

Solubilização de fosfatos *in vitro* por *Aspergillus brasiliensis* Varga, Frisvad & Samson na presença de fontes de carbono

Flavia Paiva Coutinho^{1,3}, Jennifer Figueiredo da Silva², Izabela Pinheiro de Santana²,
Wagner Pereira Felix² e Adriana Mayumi Yano-Melo²

Recebido: 2.10.2013; aceito: 20.01.2014

ABSTRACT - (*In vitro* solubilization of phosphates by *Aspergillus brasiliensis* Varga, Frisvad & Samson in the presence of carbon sources). Phosphate-solubilizing fungi play an important role in the availability of phosphorus for plants, as they are capable of reverting insoluble phosphates into soluble forms. However, the solubilization of phosphates may be influenced by the growth of the fungus, which depends on the availability of carbon. The aim of this study was to evaluate the capacity and potential *in vitro* solubilization of phosphate sources by *Aspergillus brasiliensis* in the presence of conventional (starch, glucose, and sucrose) and alternative (co-products of winemaking) carbon sources, in the region of Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco State, Brazil. All carbon sources were assimilated by the specimens, although providing different responses. The co-products of winemaking stimulated fungal growth, providing greater solubilization of phosphates. It is concluded that the co-products of winemaking can be used in agriculture as a viable alternative and a less costly way to produce inoculum of solubilizing fungi and stimulate the growth of indigenous fungi in order to optimize the availability of non-renewable sources.

Keywords: filamentous fungi, grape bagasse, phosphorus

RESUMO - (Solubilização de fosfatos *in vitro* por *Aspergillus brasiliensis* Varga, Frisvad & Samson na presença de fontes de carbono). Os fungos solubilizadores de fosfatos desempenham importante papel na disponibilização de fósforo para as plantas, pois apresentam capacidade de reverter fosfatos insolúveis em formas solúveis. No entanto, a solubilização de fosfatos pode ser influenciada pelo crescimento do fungo, que depende da disponibilidade da fonte de carbono. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade e o potencial de solubilização de fontes de fosfato *in vitro* por *Aspergillus brasiliensis* na presença de fontes de carbono convencionais (amido, glicose e sacarose) e alternativas (coprodutos da vinificação), na região do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brasil. Todas as fontes de carbono foram assimiladas pelos espécimes, proporcionando diferentes respostas. Os coprodutos da vinificação estimularam mais o crescimento fúngico, proporcionando maior solubilização dos fosfatos. Conclui-se que os coprodutos da vinificação podem ser utilizados na agricultura como alternativa viável e de menor custo para produzir inóculo de fungos solubilizadores e estimular o crescimento de fungos autóctones, visando a otimização na disponibilização de fontes não renováveis.

Palavras-chave: bagaço de uva, fósforo, fungos filamentosos

Introdução

O fósforo (P) é um nutriente essencial às plantas, mas, em geral, encontra-se em baixa disponibilidade no solo, sendo necessárias altas dosagens de adubos fosfatados para a obtenção de alta produtividade (Barroso & Nahas 2008). As adubações são realizadas principalmente com fosfatos solúveis em água, atingindo dosagens de P muito superiores

às necessidades das culturas vegetais, pois a maior parte do P adicionado torna-se indisponível às plantas (Wakelin *et al.* 2004).

Por outro lado, fungos solubilizadores de fosfatos (FSP) desempenham importante papel no suprimento de P para as plantas, pois apresentam capacidade de reverter fosfatos insolúveis em formas solúveis (Xin *et al.* 2002, Son *et al.* 2006) através de estratégias bioquímicas, como a produção de ácidos

1. Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Micologia, Rua Nelson Chaves s/n, CEP 50670-420 Recife, PE, Brasil
2. Universidade Federal do Vale do São Francisco, *Campus* de Ciências Agrárias, Rodovia BR 407, Km 12 Lote 453, Projeto de Irrigação Nilo Coelho C1, CEP 56300-990 Petrolina, PE, Brasil
3. Autor para correspondência: flaviapaco@hotmail.com

orgânicos, que propiciam uma dissolução direta de fosfatos insolúveis ou a quelação de cátions da molécula (Vassilev *et al.* 2006). Estes fungos têm sido associados à produção de ácidos orgânicos e, em particular, espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* mostram habilidade para solubilizar diferentes fontes de fosfato (Bizukoje & Ledakowicz 2004, Vassilev *et al.* 2006, Chuang *et al.* 2007). Devido ao fato dessas espécies estarem bem distribuídas na maioria dos solos, a solubilização de P por meio dos fungos pode constituir em alternativa para reduzir os custos de produção e estabelecer a sustentabilidade do sistema agrícola.

Alguns pesquisadores (Ahuja *et al.* 2007, Scervino *et al.* 2011) têm estudado o efeito de fontes de carbono (C) na solubilização de P, uma vez que a produção de ácidos orgânicos está associada ao crescimento dos fungos, o qual por sua vez está sujeito à disponibilidade de C (Papagianni *et al.* 2005). Deste modo, o crescimento dos FSP pode ser incrementado pela incorporação de fontes de C, visando à produção de bioinoculantes em larga escala e com baixo custo. Os trabalhos indicam que os FSP representam uma opção eficiente para maximizar a utilização de fontes naturais não renováveis. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade e o potencial de solubilização de fontes de fosfato *in vitro* por espécimes de *Aspergillus brasiliensis* Varga, Frisvad & Samson na presença de fontes de carbono convencionais e alternativas.

Material e métodos

Cinco espécimes de fungos solubilizadores de fosfatos (FSP), *Aspergillus brasiliensis* Varga, Frisvad & Samson, foram isolados de solos rizosféricos de maniçoba (*Manihot glaziovii* Muell. Arg.), na região do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brasil (08°59'49"S e 40°16'19"W), utilizando a técnica de suspensão em série (1:1.000 v/v) do solo.

Estes FSP foram cultivados em erlenmeyers contendo 50 ml de meio de cultura GL (Sylvester-Bradley *et al.* 1982) líquido suplementado com 25 mg P₂O₅ 100 ml⁻¹ de fonte de fosfato (17% P₂O₅ - RP17; 18% P₂O₅ - RP18; 48% P₂O₅ - RP48) e pH do meio ajustado para 6,5. Um mililitro de suspensão de esporos de cada espécime de FSP, representando ca. 10⁷ esporos ml⁻¹, foi adicionado como inóculo. Os erlenmeyers foram agitados a 160 rpm a 32 °C por um período de sete dias. Para avaliar o efeito das fontes de carbono na melhoria da solubilização de

fosfato, a glicose do meio GL foi substituída por uma das seguintes fontes: amido, sacarose, bagaço de uva derivado da produção de vinho ou da produção de suco. Erlenmeyers com o mesmo meio de cultura, sem inoculação, correspondendo ao tratamento controle, foram mantidos.

As avaliações do fósforo solúvel na solução foram feitas após sete dias de inoculação, retirando-se 5 ml da cultura de cada erlenmeyer. As culturas foram centrifugadas a 10.000 × g por cinco minutos e o sobrenadante foi filtrado (Whatman N° 40). O fósforo solúvel na solução (filtrado) foi determinado por espectrofotometria (660 nm), segundo procedimento descrito por Tedesco *et al.* (1995). O pH do sobrenadante foi determinado por potenciômetro e o micélio de cada tratamento foi lavado com água destilada e seco a 70 °C por três dias ou até peso constante para estimativa da biomassa seca.

Para cada fonte de fosfato foi realizado um experimento em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial de seis tratamentos de inoculação (cinco espécimes e um controle) × cinco fontes de carbono (amido, glicose, sacarose, bagaço de uva derivado da produção de suco e da produção de vinho), em cinco repetições. As variáveis analisadas foram P solúvel, pH e biomassa seca.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade utilizando-se o programa Statistica 5.0 (Statsoft 1997).

Os dados de P solúvel foram utilizados no cálculo de incremento (Weber *et al.* 2004) proporcionado pelo FSP, utilizando a fórmula $100[(X-Y)/Y]$, em que X representa o tratamento inoculado com FSP e Y, o tratamento controle.

Resultados e Discussão

A maioria dos tratamentos com fungos solubilizadores de fosfatos (FSP) apresentou potencial de solubilização das fontes de fosfato, redução do pH do meio de cultura líquido e aumento da biomassa seca dos fungos (tabelas 1, 2 e 3). Contudo, a solubilização de fosfatos tem sido atribuída a inúmeros mecanismos, muitas vezes interdependentes, como o crescimento do fungo e a diminuição do pH (Ahuja *et al.* 2007).

Constatou-se que a solubilização das fontes de fosfato pelos FSP variou entre as fontes de carbono utilizadas. Os tratamentos com FSP na presença de fosfato RP48 e bagaço de uva derivado da produção de suco, de fosfato RP18 e bagaço de uva derivado da produção de vinho, e de fosfato RP17

e glicose, destacaram-se por apresentarem maiores valores de P solúvel no meio de cultura líquido e, conseqüentemente, maior incremento (tabelas 1, 2 e 3). Registros na literatura relatam aumento (67%, 44% e 79%) de fosfato solúvel a partir da inoculação com *Aspergillus niger* Tiegh. (= *A. brasiliensis*) e *Aspergillus sp.*, respectivamente, em meio de cultura líquido contendo glicose (Saber *et al.* 2009, Coutinho *et al.* 2012, Zeroual *et al.* 2012).

Ahuja *et al.* (2007), no entanto, ao avaliarem a capacidade de *Paecilomyces marquandii* (Masse) S. Hughes na presença de amido quanto à solubilização da fonte de fosfato constataram incremento de 195%; Scervino *et al.* (2011) observaram que a solubilização do fosfato por *Penicillium purpurogenum* Stoll foi otimizada com adição de glicose como fonte de carbono.

Diferenças na capacidade e no potencial de solubilização, contudo, podem ser atribuídas à eficiência dos espécimes de FSP. Alterações nas condições do meio, entretanto, como a mudança de fontes de carbono, podem modificar a eficiência do processo de solubilização de fosfatos.

Houve alta produção de biomassa seca dos fungos na presença de todas as fontes de fosfato e de carbono. As maiores produções de biomassa fúngica foram registradas na presença de bagaço de uva derivado da produção de suco e da produção de vinho (tabelas 1, 2 e 3), podendo estar associadas à maior solubilização de fosfato. Esses resultados demonstram que fontes de carbono provindas de coprodutos da vinificação mostram-se eficientes para o crescimento de FSP.

Diferenças comportamentais dos FSP quanto às fontes de carbono também têm sido relatadas na

Tabela 1. Valores médios de P solúvel, pH e biomassa seca (BS) em meio de cultura GL líquido suplementado com fonte de fosfato (48% P₂O₅), fontes de carbono (amido, glicose, sacarose, bagaço de uva derivado da produção de vinho ou da produção de suco) e inoculado com espécimes de fungos solubilizadores de fosfato (FSP), sete dias após inoculação, *Aspergillus brasiliensis* Varga, Frisvad & Samson, na região do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brasil. Médias (n = 5) seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,01$). I: incremento $\{100[(X-Y)/Y]\}$, X: tratamento inoculado com FSP e Y: tratamento controle; GLI: glicose; SCS: sacarose; BUS: bagaço de uva derivado da produção de suco; BUV: bagaço de uva derivado da produção de vinho; AMD: amido.

Table 1. Average values of soluble P, pH, and dry biomass (BS) in liquid GL culture medium supplemented with phosphate source (48% P₂O₅), carbon sources (starch, glucose, sucrose, grape bagasse derived from wine or juice production) and inoculated with specimens of phosphate-solubilizing fungi (FSP), seven days after inoculation, in the region of Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco State, Brazil. Means (n = 5) followed by the same letter, lower case in the column and capital letters in the line, did not differ significantly by Tukey test ($p < 0.01$). I: increment $\{100[(X-Y)/Y]\}$, X: treatment inoculated with FSP and Y: control treatment; GLI: glucose; SCS: sucrose; BUS: grape bagasse derived from juice production; BUV: grape bagasse derived from wine production; AMD: starch.

Espécimes	P solúvel ($\mu\text{g ml}^{-1}$)									
	GLI	I %	SCS	I %	BUS	I %	BUV	I %	AMD	I %
FSP81	474bA	262	661aA	383	606bcA	730	637aA	810	616abcA	670
FSP88	589abB	350	652aABC	376	748abAB	925	599aBC	756	765aA	856
FSP101	619abC	373	636aBC	364	791aA	984	636aBC	809	763abAB	854
FSP105	723aAB	452	746aA	445	685abcA- BC	839	585aC	736	605cBC	656
FSP109	721aA	451	629aA	359	576cA	689	569aA	713	609bcA	661
Controle	131cA	-	137bA	-	073dA	-	070bA	-	080dA	-

Espécimes	pH					BS (g 50 ml ⁻¹)				
	GLI	SCS	BUS	BUV	AMD	GLI	SCS	BUS	BUV	AMD
FSP81	3,76bA	4,59abA	4,97bA	5,41bA	4,89bA	0,162aB	0,199aA	0,201aA	0,191bcA	0,126bB
FSP88	3,70bB	3,00cC	3,84cB	5,80abA	3,88cB	0,159aB	0,198aA	0,218aA	0,170cB	0,282aA
FSP101	4,47abB	4,04abcB	5,97aA	6,52aA	6,13aA	0,151aB	0,155bB	0,258aA	0,448aA	0,329aA
FSP105	3,24bC	3,66bcC	5,27bB	6,04abA	5,11bB	0,145aB	0,117bB	0,195abA	0,251bA	0,298aA
FSP109	3,49bC	3,40bcC	5,09bB	6,48aA	4,65bcB	0,159aA	0,136bA	0,151bA	0,177cA	0,148bA
Controle	5,33aA	5,51aA	6,28aA	6,22aA	6,39aA	0,000bA	0,000cA	0,000cA	0,000dA	0,000cA

literatura. Silva Filho *et al.* (2002) registraram para *Aspergillus sp.*, maior biomassa seca e P solúvel em meio contendo glicose. Por outro lado, Barroso & Nahas (2008) relataram que a taxa de biomassa e fosfato solubilizado por *A. niger* foi maior em meio de cultura com manitol.

A redução do pH do meio contendo as fontes de fosfato e de carbono foi observada (tabela 1, 2 e 3). Contudo, o mecanismo de solubilização de P foi relacionado na literatura à produção de ácidos orgânicos, a qual pode ser atribuída à absorção de carboidrato durante o crescimento fúngico, e à consequente diminuição do pH (Vassilev *et al.* 2006, Chuang *et al.* 2007). No entanto, as fontes de fosfato associadas às fontes de carbono de coprodutos da vinificação não apresentaram redução significativa do pH na maioria das vezes, embora tenham apresentado

alta solubilização e maior produção de biomassa seca. Assim, podemos indicar que o aumento da biomassa pode elevar o potencial de solubilização e que, além disso, a produção de ácidos orgânicos pode ter sobrepujado esta condição, corroborando o relato de Barroso & Nahas (2008), que afirmaram que efetivamente pode ser observada relação significativa entre a solubilização e a produção de ácidos, mas não com a diminuição do pH.

Com base nos presentes resultados, pode-se sugerir que o aumento na quantidade de fosfato solubilizado em meio contendo bagaço de uva derivado da produção de suco ou da produção de vinho pode ocorrer em razão da alta produção de micélio (biomassa), o que acarreta, por conseguinte, maior produção de ácidos orgânicos pelos fungos durante seu crescimento.

Tabela 2. Valores médios de P solúvel, pH e biomassa seca (BS) em meio de cultura GL líquido suplementado com fonte de fosfato (18% P₂O₅), fontes de carbono (amido, glicose, sacarose, bagaço de uva derivado da produção de vinho ou da produção de suco) e inoculado com espécimes de fungos solubilizadores de fosfato (FSP), sete dias após inoculação, *Aspergillus brasiliensis* Varga, Frisvad & Samson, na região do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brasil. Médias (n = 5) seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p < 0,01). I: incremento {100[(X-Y)/Y]}, X: tratamento inoculado com FSP e Y: tratamento controle; GLI: glicose; SCS: sacarose; BUS: bagaço de uva derivado da produção de suco; BUV: bagaço de uva derivado da produção de vinho; AMD: amido.

Table 2. Average values of soluble P, pH, and dry biomass (BS) in liquid GL culture medium supplemented with phosphate source (18% P₂O₅), carbon sources (starch, glucose, sucrose, grape bagasse derived from wine or juice production) and inoculated with specimens of phosphate-solubilizing fungi (FSP), seven days after inoculation, in the region of Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco State, Brazil. Means (n = 5) followed by the same letter, lower case in the column and capital letters in the line, did not differ significantly by Tukey test (p < 0.01). I: increment {100[(X-Y)/Y]}, X: treatment inoculated with FSP and Y: control treatment; GLI: glucose; SCS: sucrose; BUS: grape bagasse derived from juice production; BUV: grape bagasse derived from wine production; AMD: starch.

Espécimes	P solúvel (µg ml ⁻¹)									
	GLI	I %	SCS	I %	BUS	I %	BUV	I %	AMD	I %
FSP81	376bA	-	419bA	19	349cA	-	300aA	29	408bA	-
FSP88	406bA	02	397bA	13	506bA	07	350aA	51	548aA	21
FSP101	355bA	-	391bA	11	499bA	05	340aA	47	515aA	13
FSP105	457aA	15	472aA	34	580aA	23	312aA	34	377bA	-
FSP109	387bA	-	325bA	-	417bA	-	345aA	49	386bA	-
Controle	398bA	-	351bA	-	473bA	-	232bA	-	454bA	-

Espécimes	pH					BS (g 50 ml ⁻¹)				
	GLI	SCS	BUS	BUV	AMD	GLI	SCS	BUS	BUV	AMD
FSP81	3,53aAB	3,64abAB	3,14cAB	4,83aA	2,6cB	1,053aA	1,089aA	1,185abA	1,092abA	0,935abA
FSP88	2,82aB	2,51bB	2,81cB	3,96aA	2,77bcB	0,674abAB	0,843aAB	1,194aA	1,006abAB	0,398bcB
FSP101	3,06aB	3,08bB	3,86bB	5,30aA	3,91aB	0,339abB	0,456abB	1,279aA	1,407aA	0,369cB
FSP105	3,52aB	2,92bB	3,81bB	5,18aA	3,12abcB	0,896aA	0,559abA	0,443cA	0,826bA	0,979aA
FSP109	3,70aB	3,61abB	5,37aA	5,60aA	3,06abcB	0,937aA	0,948aA	0,978bA	1,063abA	0,455abcB
Controle	4,68aA	5,97aA	3,95bA	5,07aA	3,61abA	0,000bA	0,000bA	0,000dA	0,000cA	0,000cA

Tabela 3. Valores médios de P solúvel, pH e biomassa seca (BS) em meio de cultura GL líquido suplementado com fonte de fosfato (17% P₂O₅), fontes de carbono (amido, glicose, sacarose, bagaço de uva derivado da produção de vinho ou da produção de suco) e inoculado com espécimes de fungos solubilizadores de fosfato (FSP), sete dias após inoculação, *Aspergillus brasiliensis* Varga, Frisvad & Samson, na região do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brasil. Médias (n = 5) seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p < 0,01). I: incremento {100[(X-Y)/Y]}, X: tratamento inoculado com FSP e Y: tratamento controle; GLI: glicose; SCS: sacarose; BUS: bagaço de uva derivado da produção de suco; BUV: bagaço de uva derivado da produção de vinho; AMD: amido.

Table 3. Average values of soluble P, pH, and dry biomass (BS) in liquid GL culture medium supplemented with phosphate source (17% P₂O₅), carbon sources (starch, glucose, sucrose, grape bagasse derived from wine or juice production) and inoculated with specimens of phosphate-solubilizing fungi (FSP), seven days after inoculation, in the region of Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco State, Brazil. Means (n = 5) followed by the same letter, lower case in the column and capital letters in the line, did not differ significantly by Tukey test (p < 0.01). I: increment {100[(X-Y)/Y]}, X: treatment inoculated with FSP and Y: control treatment; GLI: glucose; SCS: sucrose; BUS: grape bagasse derived from juice production; BUV: grape bagasse derived from wine production; AMD: starch.

Espécimes	P solúvel (µg ml ⁻¹)									
	GLI	I %	SCS	I %	BUS	I %	BUV	I %	AMD	I %
FSP81	250bAB	-	419abA	20	196cBC	-	224aABC	57	179bC	-
FSP88	467aA	72	397bAB	13	414aA	32	203abB	42	330aAB	68
FSP101	279bB	03	390bB	11	394abA	26	177bcC	24	305abB	55
FSP105	294bA	09	471aA	35	353abA	12	208abB	45	196bB	-
FSP109	285bAB	05	325bA	-	368abA	17	190abB	33	190bB	-
Controle	271bAB	-	350bAB	-	314bA	-	143cC	-	197bBC	-

Espécimes	pH					BS (g 50 ml ⁻¹)				
	GLI	SCS	BUS	BUV	AMD	GLI	SCS	BUS	BUV	AMD
FSP81	3,12bBC	2,69bC	4,07cB	6,99abA	4,45bB	1,080aA	1,049aA	1,687aA	1,823aA	1,399aA
FSP88	3,23bC	3,39bC	3,29cC	5,80bB	7,54aA	0,913aA	0,907abA	1,708aA	1,542aA	1,282aA
FSP101	3,23bC	6,19aB	6,77bAB	7,75aAB	8,39aA	0,913aAB	0,433abcB	1,565aA	0,176bB	1,020abAB
FSP105	2,72bC	2,82bC	4,34cB	7,51aA	3,95bB	0,365abB	0,192cB	0,248cB	0,487bAB	0,945abA
FSP109	2,68bB	3,56bB	8,11aA	8,32aA	3,43bB	0,481abAB	0,228bcB	0,978bA	0,163bB	0,753abAB
Controle	6,80aA	7,52aA	6,80bA	7,36aA	7,23aA	0,000bA	0,000cA	0,000dA	0,000bA	0,000bA

O bagaço de uva torna-se de fundamental importância como alternativa para a utilização em culturas vegetais, auxiliando no crescimento de fungos solubilizadores de fosfatos (FSP) e consequente solubilização do fosfato para as plantas. Além de apresentar custo reduzido por tratar-se de resíduo da uva gerado na fabricação de suco e vinho, o aproveitamento dessa fonte de carbono pode reduzir os impactos gerados pelo seu descarte.

Desse modo, os coprodutos da vinificação podem ser utilizados na agricultura como alternativa viável e de menor custo para produzir inóculo de fungos solubilizadores de fosfatos e estimular o crescimento de fungos autóctones, visando a otimização na disponibilização de fontes não renováveis.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas bolsas de IC (Silva), GD (Coutinho) e PQ (Yano-Melo); à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo auxílio à pesquisa; à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Semiárido), pelo suporte à pesquisa.

Literatura citada

Ahuja, A., Ghosh, S.B. & D'Souza, S.F. 2007. Isolation of a starch utilizing, phosphate solubilizing fungus on buffered medium and its characterization. *Bioresource Technology* 98: 3408-3411.

- Barroso, C.B. & Nahas, E.** 2008. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43: 529-535.
- Bizukojc, M. & Ledakowicz, S.** 2004. The kinetics of simultaneous glucose and fructose uptake and product formation by *Aspergillus niger* in citric acid fermentation. *Process Biochemistry* 39: 2261-2268.
- Chuang, C.C., Kuo, Y.L., Chao, C.C. & Chao, W.L.** 2007. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biology and Fertility of Soils* 43: 575-584.
- Coutinho, F.P., Felix, W.P. & Yano-Melo, A.M.** 2012. Solubilization of phosphates in vitro by *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. *Ecological Engineering* 42: 85-89.
- Papagianni, M., Frank, W., Matthey, M.** 2005. Fate and role of ammonium ions during fermentation of citric acid by *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 7178-7186.
- Saber, W.I.A., Ghanem, K.M. & El-Hersh, M.S.** 2009. Rock phosphate solubilization by two isolates of *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. and their promotion to mung bean plants. *Research Journal of Microbiology* 4: 235-250.
- Scervino, J.M., Papinutti, V.L., Godoy, M.S., Rodriguez, M.A., Della Monica, I., Recchi, M., Pettinari, M.J. & Godeas, A.M.** 2011. Medium pH, carbon and nitrogen concentrations modulate the phosphate solubilization efficiency of *Penicillium purpurogenum* through organic acid production. *Journal of Applied Microbiology* 110: 1215-1223.
- Silva Filho, G.N., Narloch, C. & Scharf, R.** 2002. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37: 847-854.
- Son, H.J., Park, G.T., Cha, M.S. & Heo, M.S.** 2006. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource Technology* 97: 204-210.
- Statsoft Inc.** 1997. *Statistica for Windows*. Statsoft Inc., Tulsa.
- Sylvester-Bradley, R., Asakawa, N., La Torraca, S., Magalhães, F.M.M., Oliveira, L.A. & Pereira, R.M.** 1982. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amazonica* 12: 15-22.
- Tedesco, M.J., Gianello, C., Bissani, C.A., Bohnen, H. & Volkweiss, S.J.** 1995. *Análises de solo, plantas e outros materiais*. 2 ed. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Vassilev, N., Medina, A., Azcón, R. & Vassileva, M.** 2006. Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and P uptake. *Plant and Soil* 287: 77-84.
- Wakelin, S.A., Warren, R.A., Harvey, P.R. & Ryder, M.H.** 2004. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. *Biology and Fertility of Soils* 40: 36-43.
- Weber, O.B., Souza, C.C.M.S., Gondin, D.M.F., Oliveira, F.N.S., Crissóstomo, L.A., Caproni, A.L. & Saggin Júnior, O.** 2004. Inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada em mudas de cajueiro-anão-precoce. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39: 477-483.
- Xin, C., Jian-Jun, T., Zhi-Guo, F. & Shui-Jin, H.** 2002. Phosphate-solubilizing microbes in rhizosphere soils of 19 weeds in Southeastern China. *Journal of Zhejiang University Science* 3: 355-361.
- Zeroual, Y., Chadghan, R., Hakam, A. & Kossir, A.** 2012. Biosolubilization of mineral insoluble phosphates by immobilized fungi (*Aspergillus niger*) in fluidized bed bioreactor. *Journal of Aquaculture and Research Development* 3: 1-5.