprida com diferentes fontes de carbono.
- Bilal, L., Asaf, S., Hamayun, M., Gul, H., Iqbal, A., Ullah, I., & Hussain, A. (2018). Plant growth promoting endophytic fungi *Aspergillus fumigatus* TS1 and *Fusarium proliferatum* BRL1 produce gibberellins and regulates plant endogenous hormones. *Symbiosis*, 76(2), 117-127.
- Billah, M., Khan, M., Bano, A., Hassan, T. U., Munir, A., & Gurmani, A. R. (2019). Phosphorus and phosphate solubilizing bacteria: keys for sustainable agriculture. *Geomicrobiology Journal*, 36(10), 904-916.
- Bononi, L., Chiaramonte, J. B., Pansa, C. C., Moitinho, M. A., & Melo, I. S. (2020). Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. *Scientific Reports*, 10(1), 1-13.
- Brescia, F., Marchetti-Deschmann, M., Musetti, R., Perazzolli, M., Pertot, I., & Puopolo, G. (2020). The rhizosphere signature on the cell motility, biofilm formation and secondary metabolite production of a plant-associated *Lysobacter* strain. *Microbiological Research*, 234, 126424.

Carmo, T. S., Moreira, F. S., Cabral, B. V., Dantas, R. C., de Resende, M. M., Cardoso, V. L., & Ribeiro, E. J. (2019). Phosphorus recovery from phosphate rocks using phosphate-solubilizing bacteria. *Geomicrobiology Journal*, *36*(3), 195-203.

Damian, J. M., Firmano, R. F., Cherubin, M. R., Pavinato, P. S., de Marchi Soares, T., Paustian, K., & Cerri, C. E. P. (2020). Changes in soil phosphorus pool induced by pastureland intensification and diversification in Brazil. *Science of the Total Environment*, *703*, 135463.

Doilom, M., Guo, J. W., Phookamsak, R., Mortimer, P. E., Karunarathna, S. C., Dong, W., & Xu, J. C. (2020). Screening of phosphate-solubilizing fungi from air and soil in Yunnan, China: four novel species in *Aspergillus*, *Gongronella*, *Penicillium* and *Talaromyces*. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 2443.

Emami, S., Alikhani, H. A., Pourbabae, A. A., Etesami, H., Motasharezadeh, B., & Sarmadian, F. (2020). Consortium of endophyte and rhizosphere phosphate solubilizing bacteria improves phosphorous use efficiency in wheat cultivars in phosphorus deficient soils. *Rhizosphere*, *14*, 100196.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2015). World fertilizer trends and outlook to 2018.

Farias, P. I. V., Freire, E., Cunha, A. L. C. D., Grumbach, R. J. D. S., & Antunes, A. M. D. S. (2020). The fertilizer industry in Brazil and the assurance of inputs for biofuels production: prospective scenarios after COVID-19. *Sustainability*, *12*(21), 8889.

Fischer, P., Pöthig, R., Gücker, B., & Venohr, M. (2018). Phosphorus saturation and superficial fertilizer application as key parameters to assess the risk of diffuse phosphorus losses from agricultural soils in Brazil. *Science of the Total Environment*, *630*, 1515-1527.

Gouveia, A. D. S., Monteiro, T. S. A., Valadares, S. V., Sufiate, B. L., de Freitas, L. G., Ramos, H. J. D. O., & de Queiroz, J. H. (2019). Understanding how *Pochonia chlamydosporia* increases phosphorus availability. *Geomicrobiology Journal*, *36*(8), 747-751.

Gowami, S. P., Maurya, B. R., & Dubey, A. N. (2019). Role of phosphorus solubilizing microorganisms and dissolution of insoluble phosphorus in soil. *International Journal of Chemical Studies*, *7*, 3905-3913.

Hafeez, F., Amin, B. A. Z., Akbar, U., Iqbal, A., Faridullah, Bilal, M., & Nazir, R. (2019). Assessment of phosphorus availability in soil by introducing P-solubilizing novel bacterial and fungal strains of Lower Himalaya. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, *50*(13), 1541-1549.

Ingle, K. P., & Padole, D. A. (2017). Phosphate solubilizing microbes: an overview. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *6*(1), 844-852.

Jayakumar, N., Paulraj, P., Sajeesh, P., Sajna, K., & Zinneera, A. (2019). Application of native phosphate solubilizing bacteria for the use of cheap organic and inorganic phosphate source in agricultural practice of *Capsicum annum* (Chili)-A pilot scale field study. *Materials Today: Proceedings*, *16*, 1630-1639.

- Jiang, Y., Ge, F., Li, F., Zhang, D., Deng, S., & Tian, J. (2020). Intracellular metabolomics switching alters extracellular acid production and insoluble phosphate solubilization behavior in *Penicillium oxalicum*. *Metabolites*, *10*(11), 441.
- Junior, A. F. C., Chagas, L. F. B., de Oliveira Miller, L., & de Oliveira, J. C. (2019). Efficiency of *Trichoderma asperellum* UFT 201 as plant growth promoter in soybean. *African Journal of Agricultural Research*, *14*(5), 263-271.
- Klaic, R., Plotegher, F., Ribeiro, C., Zangirolami, T. C., & Farinas, C. S. (2017). A novel combined mechanical-biological approach to improve rock phosphate solubilization. *International Journal of Mineral Processing*, *161*, 50-58.
- Kribel, S., Qostal, S., Ouazzani Touhami, A., Selmaoui, K., Chliyeh, M., Benkirane, R., & Achbani, E. H. (2020). Effects of *Trichoderma* on growth and yield of wheat and barley and its survival ability on roots and amended rock phosphate growing substrates. *Current Research in Environmental & Applied Mycology (Journal of Fungal Biology)*, *10*(1), 400-416.
- Kumar, C. S., Jacob, T. K., Devasahayam, S., Thomas, S., & Geethu, C. (2018). Multifarious plant growth promotion by an entomopathogenic fungus *Lecanicillium psalliotae*. *Microbiological Research*, *207*, 153-160.
- Kumar, S., & Gaiind, S. (2019). Fermentative production of soluble phosphorus fertilizer using paddy straw: an alternate to biomass burning. *International Journal of Environmental Science and Technology*, *16*(10), 6077-6088.
- Kumar, A., Teja, E. S., Mathur, V., & Kumari, R. (2020). Phosphate solubilizing fungi: current perspective, mechanisms and potential agricultural applications. *Agriculturally Important Fungi for Sustainable Agriculture*, 121-141.
- Lipińska, A., Kucharski, J., & Wyszowska, J. (2019). Activity of phosphatases in soil contaminated with PAHs. *Water, Air, & Soil Pollution*, *230*(12), 1-15.
- Mendes G, G., de Freitas, A. L. M., Pereira, O. L., da Silva, I. R., Vassilev, N. B., & Costa, M. D. (2014). Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Annals of Microbiology*, *64*(1), 239-249.
- Mendes, G. D. O., da Silva, N. M. R. M., Anastácio, T. C., Vassilev, N. B., Ribeiro Jr, J. I., da Silva, I. R., & Costa, M. D. (2015). Optimization of *Aspergillus niger* rock phosphate solubilization in solid-state fermentation and use of the resulting product as a P fertilizer. *Microbial Biotechnology*, *8*(6), 930-939.
- Mendes, G., Galvez, A., Vassileva, M., & Vassilev, N. (2017). Fermentation liquid containing microbially solubilized P significantly improved plant growth and P uptake in both soil and soilless experiments. *Applied Soil Ecology*, *117*, 208-211.
- Mercl, F., Garcia-Sanchez, M., Kulhánek, M., Košnář, Z., Száková, J., & Tlustoš, P. (2020). Improved phosphorus fertilisation efficiency of wood ash by fungal strains *Penicillium* sp. PK112 and *Trichoderma harzianum* OMG08 on acidic soil. *Applied Soil Ecology*, *147*, 103360.

- Mitra, D., Anđelković, S., Panneerselvam, P., Senapati, A., Vasić, T., Ganeshamurthy, A. N., & Radha, T. K. (2020). Phosphate-solubilizing microbes and biocontrol agent for plant nutrition and protection: current perspective. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, *51*(5), 645-657.
- Nascimento, J. M., Netto, J. A. F. V., Valadares, R. V., de Oliveira Mendes, G., da Silva, I. R., Vergütz, L., & Costa, M. D. (2021). *Aspergillus niger* as a key to unlock fixed phosphorus in highly weathered soils. *Soil Biology and Biochemistry*, *156*, 108190.
- Pavinato, P. S., Cherubin, M. R., Soltangheisi, A., Rocha, G. C., Chadwick, D. R., & Jones, D. L. (2020). Revealing soil legacy phosphorus to promote sustainable agriculture in Brazil. *Scientific Reports*, *10*(1), 1-11.
- Peris, V., de Ollas, C., Gómez-Cadenas, A., & Pérez-Clemente, R. M. (2020). Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond. *Plant Cell Reports*, *39*(1), 3-17.
- Pogorzelski, D., Lustosa Filho, J. F., Matias, P. C., Santos, W. O., Vergütz, L., & Melo, L. C. A. (2020). Biochar as composite of phosphate fertilizer: characterization and agronomic effectiveness. *Science of the Total Environment*, *743*, 140604.
- Prabhu, N., Borkar, S., & Garg, S. (2019). Phosphate solubilization by microorganisms: overview, mechanisms, applications and advances. *Advances in Biological Science Research*, 161-176.
- Qarni, A., Billah, M., Hussain, K., Shah, S. H., Ahmed, W., Alam, S., & Khan, N. (2021). Isolation and characterization of phosphate solubilizing microbes from rock phosphate mines and their potential effect for sustainable agriculture. *Sustainability*, *13*(4), 2151.
- Rfaki, A., Zennouhi, O., Aliyat, F. Z., Nassiri, L., & Ibijbijen, J. (2020). Isolation, selection and characterization of root-associated rock phosphate solubilizing bacteria in Moroccan wheat (*Triticum aestivum* L.). *Geomicrobiology Journal*, *37*(3), 230-241.
- Rosa, P. A. L., Mortinho, E. S., Jalal, A., Galindo, F. S., Buzetti, S., Fernandes, G. C., & Teixeira Filho, M. C. M. (2020). Inoculation with growth-promoting bacteria associated with the reduction of phosphate fertilization in sugarcane. *Frontiers in Environmental Science*, *8*, 32.
- Roy, E. D., Richards, P. D., Martinelli, L. A., Della Coletta, L., Lins, S. R. M., Vazquez, F. F., & Porder, S. (2016). The phosphorus cost of agricultural intensification in the tropics. *Nature Plants*, *2*(5), 1-6.
- Sahandi, M. S., Mehrafarin, A., Badi, H. N., Khalighi-Sigaroodi, F., & Sharifi, M. (2019). Improving growth, phytochemical, and antioxidant characteristics of peppermint by phosphate-solubilizing bacteria along with reducing phosphorus fertilizer use. *Industrial Crops and Products*, *141*, 111777.
- Sajeesh, P., Paulraj, P., Jayakumar, N., Sajna, K. P., & Igga, W. A. W. (2019). A pilot scale field study of using phosphate solubilizing bacterial native microflora for the use of cheap organic and inorganic phosphate source for the agriculture practice of *Solanum melongena* Linn. (Eggplant). *Materials Today: Proceedings*, *16*, 1722-1731.

- Sarr, P. S., Tibiri, E. B., Fukuda, M., Zongo, A. N., & Nakamura, S. (2020). Phosphate-solubilizing fungi and alkaline phosphatase trigger the P solubilization during the co-composting of sorghum straw residues with Burkina Faso phosphate rock. *Frontiers in Environmental Science*, *8*, 174.
- Schachtman, D. P., Reid, R. J., & Ayling, S. M. (1998). Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiology*, *116*(2), 447-453.
- Shenoy, V. V., & Kalagudi, G. M. (2005). Enhancing plant phosphorus use efficiency for sustainable cropping. *Biotechnology Advances*, *23*(7-8), 501-513.
- Shrivastava, M., Srivastava, P. C., & D'Souza, S. F. (2018). Phosphate-solubilizing microbes: diversity and phosphates solubilization mechanism. *Role of Rhizospheric Microbes in Soil*. 137-165.
- Soldan, A., Watzlawick, L. F., Botelho, R. V., Faria, C. M. D. R., & Maia, A. J. (2018). Development of forestry species inoculated with *Trichoderma* spp. fertilized with rock phosphate. *Floresta e Ambiente*, *25*(4), 1-8.
- Tandon, A., Fatima, T., Shukla, D., Tripathi, P., Srivastava, S., & Singh, P. C. (2020). Phosphate solubilization by *Trichoderma koningiopsis* (NBRI-PR5) under abiotic stress conditions. *Journal of King Saud University-Science*, *32*(1), 791-798.
- Velázquez, M. S., Cabello, M. N., Eliades, L. A., Russo, M. L., Allegrucci, N., & Schalamuk, S. (2017). Combinación de hongos movilizadores y solubilizadores de fósforo con rocas fosfóricas y materiales volcánicos para la promoción del crecimiento de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Revista Argentina de Microbiología*, *49*(4), 347-355.
- Verduzco, F. A., Cedeño-Valdivia, P. A., Chan-Cupul, W., Hernández-Ortega, H. A., Ruiz-Sánchez, E., Galindo-Velasco, E., & Cruz-Crespo, E. (2020). Phosphates solubilization, indol-3-acetic acid and siderophores production by *Beauveria brongniartii* and its effect on growth and fruit quality of *Capsicum chinense*. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *95*(2), 235-246.
- Wang, H. Y., Shen, L. I. U., Zhai, L. M., Zhang, J. Z., Ren, T. Z., Fan, B. Q., & LIU, H. B. (2015). Preparation and utilization of phosphate biofertilizers using agricultural waste. *Journal of Integrative Agriculture*, *14*(1), 158-167.
- Wang, Q., Xiao, C., Feng, B., & Chi, R. (2020a). Phosphate rock solubilization and the potential for lead immobilization by a phosphate-solubilizing bacterium (*Pseudomonas* sp.). *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, *55*(4), 411-420.
- Wang, X., Xiong, J., & He, Z. (2020b). Activated dolomite phosphate rock fertilizers to reduce leaching of phosphorus and trace metals as compared to superphosphate. *Journal of Environmental Management*, *255*, 109872.
- Wei, Y., Zhao, Y., Shi, M., Cao, Z., Lu, Q., Yang, T., & Wei, Z. (2018). Effect of organic acids production and bacterial community on the possible mechanism of phosphorus solubilization

during composting with enriched phosphate-solubilizing bacteria inoculation. *Bioresource Technology*, 247, 190-199.

Withers, P. J., Rodrigues, M., Soltangheisi, A., De Carvalho, T. S., Guilherme, L. R., Benites, V. D. M., & Pavinato, P. S. (2018). Transitions to sustainable management of phosphorus in Brazilian agriculture. *Scientific Reports*, 8(1), 1-13.

Xiong, Y. W., Li, X. W., Wang, T. T., Gong, Y., Zhang, C. M., Xing, K., & Qin, S. (2020). Root exudates-driven rhizosphere recruitment of the plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus flexus* KLBMP 4941 and its growth-promoting effect on the coastal halophyte *Limonium sinense* under salt stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 194, 110374.

Zhang, Y., Chen, F. S., Wu, X. Q., Luan, F. G., Zhang, L. P., Fang, X. M., & Ye, J. R. (2018). Isolation and characterization of two phosphate-solubilizing fungi from rhizosphere soil of moso bamboo and their functional capacities when exposed to different phosphorus sources and pH environments. *PloS One*, 13(7), e0199625.

3. CAPÍTULO II

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS SOLUBILIZADORES DE
FOSFATO DE SOLO TRATADO COM ÁCIDO MÁLICO**

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO DE SOLO TRATADO COM ÁCIDO MÁLICO

3.1 RESUMO

O fósforo (P) desempenha importante papel no desenvolvimento das plantas, sendo essencial para a manutenção de produtividade das lavouras. Somente 0,1% do P total do solo está disponível para as plantas, tornando necessário a adição de fertilizantes fosfatados para suprir a demanda das plantas pelo elemento. No entanto, parte do P adicionado ao solo torna-se indisponível como consequência dos processos de precipitação, adsorção, imobilização e fixação. Os microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) são considerados importantes componentes na ciclagem do P nos solos, uma vez que podem reverter esse processo e disponibilizar o nutriente novamente para as plantas por meio de vários mecanismos, a exemplo da produção de ácidos orgânicos, fosfatases e agentes quelantes. MSFs podem ser encontrados na rizosfera, região do solo influenciada pelas rizodeposições da planta. Recentemente, foi constatado que o ácido málico altera a dinâmica do P e aumenta as populações de MSF no solo. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de isolar e caracterizar fungos solubilizadores de fosfato de solo tratado com ácido málico e explorar o potencial dos mesmos em solubilizar diferentes fontes de P. Para tal, amostras de solo foram incubadas em meio NBRIP modificado, suplementado com 3,99 g L⁻¹ de ácido málico, durante 15 dias a 28 °C. Após o período de incubação, procedeu-se o isolamento fúngico em ágar NBRIP. Colônias que apresentaram halo de solubilização no meio foram isoladas e purificadas com o objetivo de se avaliar o potencial de solubilização de diferentes fontes de P e a liberação de P no solo, na ausência ou presença do ácido málico. O ácido málico aumentou as populações de fungos solubilizadores de fosfato no solo após o período de incubação de 15 dias. Os isolados obtidos foram capazes de solubilizar diferentes fontes de P pouco reativas. Os maiores valores de P solúvel foram obtidos para o Ca₃PO₄ (563,4mg L⁻¹); FePO₄ (26,2 mg L⁻¹) e AlPO₄ (17,8 mg L⁻¹). Para os fosfatos de rocha, os maiores valores de P solúvel foram obtidos para os fosfatos de Aipe (105,5 mg L⁻¹); Patos (76,3 mg L⁻¹); Catalão (49,1 mg L⁻¹) e Araxá (26,1 mg L⁻¹). O ácido málico não favoreceu a solubilização dos fosfatos de rocha pelos isolados fúngicos testados, mas teve efeito direto sobre os fosfatos testados aumentando o P solúvel no sobrenadante ao final da incubação. Os mecanismos de aumento das populações de fungos solubilizadores de fosfato são desconhecidos, mas, possivelmente, envolvem estratégias de recrutamento microbiano na rizosfera.

PALAVRAS-CHAVE: Ácido málico. Fungos solubilizadores de fosfato. Rochas fosfóricas. P adsorvido.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PHOSPHATE SOLUBILIZING FUNGI OF SOIL TREATED WITH MALIC ACID

3.1 SUMMARY

Phosphorus (P) plays an important role in plant development, being essential for maintaining crop productivity. Only 0.1% of the total P in the soil is available to the plants, making it necessary to add phosphate fertilizers to supply the plants' demand for the element. However, part of the P added to the soil becomes unavailable as a consequence of precipitation, adsorption, immobilization and fixation reactions. Phosphate solubilizing microorganisms (MSF) are considered important components in the cycling of P in soils, as they can reverse these processes and make the nutrient available again to plants through various mechanisms, such as the production of organic acids, phosphatases and chelating agents. MSFs can be found in the rhizosphere, a region of the soil influenced by plant rhizodepositions. Recently, it was found that malic acid alters P dynamics and increases MSF populations in the soil. Thus, the objective of this work was to isolate and characterize phosphate solubilizing fungi from soil treated with malic acid and to explore their potential to solubilize different P sources. For this purpose, soil samples were incubated in modified NBRIP medium, supplemented with 3.99 g L⁻¹ of malic acid, for 15 days at 28 °C. After the incubation period, fungal isolation was carried out in NBRIP agar. Colonies that showed a solubilization halo in the medium were isolated and purified in order to evaluate the solubilization potential of different P sources and the release of P in the soil, in the absence or presence of malic acid. Malic acid increased the populations of phosphate-solubilizing fungi in the soil after the 15-day incubation period. The isolates obtained were capable of solubilizing different low reactive P sources. The highest values of soluble P were obtained for Ca₃PO₄ (563,4 mg L⁻¹); FePO₄ (26,2 mg L⁻¹) and AlPO₄ (17,8 mg L⁻¹). For rock phosphates, the highest values of soluble P were obtained for the phosphates Aipe (105,5 mg L⁻¹); Patos (76,3 mg L⁻¹); Catalão (49,1 mg L⁻¹), and Araxá (26,1 mg L⁻¹). Malic acid did not favor the solubilization of rock phosphates by the tested fungal isolates, but it had a direct effect on the tested phosphates, increasing the soluble P in the supernatant at the end of the incubation period. The mechanisms for increasing the populations of phosphorus solubilizing fungi are unknown, but possibly involve microbial recruitment strategies in the rhizosphere.

KEYWORDS: Malic acid. Phosphate solubilizing fungi. Phosphoric rocks. Adsorbed P.

3.2 INTRODUÇÃO

Em razão do aumento da demanda mundial por alimentos, impulsionada pelo crescimento da população, torna-se necessária a intensificação da agricultura (Roy *et al.*, 2016). Nesse contexto, o suprimento adequado de fósforo (P) torna-se fundamental para a segurança alimentar mundial nas próximas décadas (Zineb *et al.*, 2020), quando se espera aumentos crescentes no uso desse nutriente para atender a demanda das culturas (Torri *et al.*, 2017). A fertilização com P é importante tópico na pesquisa agrícola (Zineb *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2016). Por ser o segundo nutriente mais exigido pelas plantas e ser recurso natural não renovável (Bechtaoui *et al.*, 2020), o uso eficiente de P é uma das linhas de pesquisa mais importantes na atualidade.

O P desempenha papel importante no desenvolvimento das plantas, como componente estrutural e em funções metabólicas, incluindo a manutenção de estruturas de membrana, síntese de biomoléculas e formação de moléculas de alta energia (Behera *et al.*, 2017). Também auxilia na divisão celular, na ativação-inativação de enzimas e no metabolismo de carboidratos (Behera *et al.*, 2017). Nos solos, apenas 0,1% do P total encontra-se na forma solúvel disponível para absorção pelas plantas (Islam *et al.*, 2019). Em face de algumas transformações químicas, o elemento torna-se pouco disponível depois de sofrer reações de precipitação, adsorção, imobilização e fixação (Bakri 2019). Assim, a aplicação de fertilizantes fosfatados torna-se necessária para compensar a quantidade de P que fica armazenada em compartimento poucos acessíveis às plantas (Malhotra *et al.*, 2018). Sabe-se que grande parte do P adicionado ao solo forma complexos de Fe, Al e Ca (Vassilev *et al.*, 2019) ou é lixiviado pelo escoamento de água no perfil ou na superfície do solo (Malhotra *et al.*, 2018), resultando em aumento do custo da produção agrícola e em impactos ambientais negativos (George *et al.*, 2016; Parastesh *et al.*, 2019).

Microrganismos rizosféricos, particularmente os microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF), desempenham função crítica no ciclo natural do P (Ghany *et al.*, 2019). Os MSF são capazes de disponibilizar o P no solo (Sarkar *et al.*, 2019), principalmente pela produção de ácidos orgânicos, enzimas fosfatases e agentes complexantes (Hamim *et al.*, 2019), melhorando o aproveitamento do P pelas plantas (Rasul *et al.*, 2019). Portanto o uso de MSF na produção agrícola constitui abordagem promissora para melhorar a segurança alimentar mundial (Wang *et al.*, 2015).

A rizosfera corresponde ao volume de solo influenciada pelas raízes das plantas, sendo local de intensa atividade microbiana (Kotoky *et al.*, 2018). As raízes das plantas, por meio de rizodeposições, podem influenciar o solo e os microrganismos ali presentes (Singh *et al.*, 2019). As rizodeposições incluem açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e compostos de alto peso molecular, dentre outros materiais. Por meio desses compostos, as raízes podem atrair, deter ou eliminar microrganismos da rizosfera, tendo a capacidade de selecionar populações microbianas específicas (Liu *et al.*, 2020). A adição de 39 compostos relatados como rizosféricos no solo, incluindo açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos, promoveram aumentos no P liberado do solo e o P da biomassa microbiana. Adicionalmente, foi observado que a adição de ácido málico ao solo, simulando a liberação de exsudatos radiculares, provocou aumentos significativos nas populações de MSF (Barrera, 2020). Hipotetizamos que essas populações que respondem à presença de ácido málico sejam mais eficientes em disponibilizar P no solo. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de isolar e caracterizar fungos solubilizadores de fosfato de solo tratado com ácido málico e explorar o potencial dos mesmos em solubilizar P de fontes insolúveis.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Ecologia Microbiana, do Departamento de Microbiologia, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, localizado no prédio do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO).

3.3.1 Contagem e isolamento de fungos solubilizadores de fosfato de solo tratado com ácido málico

O experimento foi conduzido seguindo-se o método proposto por Debnath *et al.* (1994), modificado por Barrera (2020) e consistiu da incubação de 1 g de solo em tubos de tampa rosca contendo 15 mL de meio NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium) (Nautiyal 1999) modificado contendo L⁻¹: Ácido málico 11 g; MgCl₂ 6H₂O, 5 g; MgSO₄ 7H₂O, 0,25 g; KCl 0,2 g; (NH₄)₂SO₄ 0,1 g, por 15 dias a 28 °C. Um controle sem adição de ácido málico também foi incluído. Após do período de incubação, foram avaliadas as densidades populacionais de fungos solubilizadores de fosfato (FSF) no solo. Para tal, os tubos foram agitados vigorosamente e uma alíquota de 1 mL foi diluída serialmente em 9 mL de solução salina (0,85 % de NaCl) até a diluição de 10⁻⁶. Alíquotas em triplicata de cada diluição foram plaqueadas em ágar NBRIP sem modificações (Nautiyal 1999) e as placas foram incubadas a 28 °C, durante 7 dias. Após a incubação, o número de unidades formadoras de

colônia de FSF foram contadas, isoladas, purificadas e mantidas ativas em ágar BDA para os experimentos posteriores.

3.3.2 Caracterização de fungos solubilizadores de fosfato

A capacidade de solubilização de fosfato dos isolados foi avaliada segundo a metodologia de Mendes *et al.* (2014a). Frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio NBRIP (Nautiyal 1999) modificado, contendo L⁻¹: Glicose 10 g; MgCl₂ 6H₂O, 5 g; MgSO₄ 7H₂O, 0,25 g; KCl 0,2 g; (NH₄)₂SO₄ 0,1 g, sendo avaliadas as fontes de P Ca₃PO₄; AlPO₄; FePO₄, fosfato de Araxá, fosfato de Patos, fosfato de Catalão ou fosfato de Aipe 3 g; foram inoculados com 10⁶ conídios retirados de culturas fúngicas cultivadas em meio BDA por 7 dias a 28 °C. Posteriormente, os frascos foram incubados em agitador orbital durante 7 dias a 28 °C e 150 rpm. Um controle sem inoculação fúngica foi, também, incluído para a aferição da solubilização abiótica das fontes de P adicionadas ao meio. Após a incubação, o meio foi filtrado em filtro de papel quantitativo, JP42, com poros de 8 µm, e, no sobrenadante obtido, foram avaliados o P liberado pelo método do ácido ascórbico (Braga & Defelipo, 1974), o pH, em potenciômetro de bancada, e a acidez titulável (Mendes *et al.*, 2014a).

3.3.3 Solubilização de fosfato *in vitro* com e sem ácido málico

Frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio NBRIP (Nautiyal 1999) modificado, contendo L⁻¹: Glicose 10 g; MgCl₂ 6H₂O, 5 g; MgSO₄ 7H₂O, 0,25 g; KCl 0,2 g; (NH₄)₂SO₄ 0,1 g, sendo avaliadas os fosfatos de Araxá, Patos, Catalão ou Aipe 3 g, contendo ou não Ácido Málico 11 g, foram inoculados com 10⁶ conídios retirados das culturas dos isolados fúngicos selecionados na etapa anterior, crescidas em meio BDA por 7 dias a 28 °C. Os frascos foram incubados em agitador orbital durante 7 dias a 28 °C e 150 rpm. Um controle sem inoculação fúngica foi, também, incluído para a aferição da solubilização abiótica das fontes de P adicionadas ao meio. Após a incubação, o meio foi filtrado em filtro de papel quantitativo, JP42, com poros de 8 µm, e, no sobrenadante obtido, foram avaliados o P liberado pelo método do ácido ascórbico (Braga & Defelipo, 1974), o pH, em potenciômetro de bancada, e a acidez titulável (Mendes *et al.*, 2014a).

3.3.4 Solubilização de fosfato *in vitro* com diferentes concentrações de ácido málico

Frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio NBRIP (Nautiyal 1999) modificado, contendo L⁻¹: Glicose 10 g; MgCl₂ 6H₂O, 5 g; MgSO₄ 7H₂O, 0,25 g; KCl 0,2 g; (NH₄)₂SO₄ 0,1 g; fosfato de Araxá 3 g e contendo 0, 25, 50, 75 ou 100 µM de Ácido Málico,

concentrações relatadas como rizodeposições (Zhang *et al.*, 2014), foram inoculados com 10^6 conídios retirados das culturas dos isolados fúngicos selecionados na etapa anterior, crescidas em meio BDA por 7 dias a 28 °C. Os frascos foram incubados em agitador orbital durante 7 dias a 28 °C e 150 rpm. Um controle sem inoculação fúngica foi, também, incluído para a aferição da solubilização abiótica da fonte de P adicionada ao meio. Após a incubação, o meio foi filtrado em filtro de papel quantitativo, JP42, com poros de 8 μm , e, no sobrenadante obtido, foram avaliados o P liberado pelo método do ácido ascórbico (Braga & Defelipo, 1974), o pH, em potenciômetro de bancada, e a acidez titulável (Mendes *et al.*, 2014a).

3.3.5 Dessorção de P *in vitro* com e sem ácido málico

A capacidade de dessorção de fosfato dos isolados foi avaliada segundo a metodologia de (Nascimento *et al.*, 2021). Frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio NBRIP (Nautiyal 1999) modificado, contendo L^{-1} : Glicose 10 g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g; KCl 0,2 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 g, solo com quantidade de P equivalente ao 100 % da capacidade máxima de adsorção de fosfato (CMAP) 80 g; contendo ou não Ácido Málico a 11 g, foram inoculados com 10^6 conídios retirados das culturas fúngicas crescidas em meio BDA por 7 dias a 28 °C. Os frascos foram incubados em agitador orbital durante 7 dias a 28 °C e 150 rpm. Um controle sem inoculação fúngica foi, também, incluído para a aferição da solubilização abiótica da fonte de P adicionada ao meio. Após a incubação, o meio foi filtrado em filtro de papel quantitativo, JP42, com poros de 8 μm , e, no sobrenadante obtido, foram avaliados o P liberado pelo método do ácido ascórbico (Braga & Defelipo, 1974), o pH, em potenciômetro de bancada, e a acidez titulável (Mendes *et al.*, 2014a).

3.3.6 Potencial de liberação de P do solo pelos isolados com e sem ácido málico

O experimento foi conduzido seguindo-se a metodologia de (Barrera 2020) modificado, consistindo da incubação de 1 g de solo estéril em tubos de tampa rosca contendo 15 mL de meio NBRIP (Nautiyal 1999) modificado, contendo L^{-1} : $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g; KCl 0,2 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 g; Ácido málico ou não 11 g. Os tubos foram inoculados com 10^6 conídios retirados das culturas fúngicas crescidas em meio BDA por 7 dias a 28 °C e incubados por 15 dias a 28 °C. Um controle sem inoculação fúngica foi, também, incluído para a aferição da solubilização abiótica de P presente no solo. Após do período de incubação, o meio foi filtrado em filtro de papel quantitativo, JP42, com poros de 8 μm , e, no sobrenadante obtido, foram avaliados o P liberado pelo método do ácido ascórbico (Braga & Defelipo, 1974), o pH,

em potenciômetro de bancada, a acidez titulável (Mendes *et al.*, 2014a) e o P da biomassa microbiana do solo pelo método proposto por Headley & Stewart (1982) modificado por Barrera (2020).

3.3.7 Delineamento experimental e análises estatísticas

Os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. A análise de correlação foi realizada para avaliar as relações entre a concentração de P solúvel, pH e acidez titulável.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Contagem e isolamento de fungos solubilizadores de fosfato de solo tratado com ácido málico

Foram observados aumentos nas populações de FSF após incubação do solo com meio NBRIP modificado suplementado com ácido málico como única fonte de carbono após de 15 dias de incubação a 28 °C (Figura 1). Nos tratamentos com a suplementação de meio com ácido málico observaram-se o total de $8,3 \times 10^4$ UFC g⁻¹, e no tratamento sem a suplementação, $1,4 \times 10^3$ UFC g⁻¹. As colônias fúngicas oriundas do tratamento com ácido málico foram utilizadas para isolamento de culturas puras, obtendo-se o total de 15 isolados. Posteriormente, 5 isolados foram escolhidos para dar prosseguimento aos experimentos com base em características morfológicas distintas e diâmetro do halo de solubilização em ágar NBRIP.

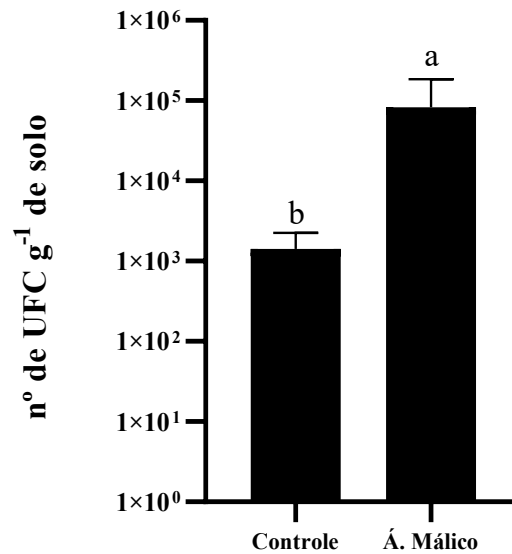


Figura 1. Unidades formadoras de colônia (UFC) de fungos solubilizadores de fosfato medidas após a incubação de amostras solo, por 15 dias a 25°C, em meio NBRIP modificado, suplementado com ácido málico. Um controle sem adição de fonte de carbono foi também incluído. Barras com mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.4.2 Caracterização de fungos solubilizadores de fosfato

Os cinco isolados selecionados foram capazes de solubilizar as fontes de P testadas, com valores de P solúvel, % P solubilizado e acidez titulável superiores aos observados no tratamento controle (Tabela 1). Para os tratamentos com FePO_4 , o isolado F-AM1 foi o único que provocou a solubilização dessa fonte de P (Tabela 1). O crescimento dos isolados em meio NBRIP modificado com as fontes de P testadas levaram a redução do pH do meio (Tabela 1).

Os maiores valores de P solúvel obtidos foram obtidos para Ca_3PO_4 (563,4 mg L⁻¹); FePO_4 (26,2 mg L⁻¹) e AlPO_4 (17,8 mg L⁻¹), o que corresponde a percentagens de solubilização de 94; 4,2 e 2,3 %, respectivamente. Para os fosfatos de rocha, os maiores valores de P solúvel foram obtidos para Aipe (105,5 mg L⁻¹); Patos (76,3 mg L⁻¹); Catalão (49,1 mg L⁻¹) e Araxá (26,1 mg L⁻¹), correspondendo a percentagens de solubilização de 13,5; 17,7; 10,1 e 6,2 %, respectivamente (Tabela 1).

Baseado nos coeficientes de correlação (r) obtidos, o teor de P solúvel correlacionou-se negativamente com o pH e, positivamente, com a acidez titulável, medidos no sobrenadante do meio de cultura após a incubação (Tabela 2).

3.4.3 Solubilização de fosfato *in vitro* com e sem ácido málico

A presença do ácido málico no meio favoreceu a solubilização abiótica das rochas fosfóricas avaliadas e não apresentou efeito sobre a solubilização efetuado pelo isolado F-AM2 (Figura 2a-b). Foi observado que, independentemente da fonte de P adicionada ao meio, os valores de P solúvel, % P solubilizado e a acidez titulável, decresceram na seguinte ordem: NBRIP+AM+F-AM2 = NBRIP+AM > NBRIP+F-AM2 > NBRIP (Figuras 2a-b-d). Para os valores de pH decresceram na seguinte ordem: NBRIP > NBRIP+F-AM2 > NBRIP+AM = NBRIP+AM+F-AM2 (Figura 2c).

3.4.4 Solubilização de fosfato *in vitro* com diferentes concentrações de ácido málico

A presença de diferentes concentrações de ácido málico não apresentou efeito na solubilização de fosfato por parte do isolado F-AM2 (Figura 3a-b). No entanto, crescentes concentrações de ácido málico favoreceram a solubilização abiótica do fosfato de rocha testado (Figura 3a-b). Os tratamentos com isolado F-AM2 resultaram em diminuição drástica do pH do meio de cultura quando comparado ao controle. Aumentos na concentração de ácido málico levaram à diminuição do pH do meio (Figura 3c). Os valores de acidez titulável medidos foram maiores no meio inoculado com o isolado F-AM2 quando comparado ao controle sem inoculação (Figura 3d).

Tabela 1. P solúvel, % de solubilização, pH e acidez titulável após cultivo de isolados de fungos selecionados em meio líquido contendo diferentes fontes de P após sete dias de incubação a 28 °C e 150 rpm.

Fungo isolado	Fonte de P						
	AlPO ₄	Ca ₃ PO ₄	FePO ₄	Araxá	Patos	Catalão	Aipe
P solúvel (mg L⁻¹)							
F-AM1	9,9 ab	524,7 a	26,2 a	13,4 bc	54,8 a	20,9 b	68,4 b
F-AM2	14,8 a	545,8a	5,0 c	26,1 a	76,3 a	49,1 a	98,6 a
F-AM3	11,8 ab	553,0 a	8,5 c	19,8 ab	50,3 a	40,1 a	99,4 a
F-AM4	17,8 a	552,5 a	8,3 c	25,6 a	49,5 a	41,9 a	105,2 a
F-AM10	14,5 a	563,4 a	8,1 c	19,1 ab	60,3 a	48,1 a	102,5 a
Controle	2,1 b	9,4 b	17,6 b	1,5 c	0,5 b	0,6 c	0,0 c
% de P solubilizado							
F-AM1	1,3 ab	87,6 a	4,3 a	3,2 bc	12,7 a	4,3 b	8,7 b
F-AM2	1,9 a	91,1 a	0,8 c	6,2 a	17,6 a	10,1 a	12,6 a
F-AM3	1,5 ab	92,3 a	1,4 c	4,7 ab	11,6 a	8,3 a	12,7 a
F-AM4	2,3 a	92,2 a	1,4 c	6,1 a	11,5 a	8,6 a	13,5 a
F-AM10	1,9 a	94,0 a	1,3 c	4,6 ab	13,9 a	9,9 a	13,1 a
Controle	0,3 b	1,6 b	2,8 b	0,4 c	0,1 b	0,1 c	0,0 c
pH							
F-AM1	1,59 b	3,59 b	2,43 b	2,30 b	3,15 b	3,63 b	3,32 b
F-AM2	1,71 b	3,09 b	2,47 b	1,70 c	2,60 c	2,66 c	2,92 c
F-AM3	1,87 b	3,48 b	2,62 ab	1,71 c	2,67 c	2,70 c	2,92 c
F-AM4	1,63 b	3,47 b	2,62 ab	1,69 c	2,81 bc	2,68 c	2,89 c
F-AM10	1,69 b	3,50 b	2,64 ab	1,62 c	2,96 bc	2,66	2,92 c
Controle	6,09 a	6,62 a	2,84 a	5,80 a	4,50 a	4,24 a	5,94 a
Acidez Titulável (mmol H⁺L⁻¹)							
F-AM1	0,512 b	4,952 a	1,025 a	1,025 a	1,025 ab	0,683 b	1,878 b
F-AM2	1,195 a	5,465 a	0,512 b	0,512 b	1,708 ab	2,220 a	2,732 ab
F-AM3	1,025 a	5,294 a	0,512 b	0,512 b	2,220 a	1,878 a	2,562 ab
F-AM4	1,025 a	5,465 a	0,512 b	1,025 a	1,537 ab	1,708 a	2,903 a
F-AM10	1,025 a	5,465 a	0,512 b	1,025 a	1,708 ab	2,049 a	3,245 a
Controle	0,512 b	0,512 b	0,512 b	0,512 b	0,512 b	0,512 b	0,512 c

Em cada coluna, para cada fonte de P, médias do tratamento com a mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % na coluna.

Tabela 2. Coeficiente de correlação (r) entre o P solúvel e as variáveis pH e Acidez titulável

Fonte de P	Coeficiente correlação (r)	
	P solúvel vs pH	P solúvel vs Acidez titulável
AlPO ₄	-0,705	0,595
Ca ₃ PO ₄	-0,975	0,978
FePO ₄	-0,096	0,820
Araxá	-0,866	0,197
Patos	-0,787	0,405
Catalão	-0,962	0,923
Aipe	-0,973	0,916

3.4.5 Dessorção de P *in vitro* com e sem ácido málico

A presença do ácido málico no meio favoreceu a dessorção abiótica de P resultando em valores de P solúvel superiores aos observados para os tratamentos com inoculação fúngica (Figura 4a). Os isolados F-AM1 e F-AM2 conseguiram dessorver P na ausência de ácido málico (Figura 4a). A inoculação fúngica resultou em diminuição do pH do meio NBRIP (Figura 4b). Para os tratamentos onde os meios que foram suplementados com ácido málico, foram observados os maiores valores de acidez titulável (Figura 4c).

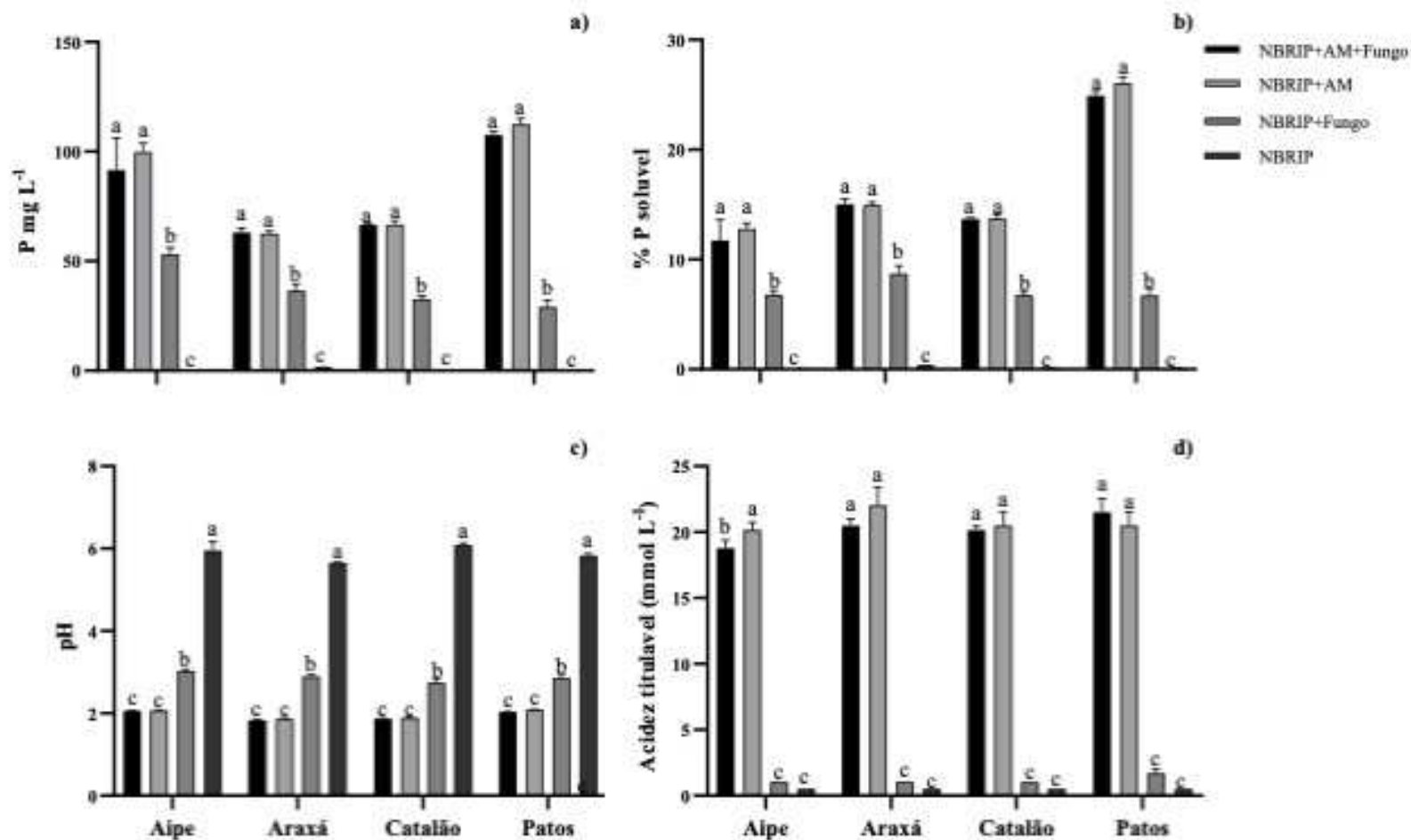


Figura 2. P solúvel (a), percentagem de fósforo solubilizado (b), pH (c) e acidez titulável (d) promovidos pelo isolado F-AM2 em meio NBRIP suplementado com os fosfatos de rocha Aipe, Araxá, Catalão e Patos, na presença ou ausência de ácido málico (AM), após sete dias de crescimento a 28 ° C e 150 rpm. Um controle sem inoculação foi também incluído. Barras com mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

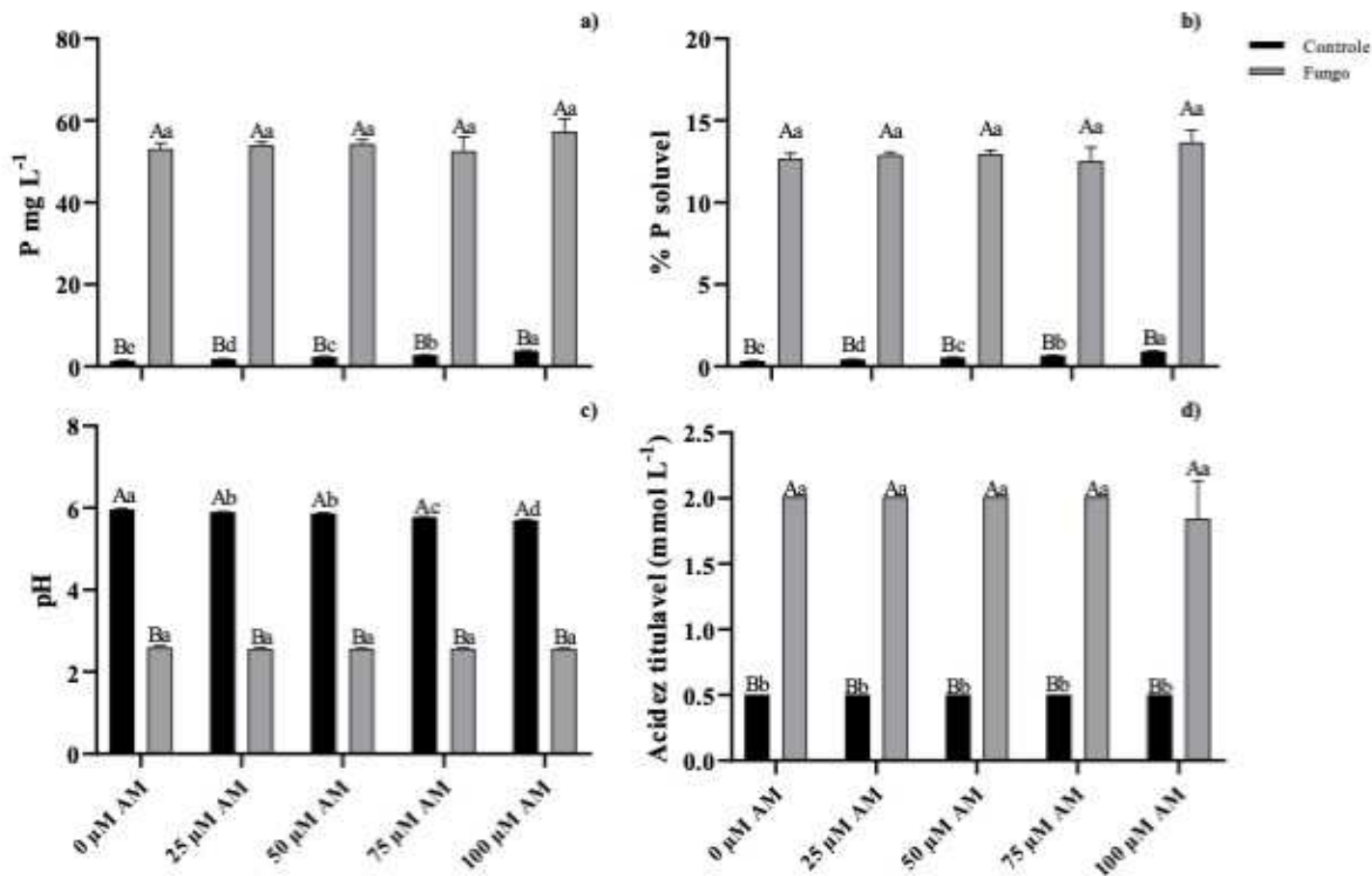


Figura 3. Fósforo solúvel (a), percentagem de solubilização (b), pH (c) e acidez titulável (d) após incubação do isolado fúngico F-AM2 em meio NBRIP suplementado com 0, 25, 50, 75 e 100 µM de ácido málico (AM) e com fosfato de rocha Araxá após sete dias de crescimento a 28 °C e 150 rpm. Um controle sem inoculação foi também incluído. Barras com a mesma letra maiúscula, para a mesma concentração de AM, ou com a mesma letra minúscula, dentro do tratamento com o sem inoculação, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

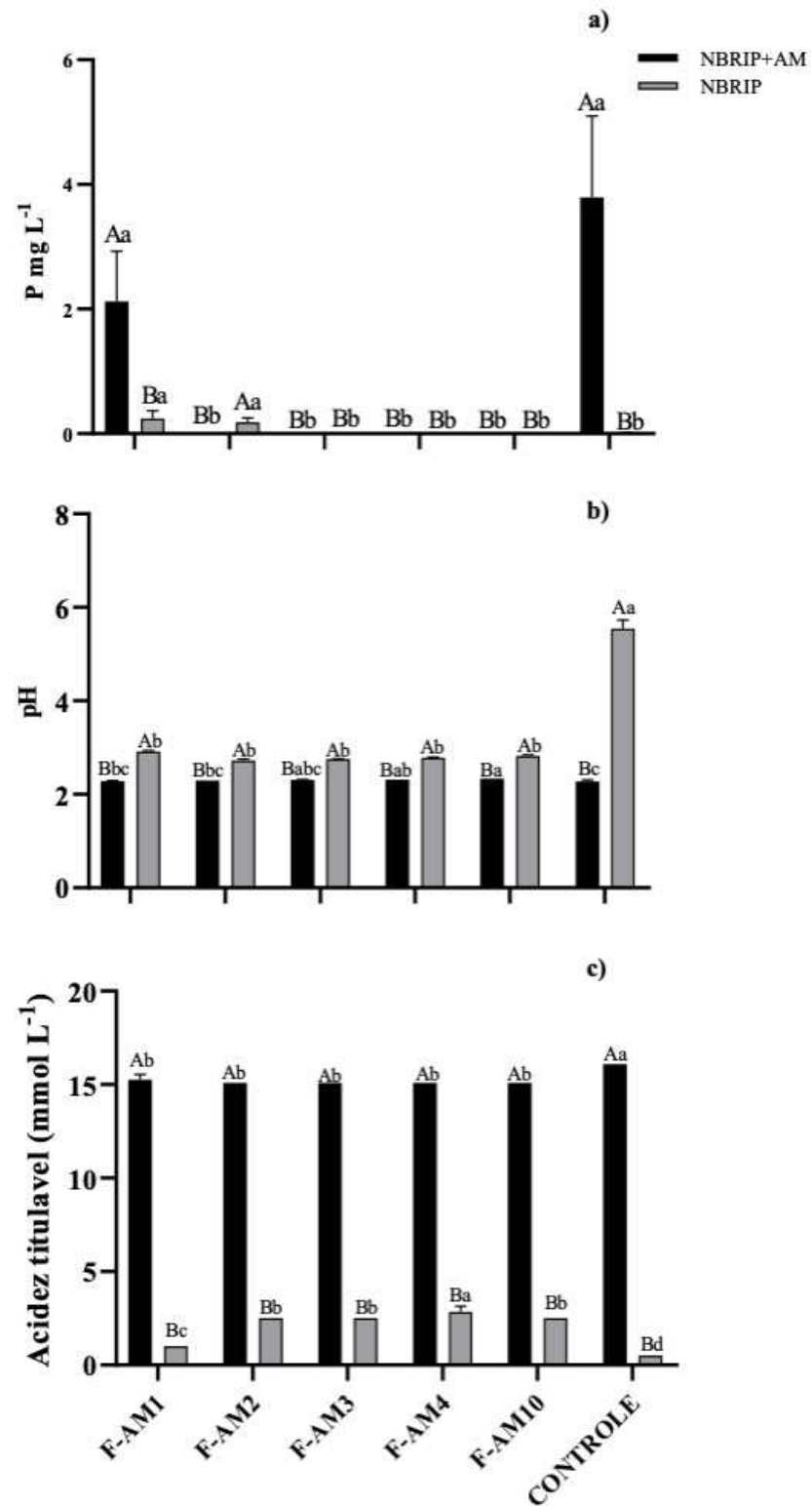


Figura 4. Fósforo desorvido (a), pH (b) e acidez titulável (c) promovidos pelos isolados após sete dias de crescimento a 28 °C e 150 rpm em meio NBRIP suplementado com ou sem ácido málico (AM) sobre o solo com 100 % CMAP. Um controle sem inoculação foi também incluído. Barras com a mesma letra maiúscula, dentro de cada isolado ou com a mesma letra minúscula, dentro de cada meio, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

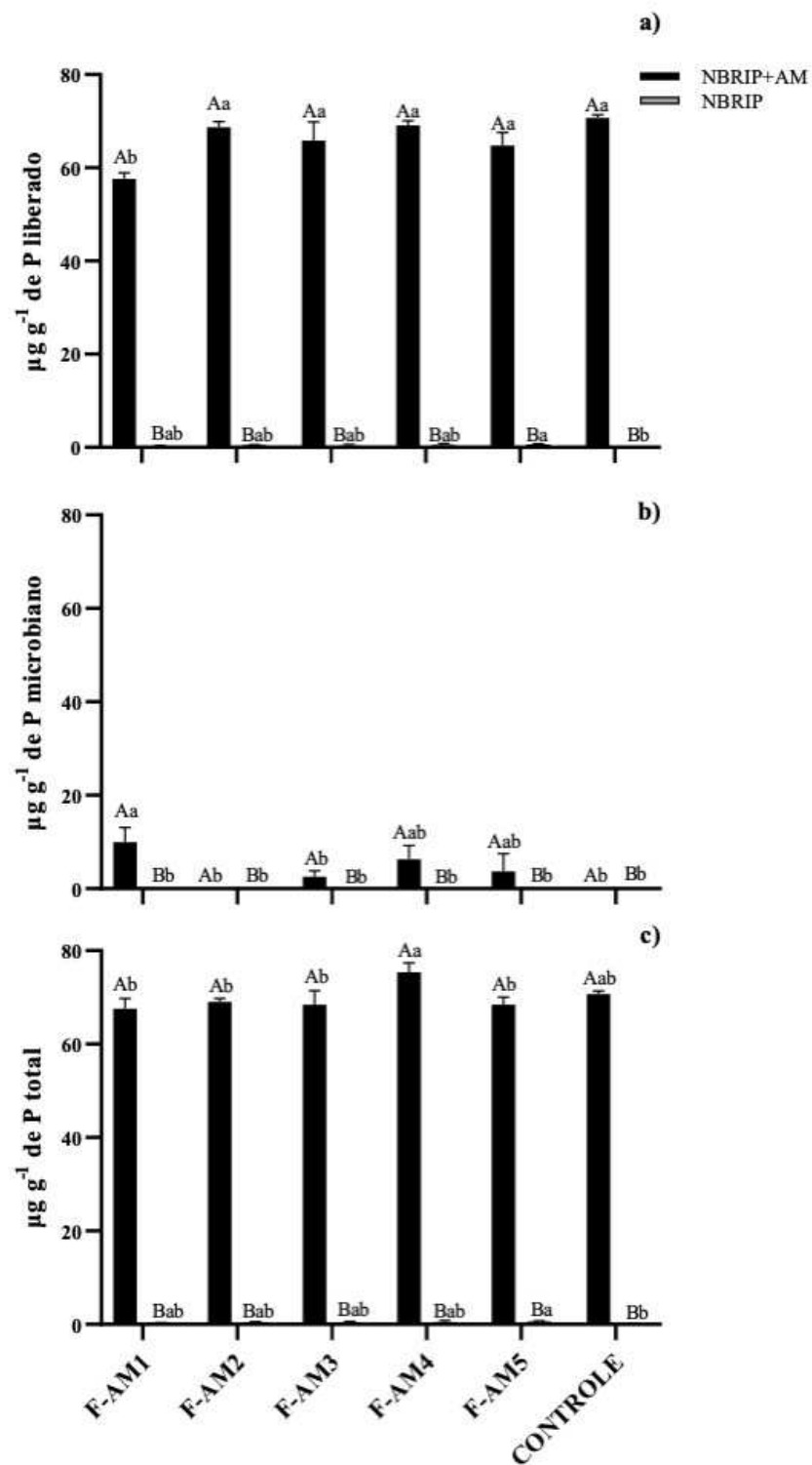


Figura 5. Fósforo liberado (a), fósforo microbiano (b) e fósforo total (c) medidos no sobrenadante do meio NBRIP modificado, com e sem ácido málico, após incubação de amostra de solo estéril inoculada com os isolados, por 15 dias a 25 °C. Um controle sem inoculação foi também incluído. Barras com a mesma letra maiúscula, dentro de cada isolado ou com a mesma letra minúscula, dentro de cada meio, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.4.6 Potencial de liberação de P do solo pelos isolados com e sem ácido málico

A suplementação do meio de cultura com ácido málico como única fonte de carbono resultou em distintos valores das variáveis P liberado, P microbiano, P total e pH (Figuras 5 e 6).

O meio com ácido málico, sem inoculação, apresentou maiores valores de P liberado, seguido dos meios com ácido málico e inoculados com os isolados fúngicos (Figura 5). Os meios sem ácido málico, inoculados ou não, apresentaram os menores valores de P liberado (Figura 5a).

Os meios com ácido málico e inoculados com os isolados fúngicos corresponderam aos tratamentos onde foram obtidos os maiores valores de P da biomassa microbiana, exceto para o isolado F-AM2 (Figura 5b). Para os demais tratamentos, os valores de P da biomassa microbiana estiveram abaixo do limite de detecção (Figura 5b).

A suplementação com ácido málico promoveu os maiores valores de P total quando comparados com aqueles obtidos em meios sem ácido málico, independente da inoculação fúngica (Figura 5c). Já para o pH, o ácido málico promoveu valores para essa variável mais baixos do que aqueles observados para os meios sem suplementação com esse composto (Figura 6).

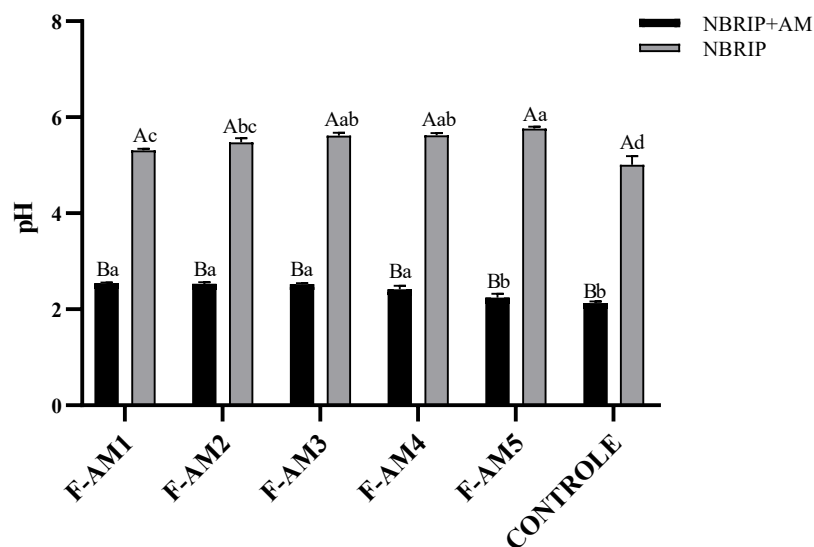


Figura 6. pH medido no sobrenadante do meio NBRIP modificado, suplementado com e sem ácido málico, após incubação de amostra de solo estéril inoculada com os isolados, por 15 dias a 25 °C. Um controle sem inoculação foi também incluído. Barras com a mesma letra maiúscula, para o mesmo isolado sobre o NBRIP ou NBRIP+AM, ou com a mesma letra minúscula, dentro dos isolados, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.5 DISCUSSÃO

Adição do ácido málico no meio levou à queda do pH 2,58 (dados não apresentados), podendo ter influenciado o aumento das populações de FSF (Figura 1). A abundância de bactérias associadas às raízes de *Lupinus albus* foi diminuída em função da elevada excreção de ácidos orgânicos e da concomitante diminuição drástica do pH (Weisskopf *et al.*, 2006). De fato, em ensaios preliminares (dados não apresentados), não foram detetadas colônias bacterianas nos solos tratados com ácido málico, o que pode sugerir o efeito do pH restrito ao desenvolvimento de fungos. Já a adição de ácido málico em meios sintéticos tem sido relatada como favorável ao crescimento fúngico, com aumentos significativos da massa seca micelial (Gupta & Maheshwari 1985), do diâmetro das colônias e da germinação de conídios (Zhang *et al.*, 2014).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que fungos isolados de solo tratado com ácido málico tem a capacidade de solubilizar P a partir de fontes inorgânicas e de FN (Tabela 1). Quanto às fontes inorgânicas de P, houve maiores valores de P solubilizado a partir de Ca_3PO_4 como única fonte de P, seguido do AlPO_4 e do FePO_4 . Essa tendência de solubilização já foi amplamente relatada (Hii *et al.*, 2020; Adhikari & Pandey 2019; Marra *et al.*, 2019; Gadagi *et al.*, 2007; Seshadri *et al.*, 2004) e vários fatores estão envolvidos, a exemplo da própria natureza da fonte de P e da constante de solubilidade (pKs). Por exemplo, considerando que FePO_4 apresenta pKs mais alto, a solubilização desse material deveria ser mais facilitada do que a de Ca_3PO_4 (Jiang *et al.*, 2020). Por outro lado, os mecanismos envolvidos na solubilização de P podem variar de um microrganismo para outro, como também o tipo de mecanismo utilizado para o tipo de fonte de P; dentre os mecanismos relatados encontra-se a capacidade de redução do pH do meio, o perfil de ácidos orgânicos liberados, a produção de sideróforos, dentre outros (Wang *et al.*, 2020; Gowami *et al.*, 2019; Marra *et al.*, 2019; Jain *et al.*, 2017).

Os valores de P solubilizado variaram a depender do FN testado (Tabela 1). Isto também pode estar relacionado aos mecanismos de solubilização envolvidos para cada FN, a exemplo do abaixamento do pH, o perfil de ácidos orgânicos liberados, dentre outros (Mendes *et al.*, 2015). Adicionalmente, outro fator que poderia influenciar as mudanças dos valores de P solubilizado é o local de origem de cada FN. Sabe-se que as fontes diferem em suas características químicas e mineralógicas, dependendo do local onde são coletados. Dentre as características químicas, podemos incluir as quantidades significativas de outros elementos químicos que podem inibir o processo de solubilização microbiana (Mendes *et al.*, 2013). Essas

diferenças na composição química de cada FN, podem influenciar na quantidade de P solubilizado (Silva et al., 2014). Por exemplo, relatou-se que durante o processo de solubilização, os microrganismos ficam expostos a vários elementos químicos liberados do FN, entre eles, o fluoreto (F^-) (Mendes *et al.*, 2014b). A presença desse ânion causa diminuição da solubilização de P (Mendes *et al.*, 2014b). No ambiente complexo do solo, outros fatores ainda desconhecidos poderiam operar influenciando o processo de solubilização microbiana de fosfatos.

Para todas as fontes de P avaliadas houve correlação negativa entre o P solúvel e o pH positiva para o P solúvel e a acidez titulável (Tabela 2). A diminuição do pH está relacionada à produção de ácidos orgânicos pelos microrganismos, avaliada indiretamente pela acidez titulável, (Doilom *et al.*, 2020). A produção de ácidos orgânicos favorece a solubilização de FN seja pela diminuição do pH ou pela complexação dos cátions acompanhantes do P na matriz do mineral fosfatado, levado à liberação do ortofosfato no meio. Nossos resultados estão de acordo com os obtidos por Jain *et al.* (2017), com coeficiente de correlação negativo entre o P solúvel e pH, em experimentos com dois isolados fúngicos e Ca_3PO_4 como fonte de P. Da mesma forma, Maharana *et al.* (2021) obtiveram coeficiente de correlação negativo entre as mesmas variáveis, utilizando FN como fonte de P para fungos.

A presença de ácido málico no meio não melhorou a solubilização dos FN por parte do isolado F-AM2 (Figura 2a-b). Por outro lado, houve efeito direto do ácido málico sobre as fontes de P avaliadas. Nossos resultados demonstraram que a concentração do ácido málico determina o nível de solubilização abiótica dos FN. À concentração de ácido málico (83mM) mais alta testada, foram obtidos maiores valores de solubilização (Figura 2a-b). Da mesma forma, Mendes *et al.* (2020), utilizando concentrações de 100 e 250 mM de ácido málico, conseguiram solubilizar perto do 60 % do P total do FN Catalão e acima do 90 % do P total das fontes Araxá e Patos. Tem-se relatado que o ácido málico é produzido por microrganismos como mecanismo de solubilização de diferentes fosfatos (Adhikari *et al.*, 2021; Maharana *et al.*, 2021; Zuñiga *et al.*, 2020). Esse ácido é caracterizado por apresentar dois grupos carboxila (Yang *et al.*, 2021) que têm a capacidade de complexar o Ca e também doar prótons, mecanismos que são reconhecidos na solubilização de P presente nas apatitas (Schneider *et al.*, 2010). A capacidade de doar prótons no meio foi evidenciada na queda do pH do meio na concentração mais alta de ácido málico usada nos experimentos (Figura 2c).

A adição de diferentes concentrações de ácido málico próximas daquelas encontradas na rizosfera (Zhang *et al.*, 2014) não favoreceu a solubilização do FN por parte do isolado F-AM2

(Figura 3a-b). Comumente, a capacidade de solubilização de P *in-vitro* é avaliada em meios seletivos tais como NBRIP, Pikovskaya ou SMRS-1, onde a fonte principal de carbono é a glicose (Bonilla *et al.*, 2021; Patel *et al.*, 2021; El-Maraghy *et al.*, 2020; Suebrasri *et al.*, 2020; Xiao *et al.*, 2020). Em nosso experimento, foi utilizado o meio NBRIP, que contém 10 g L⁻¹ de glicose como fonte de carbono (Nautiyal 1999). A glicose, por ser açúcar assimilado facilmente por microrganismos gera fluxo espontâneo de elétrons, trazendo algumas vantagens metabólicas quando comparada com o ácido málico. Esse composto, ao ser assimilado, envolve rotas metabólicas contrárias ao fluxo espontâneo de elétrons. Assim, quando há a disponibilidade de glicose e ácido málico no meio, a célula terá preferência pela utilização da glicose (Zou *et al.*, 2019; Wei *et al.*, 2017). A glicose é fonte de carbono utilizada nos meios de solubilização de fosfato, favorecendo a produção dos diferentes ácidos orgânicos envolvidos na solubilização de P (Rokem 2020; Yoshioka *et al.*, 2020).

A avaliação da capacidade de solubilização de fosfato da microbiota do solo em meios de laboratório ainda deve ser ajustada para maior aproximação das condições reais da rizosfera. A rizosfera é ambiente complexo do ponto de vista químico, sendo estritamente regulada pelas rizodeposições realizadas pela planta hospedeira (Ham *et al.*, 2018; Miransari 2010). A avaliação de solubilização *in vitro* pode, por outro lado, apontar isolados fúngicos altamente eficientes, a exemplo de *Aspergillus niger* FS1 (Mendes *et al.*, 2013,2014; Nascimento *et al.*, 2021). Esse fungo pode ser favorecido pelas condições nutricionais presentes no meio de cultura, no entanto, o seu papel na liberação de P em ambiente estritamente rizosférico é pouco conhecido. Sob condições de estresse nutricional de P, as plantas liberam ácidos orgânicos e dentre eles, é comumente relatado a presença de ácido málico (Arellano *et al.*, 2021; Tang *et al.*, 2021; Rolfé *et al.*, 2019; Tang *et al.*, 2019). Nesse sentido, sugerimos que a liberação de ácido málico no meio pode recrutar microrganismos com capacidade de solubilização mediana, mas que podem se adaptar mais facilmente na rizosfera, contribuindo na disponibilização de P para as plantas. A nutrição fosfatada dependeria de populações menos eficientes em liberar P, mas mais numerosas, por serem mais tolerantes às condições de competição do ambiente influenciado pelas raízes das plantas hospedeiras. Essa hipótese ainda deve ser testada.

Nossos resultados mostraram que o ácido málico consegue dessorver P do solo. No entanto, nos tratamentos de inoculação fúngica e na presença desse composto, não foi detectado P solúvel (Figura 4a). Sugere-se que, nessas condições, a quantidade de P dessorvido pelo ácido málico foi inferior à demanda da microbiota do solo, levando à imediata imobilização do nutriente. Na ausência de ácido málico, os isolados F-AM1 e F-AM2 conseguiram dessorver P

em baixas quantidades. Nascimento *et al.* (2021) relataram a capacidade de *Aspergillus niger* de dessorver P do solo por meio da produção de ácidos orgânicos, a exemplo do ácido oxálico cítrico e glucônico. No presente trabalho, observou-se diminuição do pH e aumento na acidez titulável, seja pela presença do ácido málico ou pelo próprio metabolismo dos isolados (Figura 4b-c). Sugere-se que a produção ou adição de ácidos orgânicos seja o mecanismo responsável pela dessorção de P. Recentemente, tem-se procurado “ativadores de P”, que são ferramentas que permitam aproveitar o legado de P do solo, a exemplo das formas insolúveis e do P fixado (Zhu *et al.*, 2018). Sugerimos que o ácido málico pode ser utilizado como “ativador de P” por sua capacidade de solubilizar FN e também dessorver P do solo. Além desses mecanismos, o papel do ácido málico na indução de fosfatases deve ser ainda investigado, considerando-se que o P orgânico é a forma predominante do nutriente no solo.

A adição de ácido málico em meio adicionado de solo e inoculado com isolados fúngicos foi mais efetiva em disponibilizar P, favorecendo o P da biomassa microbiana dos isolados e contribuindo para aumentar o P total quando comparado com o controle sem adição de ácido málico (Figura 5a-c). Novamente, destacamos o potencial do ácido málico em disponibilizar P do solo que pode ser aproveitado pela microbiota. Até o momento, não é claro qual é o efeito do ácido málico em nossos isolados. Sugerimos dois possíveis impactos sobre a microbiota: 1) impacto direto como fonte de carbono; 2) impacto indireto, por agir quimicamente na liberação de P e, ou outros elementos no solo. Primeiramente, pelo fato de ser fonte de carbono, tem-se relatado que o ácido málico pode ser assimilado pela microbiota rizosférica, uma vez que o composto faz parte das rizodeposições liberadas pelas plantas (Wang *et al.*, 2020; Pineda *et al.*, 2017). Não foi possível, neste trabalho, determinar o P da biomassa microbiana nos tratamentos sem adição de fonte de carbono (Figura 5b), fato que pode sugerir que a microbiota usa o ácido málico como fonte de carbono. Por outro lado, o ácido málico pode ter efeitos puramente químicos no solo, ao disponibilizar P e, ou outros elementos que podem ser assimilados pelos microrganismos, aumentando a biomassa microbiana e o conteúdo de nutrientes que a compõe. O ácido málico poderia contribuir na disponibilização de outros elementos além do P e, inclusive, fatores de crescimento orgânicos ou inorgânicos que estejam no solo, favorecendo a produção de biomassa microbiana (Dinh *et al.*, 2017). Essa hipótese ainda deve ser testada. Finalmente, o ácido málico ao mudar o pH do solo (Figura 6) cria condições favoráveis para o desenvolvimento dos isolados, pois sabe-se que fungos tem a capacidade de crescer em ambientes ácidos (Flores *et al.*, 2017).

3.6 CONCLUSÕES

O ácido málico favoreceu o aumento de populações de fungos solubilizadores de fosfato no solo. Sugere-se dois efeitos principais do ácido málico sobre a microbiota do solo: efeito direto como fonte de carbono e efeito indireto, agindo na liberação de P e, ou outros nutrientes ou fatores de crescimento microbianos. O ácido málico tem a capacidade de disponibilizar P adsorvido ao solo, apresentando potencial para o desenvolvimento de tecnologia que melhorem a eficiência de uso de fertilizantes fosfatados, bem como permitam acessar o legado de P do solo.

3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adhikari, P., Jain, R., Sharma, A., & Pandey, A. (2021). Plant growth promotion at low temperature by phosphate-solubilizing *Pseudomonas* spp. isolated from high-altitude Himalayan soil. *Microbial Ecology*, 1-11.
- Adhikari, P., & Pandey, A. (2019). Phosphate solubilization potential of endophytic fungi isolated from *Taxus wallichiana* Zucc. roots. *Rhizosphere*, 9, 2-9.
- Isidra-Arellano, M. C., Delaux, P. M., & Valdés-López, O. (2021). The phosphate starvation response system: its role in the regulation of plant–microbe interactions. *Plant and Cell Physiology*, 62(3), 392-400.
- Bakri, M. M. (2019). Tri-calcium and zinc phosphates solubilization by *Aspergillus niger* and its relation to organic acids production. *BioNanoScience*, 9(2), 238-244.
- Barrera G, Costa M (2020). Potencial de liberação de fosfato pela microbiota do solo suprida com diferentes fontes de carbono.
- Bechtaoui, N., Raklami, A., Benidire, L., Tahiri, A. I., Göttfert, M., & Oufdou, K. (2020). Effects of PGPR co-inoculation on growth, phosphorus nutrition and phosphatase/phytase activities of faba bean under different phosphorus availability conditions. *Polish Journal of Environmental Studies*, 29(2), 1557-1565.
- Behera, B. C., Yadav, H., Singh, S. K., Mishra, R. R., Sethi, B. K., Dutta, S. K., & Thatoi, H. N. (2017). Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi River delta, Odisha, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 169-178.
- Bhattacharjee, A., Thompson, A. M., Schwarz, K. C., Burnet, M. C., Kim, Y. M., Nunez, J. R., & Anderton, C. R. (2020). Soil microbial EPS resiliency is influenced by carbon source accessibility. *Soil Biology and Biochemistry*, 151, 108037.
- Bonilla, G. A., Durrer, A., & Cardoso, E. J. (2021). Use of compost and phosphate-solubilizing bacteria affect sugarcane mineral nutrition, phosphorus availability, and the soil bacterial community. *Applied Soil Ecology*, 157, 103760.
- Braga, J. M., & Defelipo, B. V. (1974). Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solos e plantas. *Revista Ceres*, 21(113), 73-85
- Chen, X., Wu, J., Song, W., Zhang, L., Wang, H., & Liu, L. (2015). Fumaric acid production by *Torulopsis glabrata*: engineering the urea cycle and the purine nucleotide cycle. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(1), 156-167.
- Chowdhury, S., Farrell, M., & Bolan, N. (2014). Priming of soil organic carbon by malic acid addition is differentially affected by nutrient availability. *Soil Biology and Biochemistry*, 77, 158-169.
- Debnath, A., Das, A. C., & Mukherjee, D. (1994). Studies on the decomposition of non-conventional organic wastes in soil. *Microbiological Research*, 149(2), 195-201.

- Dinh, Q. T., Li, Z., Tran, T. A. T., Wang, D., & Liang, D. (2017). Role of organic acids on the bioavailability of selenium in soil: A review. *Chemosphere*, *184*, 618-635.
- Doilom, M., Guo, J. W., Phookamsak, R., Mortimer, P. E., Karunarathna, S. C., Dong, W., & Xu, J. C. (2020). Screening of phosphate-solubilizing fungi from air and soil in Yunnan, China: four novel species in *Aspergillus*, *Gongronella*, *Penicillium* and *Talaromyces*. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 2443.
- El-Maraghy, S. S., Tohamy, T. A., & Hussein, K. A. (2020). Role of plant-growth promoting fungi (PGPF) in defensive genes expression of *Triticum aestivum* against wilt disease. *Rhizosphere*, *15*, 100223.
- Flores, R., Esparza-Reynoso, S., Garnica-Vergara, A., López-Bucio, J., & Herrera-Estrella, A. (2017). *Trichoderma*-induced acidification is an early trigger for changes in *Arabidopsis* root growth and determines fungal phytostimulation. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 822.
- Gadagi, R. S., Shin, W. S., & Sa, T. M. (2007). Malic acid mediated aluminum phosphate solubilization by *Penicillium oxalicum* CBPS-3F-Tsa isolated from Korean paddy rhizosphere soil. *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*, *102*, 285-290.
- George, T. S., Hinsinger, P., & Turner, B. L. (2016). Phosphorus in soils and plants—facing phosphorus scarcity. *Plant and Soil*, *401*, 1-6.
- Ghany, T. M., Mohamed, Z. H., Al Abboud, M. A., Helmy, E. A., Al-Rajhi, A. M., & Shater, A. R. M. (2019). Solubilization of inorganic phosphate by rhizospheric fungi isolated from soil cultivated with *Sorghum bicolor* L. *BioResources*, *14*(3), 5521-5532.
- Gowami, S. P., Maurya, B. R., & Dubey, A. N. (2019). Role of phosphorus solubilizing microorganisms and dissolution of insoluble phosphorus in soil. *International Journal of Chemical Studies*, *7*, 3905-3913.
- Gupta, S. D., & Maheshwari, R. (1985). Is organic acid required for nutrition of thermophilic fungi?. *Archives of Microbiology*, *141*(2), 164-169.
- Ham, B. K., Chen, J., Yan, Y., & Lucas, W. J. (2018). Insights into plant phosphate sensing and signaling. *Current Opinion in Biotechnology*, *49*, 1-9.
- Hamim, A., Boukeskase, A., Ouhdouch, Y., Farrouki, A., Barrijal, S., Miché, L., & Hafidi, M. (2019). Phosphate solubilizing and PGR activities of ericaceous shrubs microorganisms isolated from Mediterranean forest soil. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *19*, 101128.
- Hedley, M. J., & Stewart, J. W. B. (1982). Method to measure microbial phosphate in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, *14*(4), 377-385.
- Hii, Y. S., San, C. Y., Lau, S. W., & Danquah, M. K. (2020). Isolation and characterization of phosphate solubilizing microorganisms from peat. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *26*, 101643.

- Islam, M. K., Sano, A., Majumder, M. S. I., Hossain, M. A., & Sakagami, J. I. (2019). Isolation and molecular characterization of phosphate solubilizing filamentous fungi from subtropical soils in Okinawa. *Applied Ecology and Environmental Research*, 17, 9145-9157.
- Jain, R., Saxena, J., & Sharma, V. (2017). The ability of two fungi to dissolve hardly soluble phosphates in solution. *Mycology*, 8(2), 104-110.
- Jiang, Y., Tian, J., & Ge, F. (2020). New insight into carboxylic acid metabolisms and pH regulations during insoluble phosphate solubilization process by *Penicillium oxalicum* PSF-4. *Current Microbiology*, 77(12), 4095-4103.
- Kotoky, R., Rajkumari, J., & Pandey, P. (2018). The rhizosphere microbiome: Significance in rhizoremediation of polyaromatic hydrocarbon contaminated soil. *Journal of Environmental Management*, 217, 858-870.
- Li, X., Quan, X., Mang, M., Neumann, G., Melchinger, A., & Ludewig, U. (2021). Flint maize root mycorrhization and organic acid exudates under phosphorus deficiency: Trends in breeding lines and doubled haploid lines from landraces. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 184, 346-359.
- Li, Z., Bai, T., Dai, L., Wang, F., Tao, J., Meng, S., & Hu, S. (2016). A study of organic acid production in contrasts between two phosphate solubilizing fungi: *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger*. *Scientific Reports*, 6(1), 1-8.
- Liu, W., Zhao, Q., Zhang, Z., Li, Y., Xu, N., Qu, Q., & Qian, H. (2020). Enantioselective effects of imazethapyr on *Arabidopsis thaliana* root exudates and rhizosphere microbes. *Science of the Total Environment*, 716, 137121.
- Maharana, R., Das, S., Dhal, N. K., Dinda, S., & Singh, B. M. (2021). Characterization and mechanisms of biosolubilization of rock phosphate by microbes isolated from Mahanadi Estuary, Odisha, India. *International Journal of Environmental Research*, 15(2), 335-348.
- Malhotra, H., Sharma, S., & Pandey, R. (2018). Phosphorus nutrition: plant growth in response to deficiency and excess. *Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance*, 10, 171-190.
- Marra, L. M., de Oliveira-Longatti, S. M., Soares, C. R. F. S., Olivares, F. L., & Moreira, F. M. D. S. (2019). The amount of phosphate solubilization depends on the strain, C-source, organic acids and type of phosphate. *Geomicrobiology Journal*, 36(3), 232-242.
- Meena, S. K., Pandey, R., Sharma, S., Kumar, T., Singh, M. P., & Dikshit, H. K. (2021). Physiological basis of combined stress tolerance to low phosphorus and drought in a diverse set of mungbean germplasm. *Agronomy*, 11(1), 99.
- Mendes, G., de Freitas, A. L. M., Pereira, O. L., da Silva, I. R., Vassilev, N. B., & Costa, M. D. (2014a). Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Annals of Microbiology*, 64(1), 239-249.
- Mendes, G., Murta, H. M., Valadares, R. V., da Silveira, W. B., da Silva, I. R., & Costa, M. D. (2020). Oxalic acid is more efficient than sulfuric acid for rock phosphate solubilization. *Minerals Engineering*, 155, 106458.

- Mendes, G. D. O., da Silva, N. M. R. M., Anastácio, T. C., Vassilev, N. B., Ribeiro Jr, J. I., da Silva, I. R., & Costa, M. D. (2015). Optimization of *Aspergillus niger* rock phosphate solubilization in solid-state fermentation and use of the resulting product as a P fertilizer. *Microbial Biotechnology*, 8(6), 930-939.
- Mendes, G. D. O., Vassilev, N. B., Bonduki, V. H. A., da Silva, I. R., Ribeiro Jr, J. I., & Costa, M. D. (2013). Inhibition of *Aspergillus niger* phosphate solubilization by fluoride released from rock phosphate. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(16), 4906-4913.
- Mendes, G. D. O., Zafra, D. L., Vassilev, N. B., Silva, I. R., Ribeiro Jr, J. I., & Costa, M. D. (2014b). Biochar enhances *Aspergillus niger* rock phosphate solubilization by increasing organic acid production and alleviating fluoride toxicity. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(10), 3081-3085.
- Miransari, M. (2010). Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to plant growth under different types of soil stress. *Plant Biology*, 12(4), 563-569.
- Mondala, A. H. (2015). Direct fungal fermentation of lignocellulosic biomass into itaconic, fumaric, and malic acids: current and future prospects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42(4), 487-506.
- Nascimento, J. M., Netto, J. A. F. V., Valadares, R. V., de Oliveira Mendes, G., da Silva, I. R., Vergütz, L., & Costa, M. D. (2021). *Aspergillus niger* as a key to unlock fixed phosphorus in highly weathered soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 156, 108190.
- Nasr, S. H., Mousa, A. M., Marzouk, M. A., & Yasser, M. M. (2021). Quantitative and qualitative analysis of organic acids produced by phosphate solubilizing fungi. *Egyptian Journal of Botany*, 61(1), 167-176.
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 265-270.
- Pantigoso, H. A., Yuan, J., He, Y., Guo, Q., Vollmer, C., & Vivanco, J. M. (2020). Role of root exudates on assimilation of phosphorus in young and old *Arabidopsis thaliana* plants. *PloS One*, 15(6), e0234216.
- Parastesh, F., Alikhani, H. A., & Etesami, H. (2019). Vermicompost enriched with phosphate-solubilizing bacteria provides plant with enough phosphorus in a sequential cropping under calcareous soil conditions. *Journal of Cleaner Production*, 221, 27-37.
- Patel, D., Patel, A., Patel, M., & Goswami, D. (2021). *Talaromyces pinophilus* strain M13: a portrayal of novel groundbreaking fungal strain for phytointensification. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(7), 8758-8769.
- Pineda, A., Kaplan, I., & Bezemer, T. M. (2017). Steering soil microbiomes to suppress aboveground insect pests. *Trends in Plant Science*, 22(9), 770-778.

- Rasul, M., Yasmin, S., Zubair, M., Mahreen, N., Yousaf, S., Arif, M., & Mirza, M. S. (2019). Phosphate solubilizers as antagonists for bacterial leaf blight with improved rice growth in phosphorus deficit soil. *Biological Control*, *136*, 103997.
- Rokem, J. S. (2020). TCA cycle organic acids produced by filamentous fungi: the building blocks of the future. *Grand Challenges in Fungal Biotechnology*, *13*, 439-476.
- Rolfe, S. A., Griffiths, J., & Ton, J. (2019). Crying out for help with root exudates: adaptive mechanisms by which stressed plants assemble health-promoting soil microbiomes. *Current Opinion in Microbiology*, *49*, 73-82.
- Roy, E. D., Richards, P. D., Martinelli, L. A., Della Coletta, L., Lins, S. R. M., Vazquez, F. F., & Porder, S. (2016). The phosphorus cost of agricultural intensification in the tropics. *Nature Plants*, *2*(5), 1-6.
- Ryan, D. G., & O'Neill, L. A. (2020). Krebs cycle reborn in macrophage immunometabolism. *Annual Review of Immunology*, *38*, 289-313.
- Sarkar, O., Chatterjee, S., & Mohan, S. V. (2019). Acidogenic outlet from biohydrogen reactor as phosphate solubilizing agent for integrated organic farming. *Journal of Cleaner Production*, *208*, 490-498.
- Seshadri, S., Ignacimuthu, S., & Lakshminarasimhan, C. (2004). Effect of nitrogen and carbon sources on the inorganic phosphate solubilization by different *Aspergillus niger* strains. *Chemical Engineering Communications*, *191*(8), 1043-1052.
- Silva, U., de Oliveira Mendes, G., Silva, N. M. R., Duarte, J. L., Silva, I. R., Tótola, M. R., & Costa, M. D. (2014). Fluoride-tolerant mutants of *Aspergillus niger* show enhanced phosphate solubilization capacity. *PloS One*, *9*(10), e110246.
- Singh, D., Raina, T. K., Kumar, A., Singh, J., & Prasad, R. (2019). Plant microbiome: a reservoir of novel genes and metabolites. *Plant Gene*, *18*, 100177.
- Steiger, M. G., Punt, P. J., Ram, A. F., Mattanovich, D., & Sauer, M. (2016). Characterizing MttA as a mitochondrial cis-aconitic acid transporter by metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, *35*, 95-104.
- Suebrasri, T., Harada, H., Jogloy, S., Ekprasert, J., & Boonlue, S. (2020). Auxin-producing fungal endophytes promote growth of sunchoke. *Rhizosphere*, *16*, 100271.
- Tang, H., Chen, X., Gao, Y., Hong, L., & Chen, Y. (2020). Alteration in root morphological and physiological traits of two maize cultivars in response to phosphorus deficiency. *Rhizosphere*, *14*, 100201.
- Tang, H., Wang, Y., Niu, L., Jing, W., & Chen, Y. (2019). Enhanced adaptation to low-P stress by altering rhizosphere exudation and P-uptake rate other than root morphological traits in two maize genotypes. *Preprints*, *14*, 1-17.
- Torri, S. I., Correa, R. S., & Renella, G. (2017). Biosolid application to agricultural land—A contribution to global phosphorus recycle: A review. *Pedosphere*, *27*(1), 1-16.

- Touhami, D., McDowell, R. W., & Condrón, L. M. (2020). Role of organic anions and phosphatase enzymes in phosphorus acquisition in the rhizospheres of legumes and grasses grown in a low phosphorus pasture soil. *Plants*, 9(9), 1185.
- Trichez, D., Auriol, C., Baylac, A., Irague, R., Dressaire, C., Carnicer-Heras, M., & Walther, T. (2018). Engineering of *Escherichia coli* for Krebs cycle-dependent production of malic acid. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1-12.
- Vassilev, N., Vassileva, M., Martos, V., Galvez, A., Flor-Peregrin, E., & Garcia del Moral, L. F. (2019). Phosphate sources, microorganisms, and P plant nutrition: challenges and future trends. *Archives of Crop Science*, 3(1), 61-63.
- Wang, H. Y., Shen, L. I. U., Zhai, L. M., Zhang, J. Z., Ren, T. Z., Fan, B. Q., & LIU, H. B. (2015). Preparation and utilization of phosphate biofertilizers using agricultural waste. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(1), 158-167.
- Wang, J., Zhao, Y. G., & Maqbool, F. (2021). Capability of *Penicillium oxalicum* y2 to release phosphate from different insoluble phosphorus sources and soil. *Folia Microbiologica*, 66(1), 69-77.
- Wang, Y., & Lambers, H. (2020). Root-released organic anions in response to low phosphorus availability: recent progress, challenges and future perspectives. *Plant and Soil*, 447(1), 135-156.
- Wei, P., Cheng, C., Lin, M., Zhou, Y., & Yang, S. T. (2017). Production of poly (malic acid) from sugarcane juice in fermentation by *Aureobasidium pullulans*: kinetics and process economics. *Bioresource Technology*, 224, 581-589.
- Weisskopf, L., Mansour E, Fromin, N., Tomasi, N., Santelia, D., Edelkott, I., & Martinoia, E. (2006). White lupin has developed a complex strategy to limit microbial degradation of secreted citrate required for phosphate acquisition. *Plant, Cell and Environment*, 29(5), 919-927.
- Xiao, C., Zhou, Y., Hu, J., Guo, S., Zhou, N., & Chi, R. (2020). Biosolubilization of low-grade rock phosphate by native microbial consortia from phosphate mines: effect of sampling sources and culture media. *Geomicrobiology Journal*, 37(9), 859-866.
- Yang, X., Kong, Y., Guo, E., Chen, X., & Li, L. (2021). Organic acid regulation of inorganic phosphorus release from Mollisols with different organic matter contents. *Soil Use and Management*, 1-18.
- Yoshioka, I., Kobayashi, K., & Kirimura, K. (2020). Overexpression of the gene encoding alternative oxidase for enhanced glucose consumption in oxalic acid producing *Aspergillus niger* expressing oxaloacetate hydrolase gene. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 129(2), 172-176.
- Zhang, F., Meng, X., Yang, X., Ran, W., & Shen, Q. (2014). Quantification and role of organic acids in cucumber root exudates in *Trichoderma harzianum* T-E5 colonization. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 250-257.

Zhu, J., Li, M., & Whelan, M. (2018). Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. *Science of the Total Environment*, 612, 522-537.

Zineb, A., Trabelsi, D., Ayachi, I., Barhoumi, F., Aroca, R., & Mhamdi, R. (2020). Inoculation with elite strains of phosphate-solubilizing bacteria enhances the effectiveness of fertilization with rock phosphates. *Geomicrobiology Journal*, 37(1), 22-30.

Zou, X., Cheng, C., Feng, J., Song, X., Lin, M., & Yang, S. T. (2019). Biosynthesis of polymalic acid in fermentation: advances and prospects for industrial application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(3), 408-421.

Zúñiga-Silgado, D., Rivera-Leyva, J. C., Coleman, J. J., Sánchez-Reyez, A., Valencia-Díaz, S., Serrano, M., & Folch-Mallol, J. L. (2020). Soil type affects organic acid production and phosphorus solubilization efficiency mediated by several native fungal strains from Mexico. *Microorganisms*, 8(9), 1337.