

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

**SELEÇÃO DE ESTIRPES BACTERIANAS RIZOSFÉRICAS E NÃO
RIZOSFÉRICAS COM POTENCIAL PARA BIOSOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO
E PRODUÇÃO DE INOCULANTES VISANDO AUMENTO DO CRESCIMENTO E
NUTRIÇÃO DE MILHO**

Crísia Santos de Abreu

Belo Horizonte

2019

Crísia Santos de Abreu

**SELEÇÃO DE ESTIRPES BACTERIANAS RIZOSFÉRICAS E NÃO
RIZOSFÉRICAS COM POTENCIAL PARA BIODISSOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO
E PRODUÇÃO DE INOCULANTES VISANDO AUMENTO DO CRESCIMENTO E
NUTRIÇÃO DE MILHO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação
em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais para a obtenção do título
de Doutora em Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida de Resende Stoianoff
Coorientadoras: Dra. Christiane Abreu de Oliveira Paiva

Dra. Eliane Aparecida Gomes

Prof^a. Dra. Vera Lúcia dos Santos

Belo Horizonte

2019

- 043 Abreu, Crísia Santos de.
Seleção de estirpes bacterianas rizosféricas e não rizosféricas com potencial para biossolubilização de fosfato e produção de inoculantes visando aumento do crescimento e nutrição de milho [manuscrito] / Crísia Santos de Abreu. - 2019.
117 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida de Resende Stoianoff.
Coorientadoras: Dra. Christiane Abreu de Oliveira Paiva; Dra. Eliane Aparecida Gomes; Profa. Dra. Vera Lúcia dos Santos.
- Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.
1. Microbiologia. 2. Zea mays. 3. Metagenômica. 4. Fosfato. 5. Fósforo. I. Stoianoff, Maria Aparecida de Resende. II. Paiva, Christiane Abreu de Oliveira. III. Gomes, Eliane Aparecida. IV. Santos, Vera Lúcia dos. V. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. VI. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE TESE DE **CRÍSIA SANTOS DE ABREU**
Nº REGISTRO: 2014769987

Às 09:00 horas do dia 19 de dezembro de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Prof. Dr. Aristoteles Góes Neto, Prof. Dr. Douglas Boniek da Silva Navarro, Prof^a. Dra. Maria Cristina Monteiro de Souza Costa, Dra. Danielle Letícia da Silva e o (a) Prof(a). Dra. Maria Aparecida de Resende Stoianoff - Orientador(a), para julgar o trabalho final **Seleção de Estirpes Bacterianas Rizosféricas e Não Rizosféricas com Potencial para Bioessolubilização de Fosfato e Produção de Inoculantes Visando Aumento do Crescimento e Nutrição de Milho**, da aluna Crísia Santos de Abreu, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao (à) candidato(a), para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O(A) candidato(a) foi considerado(a) **APROVADO(A)**. O resultado final foi comunicado publicamente ao(à) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2019. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Prof(a). Dr(a). Aristoteles Góes Neto

Aristoteles Góes Neto

Prof(a). Dr(a). Douglas Boniek da Silva Navarro

Douglas Boniek da Silva Navarro

Prof(a). Dr(a). Maria Cristina Monteiro de Souza Costa

Maria Cristina Monteiro de Souza Costa

Prof(a). Dr(a). Danielle Letícia da Silva

Danielle Letícia da Silva

Prof(a). Dr(a). Maria Aparecida de Resende Stoianoff (Orientador)

Maria Aparecida de Resende Stoianoff

Flávio Guimarães da Fonseca

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me sustentado em todos os momentos da minha vida. Pela cura física e testemunho da sua fidelidade. Por mostrar a cada instante que aquele que confia em Ti é mais que vencedor. Senhor, se respiro é devido à sua misericórdia!

Ao meu noivo Joel pelo amor, compreensão e cumplicidade. Obrigada por sonhar comigo e sempre estar ao meu lado;

À Prof^ª. Dra. Maria Aparecida de Resende Stoianoff por ter acreditado em mim, aberto as portas do seu coração e do seu laboratório para me orientar com leveza, serenidade, profissionalismo e respeito durante o nosso tempo de convivência e momentos frágeis que passei. Palavras são pouco para expressar minha gratidão e admiração;

Às minhas coorientadoras Dra. Christiane Abreu de Oliveira Paiva, Dra. Eliane Aparecida Gomes e Prof^ª. Dra. Vera Lúcia dos Santos, pelo financiamento de parte deste trabalho;

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo e do Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo pelo auxílio na condução dos experimentos;

À Fernanda de Cássia Batista pelo auxílio nas análises de sequenciamento e solubilização de fosfato;

Ao Prof. Dr. Douglas Boniek Silva Navarro ajuda e disponibilidade com as análises cromatográficas, pela amizade e conselhos;

Ao Dr. Antônio Marcos Coelho pela concessão do experimento de campo para os dados de metagenômica;

À Dra. Ubiana de Cássia Silva pela ajuda com as análises metagenômicas;

Ao Prof. Aristóteles Góes Neto pela ajuda e disponibilidade com as análises metagenômicas;

À UFMG pela oportunidade para a realização do doutorado;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

A Embrapa Milho e Sorgo pela disponibilização de recursos para a realização deste trabalho.

À Dra. Mariana Caselli Anzai e Dra. Camila de Aguiar Lima pela amizade que construímos durante as disciplinas cursadas juntas;

À Ms. Renata Regina Pereira da Conceição pela amizade e por toda ajuda;

Na vida nada se constrói sozinho. O apoio de todos foi fundamental para a realização deste projeto, principalmente devido às limitações de saúde que tive no decorrer do doutorado. Então, agradeço imensamente por terem me acompanhado durante esta jornada. Serei eternamente grata!

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I: EFEITO DO TIPO DE ADUBAÇÃO SOBRE O NÚMERO DE ISOLADOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO E POTENCIAL DE SOLUBILIZAÇÃO DE ISOLADOS PROVENIENTES DE DIFERENTES ADUBAÇÕES FOSFATADAS.

Tabela 1: *Número de micro-organismos rizosféricos de milho selecionados nos meios NBRIP e Fitato de Sódio, de acordo com as fontes de adubação fosfática utilizada..... 9*

CAPÍTULO III: SELEÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO DE ROCHA COM POTENCIAL PARA A FORMULAÇÃO DE BIOINOCULANTES DE MILHO

Tabela 1: *Biossolubilização de fósforo por bactérias rizosféricas de milho cultivadas em meio líquido contendo fontes inorgânicas (ferro e alumínio) e orgânicas (fosfato natural de rocha Araxá e Fitato de Sódio) como fontes exclusivas de fósforo. Valores em mg.L⁻¹ de fósforo solubilizado, da média de três repetições por amostra, após 9 dias de incubação.....52*

Tabela 2: *Produção de ácidos orgânicos por micro-organismos rizosféricos de milho solubilizadores de fósforo.....56*

CAPÍTULO IV: ESTUDO DA DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS PRESENTES EM AMOSTRAS DE SOLO RIZOSFÉRICO E NÃO RIZOSFÉRICO DA CULTURA DO MILHO SOB DIFERENTES MANEJOS DE ADUBAÇÃO FOSFATADA

Tabela 1: *Resultado da análise físico-química do solo antes do plantio.....79*

Tabela 2: *Média do número de 16S OTUS observados, estimadores de riqueza e índices de diversidade calculados para a comunidade de bactérias das amostras de solo rizosférico e não rizosférico (bulk soil) de milho em solo adubado com diferentes fontes de fósforo.....81*

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I: EFEITO DO TIPO DE ADUBAÇÃO SOBRE O NÚMERO DE ISOLADOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO E POTENCIAL DE SOLUBILIZAÇÃO DE ISOLADOS PROVENIENTES DE DIFERENTES ADUBAÇÕES FOSFATADAS.

Figura 1: Halo de solubilização em meio de cultura sólido formado por micro-organismos capazes de solubilizarem fosfato tricálcio e/ou fitato de sódio, fontes exclusivas de fósforo adicionado ao meio de cultura. Halo translúcido ao redor da colônia indica processo de solubilização e/ou mineralização de fósforo..... 10

Figura 2: Registro fotográfico das estruturas reprodutivas fúngicas sobre as lâminas pela técnica do microcultivo. As lâminas foram coradas em lactofenol azul de algodão, visualizadas e registradas em microscopia óptica no aumento de 100X.....12

CAPÍTULO II: EFEITO DA INOCULAÇÃO DE ISOLADOS DE MICRO-ORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO SOBRE A ATIVIDADE MICROBIANA DO SOLO EM RELAÇÃO À CICLAGEM DE FÓSFORO

Figura 1: Atividade enzimática das fosfatases ácida e alcalina para diferentes manejos de adubação fosfatada. Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula e minúscula, em cada tipo de adubação não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. P0: sem adubação fosfatada; ST: Super Fosfato Triplo; FA: Fosfato natural de Araxá; STFA: mistura (1:1) de Super Fosfato Triplo (STFA) e Fosfato natural de Araxá (STFA). Barras verticais indicam o erro padrão da média de três repetições.....28

Figura 2: Atividade enzimática das fosfatases ácida para os diferentes micro-organismos utilizados de acordo com a fonte de adubação. Médias seguidas pela mesma letra em cada tipo de adubação não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. P0: sem adubação fosfatada; ST: Super Fosfato Triplo; FA: Fosfato natural de Araxá; STFA: mistura (1:1) de Super Fosfato Triplo (STFA) e Fosfato natural de Araxá (STFA); NR: solo não rizosférico. E0: sem inoculante. Barras verticais indicam o erro padrão da média de três repetições.....29

Figura 3: Atividade enzimática das fosfatases alcalina para os diferentes micro-organismos utilizados de acordo com a fonte de adubação. Médias seguidas pela mesma letra em cada tipo de adubação não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. P0: sem adubação fosfatada; ST: Super Fosfato Triplo; FA: Fosfato natural de Araxá; STFA: mistura (1:1) de Super Fosfato Triplo (STFA) e Fosfato natural de Araxá (STFA); NR: solo não rizosférico. E0: sem inoculante. Barras verticais indicam o erro padrão da média de três repetições.....31

CAPÍTULO III: SELEÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO DE ROCHA COM POTENCIAL PARA A FORMULAÇÃO DE BIOINOCULANTES DE MILHO

Figura 1: *Material descartável utilizado para análise de fósforo.....48*

Figura 2: *Potencial de solubilização de fósforo por isolados bacterianos de solo rizosférico de milho. Barras horizontais indicam o erro padrão da média de três repetições. P-Araxá: fosfato de Araxá. P-Fe: fosfato de ferro. P-Al: fosfato de alumínio.....53*

CAPÍTULO IV: ESTUDO DA DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS PRESENTES EM AMOSTRAS DE SOLO RIZOSFÉRICO E NÃO RIZOSFÉRICO DA CULTURA DO MILHO SOB DIFERENTES MANEJOS DE ADUBAÇÃO FOSFATADA

Figura 1: *Abundância relativa dos gêneros de bactéria presentes nas amostras de solo rizosférico de milho. Resultado de três repetições por amostra. Controle: sem fonte de fosfato; FB: fosfato reativo Bayóvar; FI: fosfato de rocha Itafós; SFT: Super Fosfato Triplo.....82*

Figura 2: *Gêneros que apresentaram diferença significativa para abundância, entre as fontes de adubação em solo rizosférico de milho, pelo teste de Tukey Kramer ($p < 0,05$). Resultado de três repetições por amostra. Controle: sem fonte de fosfato; FB: fosfato reativo Bayóvar; FI: fosfato de rocha Itafós; SFT: Super Fosfato Triplo.....83*

Figura 3: *Gêneros que apresentaram diferença significativa na sua abundância, entre as fontes de adubação de solo rizosférico de milho, pela análise de variância com teste post-hoc de Tukey Kramer ($p < 0,05$). São apresentados os valores da média e desvio padrão para cada gênero. Controle: sem fonte de fosfato; FB: fosfato reativo Bayóvar; FI: fosfato de rocha Itafós; SFT: Super Fosfato Triplo.....84*

Figura 4: *Análise de componentes principais (PCA) dos gêneros das comunidades bacterianas presentes na rizosfera de milho sob manejo de adubação fosfatada. A figura foi construída empregando o método de distância Bray-Curtis e representa a distância filogenética entre amostras, ou seja, quanto mais próximas duas amostras significa que sua composição bacteriana é muito semelhante. Controle: sem fonte de fosfato; FB: fosfato reativo Bayóvar; FI: fosfato de rocha Itafós; SFT: Super Fosfato Triplo.....85*

Figura 5: *Diagrama de Venn com número de espécies distribuídas entre as fontes de adubação fosfatada de solo rizosférico de milho. Valores fora das interseções representam riqueza de espécies e o número na interseção corresponde às espécies que co-ocorrem em ambas as fontes de adubação. Controle: sem fonte de fosfato; FB: fosfato reativo Bayóvar; FI: fosfato de rocha Itafós; SFT: Super Fosfato Triplo.....87*

Figura 6: *Abundância relativa dos gêneros de bactéria presentes nas amostras de solo não rizosférico de milho. Resultado de três repetições por amostra. Controle: sem fonte de*

fosfato; FB: fosfato reativo Bayóvar; FI: fosfato de rocha Itafós; SFT: Super Fosfato Triplo.....88

Figura 7: *Gêneros que apresentaram diferença significativa para abundância, entre as fontes de adubação em solo não rizosférico (bulk soil) de milho, pelo teste de Tukey Kramer ($p < 0,05$). Resultado de três repetições por amostra. Controle: sem fonte de fosfato; FB: fosfato reativo Bayóvar; FI: fosfato de rocha Itafós; SFT: Super Fosfato Triplo.....89*

Figura 8: *Gêneros que apresentaram diferença significativa na sua abundância, entre as fontes de adubação de solo não rizosférico (bulk soil) de milho, pela análise de variância com teste post-hoc de Tukey Kramer ($p < 0,05$). São apresentados os valores da média e desvio padrão para cada gênero. Controle: sem fonte de fosfato; FB: fosfato reativo Bayóvar; FI: fosfato de rocha Itafós; SFT: Super Fosfato Triplo.....90*

Figura 9: *Análise de componentes principais (PCA) dos gêneros das comunidades bacterianas presentes no solo não rizosférico (bulk soil) de milho sob manejo de adubação fosfatada. A figura foi construída empregando o método de distância Bray-Curtis e representa a distância filogenética entre amostras, ou seja, quanto mais próximas duas amostras significa que sua composição bacteriana é muito semelhante. Controle: sem fonte de fosfato; FB: fosfato reativo Bayóvar; FI: fosfato de rocha Itafós; SFT: Super Fosfato Triplo.....91*

Figura 10: *Diagrama de Venn com número de espécies distribuídas entre as fontes de adubação fosfatada de solo rizosférico de milho. Valores fora das interseções representam riqueza de espécies e o número na interseção corresponde às espécies que co-ocorrem em ambas as fontes de adubação. Controle: sem fonte de fosfato; FB: fosfato reativo Bayóvar; FI: fosfato de rocha Itafós; SFT: Super Fosfato Triplo.....92*

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: EFEITO DO TIPO DE ADUBAÇÃO SOBRE O NÚMERO DE ISOLADOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO E POTENCIAL DE SOLUBILIZAÇÃO DE ISOLADOS PROVENIENTES DE DIFERENTES ADUBAÇÕES FOSFATADAS.....	1
RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	4
2. MATERIAL E MÉTODOS	6
2.1 Coleta das amostras vegetais.....	6
2.2 Isolamento de micro-organismos rizosféricos.....	6
2.3 Seleção de micro-organismos rizosféricos.....	6
2.4 Caracterização de micro-organismos rizosférico.....	7
2.5 Eficiência de solubilização e mineralização de fósforo em meio de cultura sólido.....	7
2.6 Identificação micromorfológica de fungos por meio do método de micro-cultivo.....	7
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	9
4. CONCLUSÃO.....	14
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
CAPÍTULO II: EFEITO DA INOCULAÇÃO DE ISOLADOS DE MICRO-ORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO SOBRE A ATIVIDADE MICROBIANA DO SOLO EM RELAÇÃO À CICLAGEM DE FÓSFORO.....	20
RESUMO.....	21
ABSTRACT.....	22
1. INTRODUÇÃO.....	23
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
2.1 Área de coleta e amostragem.....	26
2.2 Atividade enzimática.....	26
2.3 Análise estatística.....	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4. CONCLUSÃO.....	34

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
CAPÍTULO III: SELEÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO DE ROCHA COM POTENCIAL PARA A FORMULAÇÃO DE BIOINOCULANTES DE MILHO.....	40
RESUMO.....	41
ABSTRACT.....	42
1. INTRODUÇÃO.....	43
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
2.1 Área de coleta e amostragem.....	46
2.2 Isolamento de micro-organismos rizosféricos.....	46
2.3 Seleção de micro-organismos rizosféricos.....	46
2.4 Eficiência de solubilização de fósforo por microrganismos endofíticos em meio de cultura sólido.....	47
2.5 Eficiência de solubilização de fósforo por micro-organismos em meio de cultura líquido.....	47
2.6 Quantificação de ácidos orgânicos.....	48
2.7 Análise estatística.....	49
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4. CONCLUSÃO.....	60
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
CAPÍTULO IV: ESTUDO DA DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS PRESENTES EM AMOSTRAS DE SOLO RIZOSFÉRICO E NÃO RIZOSFÉRICO DA CULTURA DO MILHO SOB DIFERENTES MANEJOS DE ADUBAÇÃO FOSFATADA.....	69
RESUMO.....	70
ABSTRACT.....	71
1. INTRODUÇÃO.....	72
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	74
2.1 Área de coleta e amostragem.....	74
2.2 Análises físico-químicas das amostras.....	74
2.3 Extração de DNA metagenômico das amostras de solo.....	75
2.4 Amplificação da região 16S rDNA e construção da biblioteca.....	75
2.5 Avaliação da diversidade taxonômica bacteriana.....	75

2.6 Análises estatísticas.....	76
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
4. CONCLUSÃO.....	94
5. PERSPECTIVAS.....	95
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
PRODUÇÃO CIENTÍFICA E PARTICIPAÇÃO DE EVENTOS.....	101

RESUMO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas de maior importância para o agronegócio brasileiro em face do advento do milho safrinha associado a novas técnicas agrícolas e à utilização e incorporação de terras não cultivadas, principalmente em regiões de Cerrado, e da demanda da agroindústria de rações de aves, suínos e bovinos. O aumento de produção nesta cultura gera maior demanda por insumos e torna o agronegócio brasileiro altamente dependente do mercado externo no que se refere à utilização de adubação fosfatada, visto que cerca de 50% deste adubo no Brasil é proveniente de importação. Micro-organismos solubilizadores de fósforo estão sendo utilizados como alternativa para otimizar a eficiência na utilização de fósforo (P) por meio da biossolubilização de rochas fosfáticas e produção de ácidos orgânicos. Neste contexto, o presente trabalho objetivou selecionar e caracterizar micro-organismos rizosféricos de milho solubilizadores de fosfato *in vitro* com potencial para biossolubilização de rochas fosfáticas, avaliar a dinâmica enzimática de fosfatases ácida e alcalina de solo rizosférico de milho cultivado em diferentes manejos de adubação fosfatada para seleção de bactérias potencialmente eficientes na biossolubilização de P e prospectar grupos funcionais de bactérias eficientes na solubilização de P para uso como inoculantes em culturas de grãos. O experimento foi conduzido na Embrapa Milho e Sorgo safra na safra 2015/16, distribuído em delineamento de blocos casualizados, com três repetições, esquema de parcela subdividida, com quatro estirpes e três tipos de adubação distribuídos em faixas: Super Fosfato Triplo (SFT), Fosfato de Araxá (FA), uma mistura da metade da dose com SFT e outra metade com Fosfato de Araxá (STFA) e controle sem fósforo (P0). Os inoculantes foram constituídos de bactérias rizosféricas e endofíticas de milho (B70L, B119, B2084, B2082). A atividade biológica de P no solo foi mensurada pela determinação das fosfatases ácida e alcalina. Os resultados mostraram a ocorrência de diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos com adubação e tipos de inoculantes. Independente do tipo de inoculante, a maior atividade de ambas as fosfatases ocorreu no tratamento sem adubação. Nos tratamentos inoculados com a cepa B70L, independente do tipo de adubação, ocorreram os maiores valores das enzimas, indicando que esta cepa estimulou a atividade biológica do solo relacionada à ciclagem de P. As bactérias deste estudo são potencialmente úteis para agregar valor fertilizante aos fosfatos de baixa solubilidade. Os ensaios de solubilização de P foram realizados em meio NBRIP contendo fosfato de ferro e alumínio, em meio fitato de sódio e no ensaio com solubilização de rocha a fonte de P foi fosfato de Araxá. A produção de ácidos orgânicos (AO) foi mensurada por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Todas as estirpes apresentaram eficiência relativa de solubilização *in vitro*. Com relação à produção de AOs, houve diferença estatística segundo o tipo de ácido e a fonte de P. Para o estudo da microbiota não cultivável, foram coletadas amostras de solo rizosférico e não rizosférico contendo o genótipo de milho DKB 390 no estágio de floração, sendo os tratamentos constituídos das adubações de P utilizadas no plantio: Super Fosfato Triplo (SFT), Fosfato de Rocha Itafós (FRI), Fosfato Reativo Bayóvar (FRB) e tratamento testemunha sem adição de fosfato. O perfil da comunidade de bactérias foi analisado por meio da construção de bibliotecas de amplicons rRNA 16S e sequenciamento na plataforma Illumina Miseq. A riqueza estimada não variou significativamente para a rizosfera. A rizosfera e o *bulk soil* apresentaram diversidade para a comunidade microbiana. Observou-se abundância de táxons bacterianos relacionados à solubilização de fósforo no solo fertilizado por fosfato de rocha.

Palavras-chave: solubilização de fósforo, fosfato de rocha, *Zea mays*, metagenômica.

CAPÍTULO I

**EFEITO DO TIPO DE ADUBAÇÃO SOBRE O NÚMERO DE ISOLADOS
SOLUBILIZADORES DE FOSFATO E POTENCIAL DE SOLUBILIZAÇÃO DE
ISOLADOS PROVENIENTES DE DIFERENTES ADUBAÇÕES FOSFATADAS**

RESUMO

A fertilidade do solo de regiões tropicais é substancialmente limitada pela baixa disponibilidade natural de fósforo (P) e como alternativa para aperfeiçoar a eficiência na labilidade desse nutriente, micro-organismos solubilizadores (MSP) e mineralizadores (MMP) de fósforo podem ser utilizados. O presente trabalho objetivou selecionar e caracterizar macromorfológicamente MSP e MMP isolados da rizosfera de milho cultivado em diferentes manejos de adubação. O material vegetal de milho foi coletado em experimento de campo durante o estágio de floração desta cultura. Para a seleção dos micro-organismos foram utilizados, concomitantemente, meios de cultura contendo fontes orgânicas e inorgânicas de P para evidenciar crescimento e/ou formação de halo transparente indicador de solubilização nos meios de cultura. A caracterização macromorfológica dos isolados foi realizada segundo Hungria e Silva (2011) com modificações. Obtiveram-se 200 morfotipos bacterianos e 99 morfotipos fúngicos. Esses resultados indicam o potencial solubilizador e mineralizador dos micro-organismos selecionados. De acordo com a caracterização macromorfológica, houve variabilidade entre todos os parâmetros avaliados. Esses resultados indicam uma possível diversidade entre os isolados, que foi verificada posteriormente pela realização da identificação molecular, via sequenciamento de DNA.

Termos de indexação: rizosfera, fertilidade do solo, *Zea mays* L.

ABSTRACT

Soil fertility in tropical regions is substantially limited by the low natural availability of phosphorus (P) and as an alternative to improve the nutrient lability efficiency, phosphorus solubilizing (PSM) and mineralizing (PMM) microorganisms can be used. The present work aimed to select and characterize macromorphologically PSM and PMM isolated from maize rhizosphere cultivated in different fertilization managements. Corn plant material was collected in a field experiment during the flowering stage of this crop. For the selection of microorganisms, culture media containing organic and inorganic P sources were used concomitantly to show growth and / or formation of transparent halo indicating solubilization in the culture media. The macromorphological characterization of the isolates was performed according to Hungary and Silva (2011) with modifications. 200 bacterial morphotypes and 99 fungal morphotypes were obtained. These results indicate the solubilizing and mineralizing potential of the selected microorganisms. According to the macromorphological characterization, there was variability among all evaluated parameters. These results indicate a possible diversity among the isolates, which was later verified by the molecular identification via DNA sequencing.

Keywords: rhizosphere, soil fertility, *Zea mays* L.

1. INTRODUÇÃO

O agronegócio brasileiro é um componente importante da economia do país devido à sua participação na absorção de mão de obra, contribuição para o PIB (Produto Interno Bruto) e geração de superávit primário. Atualmente o agronegócio brasileiro apresenta um crescimento na demanda por grãos em virtude do aumento do crescimento populacional, aumento de renda e mudança de hábitos alimentares (MAPA, 2012), bem como pela crescente demanda pelas indústrias de rações que utilizam grãos como base do seu processo produtivo.

Somado ao advento do milho safrinha temos a incorporação de novas tecnologias, principalmente em regiões de Cerrado, o que destaca o agronegócio brasileiro no cenário da economia nacional considerando que a agroindústria de rações de aves, suínos e bovinos é composta basicamente por farelo de soja e de milho, tornando o milho uma *commodity* estratégica para expansão do agronegócio brasileiro (Abreu, 2014), com alta representatividade na balança comercial nacional, sendo o grão a principal forma exportada desta cultura (Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, 2013). Esse incremento na produção do milho ocasiona, conseqüentemente, uma maior demanda por insumos e torna o agronegócio brasileiro altamente dependente do mercado externo no que se refere à utilização de adubação fosfatada, visto que cerca de 50% do adubo fosfatado utilizado no Brasil é proveniente de importação (ANDA, 2013).

A cultura do milho exige alta demanda por nutrientes e, dentre os macronutrientes essenciais às plantas, o fósforo (P) constitui um dos fatores limitantes da produção agrícola devido à sua importância no metabolismo vegetal, sua atuação nas funções fisiológicas básicas das células e em vários processos bioenergéticos, como fotossíntese e respiração celular (Hinsinger, 2001). Contudo, a fertilidade do solo de regiões tropicais, mais especificamente em regiões de Cerrado, fica substancialmente limitada pela baixa labilidade natural de P, uma vez que a deficiência desse elemento no solo acarreta alterações no metabolismo das plantas e pode prejudicar o fluxo de energia e a produção de carboidratos, gerando perdas de produtividade e até mesmo inviabilidade da safra (Abreu, 2014).

Os solos de Cerrado são caracteristicamente ácidos, possuem baixa fertilidade natural e, conseqüentemente, baixa disponibilidade de nutrientes essenciais como o P (Smyth, 2011) devido ao fenômeno de fixação com componentes do solo. Desta forma, mesmo com aplicação de adubação fosfatada, a concentração do P (2-10 μM) na solução do solo

permanece sub-ótima (Vance et al., 2003). Portanto o P deve ser continuamente ressuprido pela fase sólida do solo para promover a nutrição vegetal. , pois Devido ao processo de complexação do P com átions presentes no solo e por sua difusão lenta, cria-se uma zona de depleção ao redor da rizosfera (Marschner et al., 2011) que, por sua vez, dificulta o acesso das raízes a esse nutriente.

Micro-organismos solubilizadores (MSP) e mineralizadores (MMP) de P estão sendo utilizados como alternativa para aperfeiçoar a eficiência na utilização desse nutriente, disponibilizando-o para as plantas através do fluxo de P gerado pela biomassa microbiana por solubilização do P inorgânico pela produção de ácidos orgânicos, mineralização do P orgânico, atividade enzimática de fosfatases, entre outros mecanismos. Neste contexto, a compreensão do microbioma associado à cultura do milho torna-se imprescindível para o estudo dos efeitos da adubação sobre a comunidade de MSP e MMP. Estudos sobre micro-organismos associados ao milho tem sido realizados (Aira et al. 2010; Arruda et al. 2013; Liu et al. 2013; Gomes et al. 2015; Johnston-Monje et al. 2016) e relatam como a microbiota do milho se distribui em função das variações ambientais a que as plantas estão submetidas, considerando fatores como pH do solo, disponibilidade de água, textura e disponibilidade de nutrientes, assim como regiões de plantio, genótipos e estágio de crescimento da planta são considerados parâmetros que afetam o perfil da comunidade microbiana dessa cultura (Peiffer et al, 2013; Aira et al., 2010; Johnston-Monje et al. 2016).

O microbioma do milho inclui as regiões de filosfera e rizosfera (Liu et al. 2012; Li et al. 2014). A filosfera compreende partes foliares, florais e vegetativas, em que a parte dominante são as folhas, as quais representam um habitat único para a diversidade microbiana (Compant et al. 2010). A rizosfera compreende região de solo ao redor das raízes das plantas que se estende de 1 a 3 mm e contem os exsudatos, as secreções, as mucilagens, o mucigel lisados e a alta colonização dos micro-organismos (Moreira, 2006).

Diante disto, o objetivo deste trabalho foi selecionar e caracterizar macromorfológicamente micro-organismos solubilizadores e mineralizadores de P isolados da rizosfera de milho cultivado em diferentes manejos de adubação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta das amostras vegetais

As amostras de solo rizosférico foram coletadas em experimento de campo em que a cultura do milho se apresentava no estágio de floração, cuja plantação foi realizada em latossolo vermelho distrófico, na Embrapa Milho e Sorgo (19°28'S 44°15'W), município de Sete Lagoas-MG, na safra 2015. As adubações de P utilizadas no plantio foram: Super Fosfato Triplo (ST), Fosfato natural de Araxá (FA) e uma mistura (1:1) de Super Fosfato Triplo com Fosfato natural de Araxá (STFA). O plantio sem adição de P foi utilizado como controle. A adubação de plantio foi realizada com aplicação de 300 kg.ha⁻¹, na dose de P de 100 kg P₂O₅ ha⁻¹, exceto no controle sem adubação fosfatada (PO).

2.2 Isolamento de micro-organismos rizosféricos

As amostras de solo foram coletadas de acordo com Oliveira et al. (2009), considerando-se como solo rizosférico o solo mais fortemente aderido à raiz após agitação. Um total de 5 g de solo rizosférico foi peneirado, acrescentados a 45 mL de solução salina 0,85% e homogeneizados por 30 minutos. Após homogeneização, uma alíquota de 1 mL foi retirada e procedeu-se às diluições seriadas decimais (10⁻³ a 10⁻⁵) e para selecionar os micro-organismos, as análises foram realizadas em duplicata.

2.3 Seleção de micro-organismos rizosféricos

Após o isolamento, 100 µL de cada diluição seriada foi plaqueada em meio de cultura NBRIP (*National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium*) (Nautiyal, 1999) e Fitato de Sódio (Richardson & Hadobas 1997), contendo, respectivamente, fontes inorgânica e orgânica de P. As placas inoculadas foram incubadas a 25-28°C por até 10 dias, sendo o crescimento dos micro-organismos acompanhado diariamente. Os isolados foram selecionados pelo crescimento e/ou formação de halo transparente indicador de solubilização dos compostos (Figura 1) no meio de cultura. Foram realizadas três repetições para cada

diluição. No tratamento controle, as placas foram inoculadas com solução salina (0,85%) esterilizada.

2.4 Caracterização de micro-organismos rizosférico

A caracterização macromorfológica dos isolados foi realizada segundo Hungria e Silva (2011), observando-se os parâmetros, forma, elevação, borda, tamanho e superfície.

Após o isolamento, seleção e caracterização macromorfológica, todos os micro-organismos foram incorporados à Coleção de Micro-Organismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo, e posteriormente foram purificados e armazenados sob distintas formas: preservação em glicerol a -20 °C e -80 °C, preservação em óleo mineral, preservação segundo método de Castellani (1939) e preservação de micélios fúngicos a 8 °C.

2.5 Eficiência de solubilização e mineralização de fósforo em meio de cultura sólido

Os isolados bacterianos e fúngicos foram inoculados em placas contendo o meio NBRIP (*National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium*) (Nautiyal, 1999) e Fitato de Sódio (Richardson & Hadobas 1997) e incubados a 28 °C durante 7 dias para visualização do halo indicador de solubilização.

Após o período de incubação, o halo de solubilização foi medido pelo seguinte critério: diâmetro total (ϕ halo + ϕ colônia) dividido pelo diâmetro da colônia, considerando-se a média de quatro repetições para cada amostra. O resultado obtido foi expresso pelo Índice de Solubilização/Mineralização por meio da fórmula proposta por Berraquero et al. (1976):

$$IS/M = \phi \text{ Halo (mm)} \div \phi \text{ Colônia (mm)}$$

2.6 Identificação micromorfológica de fungos por meio do método de micro-cultivo

Os isolados fúngicos foram identificados pela morfologia macroscópica das colônias obtidas com a utilização da técnica clássica de Ridell para a identificação de fungos filamentos por microcultivo em lâmina (Domsch, *et al.*, 1980). Um *kit* contendo uma lâmina e lamínula sobre um bastão de vidro em formato de “V”, algodão e placa de Petri foi previamente esterilizado e, posteriormente, um pequeno bloco de meio de cultura BDA

(Batata Dextrose, batata, 200 g L⁻¹; dextrose, 20 g L⁻¹ e ágar, 15 g L⁻¹) foi colocado sobre a lâmina e inoculado nas arestas com o fungo isolado e com o auxílio de uma alça bacteriológica. Periodicamente o algodão foi umidificado com água destilada estéril. Após 14 dias de incubação à temperatura de 25°C, as lamínulas foram retiradas e cuidadosamente dispostas sobre uma nova lâmina de vidro e coradas com lactofenol azul de algodão (solução composta por ácido láctico, fenol e corante azul de algodão) para a observação, em microscópio óptico, das estruturas reprodutivas dos fungos filamentosos.

A visualização e a preservação de fungos através deste sistema são úteis, pois não ocorre plasmólise ao inativar os mesmos. O azul de algodão é incorporado à fórmula como corante diferencial para quitina e celulose, elementos da parede celular dos fungos (Lacaz, 2002). Posteriormente, baseado em chaves de identificação, os isolados foram identificados em nível de gênero e as estruturas observadas foram registradas por fotografia digital.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das amostras de solo rizosférico, obtiveram-se 200 (duzentos) morfotipos bacterianos e 99 (noventa e nove) fúngicos, selecionados pelo crescimento e/ou formação de halo transparente indicador de solubilização. Esses resultados indicam o potencial solubilizador e mineralizador dos micro-organismos isolados.

Em geral, a eficiência solubilizadora de bactérias em meio sólido foi maior que a mineralizadora, quando comparamos o número total de isolados crescidos no meio NBRIP em relação ao meio Fitato de Sódio (Tabela 1).

Tabela 1 – Número de micro-organismos rizosféricos de milho selecionados nos meios NBRIP e Fitato de Sódio, de acordo com as fontes de adubação fosfática utilizada.

Adubação	Bactérias		Fungos	
	NBRIP ¹	Fitato de Sódio ²	NBRIP	Fitato de Sódio
P0 ³	55	56	15	56
ST ⁴	2	----	6	1
FA ⁵	5	----	----	----
STFA ⁶	40	42	9	7
Total de isolados	102	98	30	64

¹ *National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium* (Nautiyal, 1999).

² Fitato de Sódio (Richardson & Hadobas 1997).

³ Tratamento controle, sem adição de fonte de fósforo.

⁴ Super Fosfato Triplo.

⁵ Fosfato de Araxá.

⁶ Meia dose da mistura entre Super Fosfato Triplo e Fosfato de Araxá..

O maior número de isolados bacterianos (53,9 %) foi computado no tratamento sem adução fosfatada, o que pode ser explicado por interferentes como um potencial solubilizador intrínseco do microbioma do solo e/ou concentração insuficiente de adubação de P nos demais tratamentos a ponto de superarem a eficiência solubilizadora da microbiota natural quanto à disponibilidade total de P e/ou redução da complexação natural de P no solo com cátions como ferro e alumínio, o que pode favorecer a sua disponibilidade para as plantas. O segundo tratamento com maior número de isolados bacterianos foi o STFA (39,22%), que trata-se de

uma apatita de origem ígnea, com alto grau de cristalização e baixa solubilidade natural em ácido cítrico (Kliemann & Lima 2001).

Os fosfatos naturais são insolúveis em água, mas podem ser aplicados diretamente no solo, pois o P_2O_5 contido nesses compostos reage diretamente com o ácido cítrico presente no solo e sua absorção, mesmo que lenta, acelera o ciclo biogeoquímico de P do solo. Além disso, a absorção direta pelas raízes que secretam substâncias ácidas potencializa a solubilidade de P na região rizosférica (Pérez-Montaña et al., 2014).

O meio de cultura NBRIP contém fonte insolúvel de P na forma de fosfato tricálcio que na presença de cloreto de cálcio e substâncias liberadas pelos micro-organismos, como ácidos orgânicos e enzimas no meio circundante, sofre processo de solubilização que é evidenciado pela formação de um halo translúcido ao redor das colônias que apresentam capacidade solubilizadora (Nautiyal, 1999; Souchie et al., 2005; Abreu, 2014).

A eficiência de solubilização de fosfato em meio de cultura sólido foi determinada pela formação de halo transparente indicador de solubilização e mineralização (Figura 1).

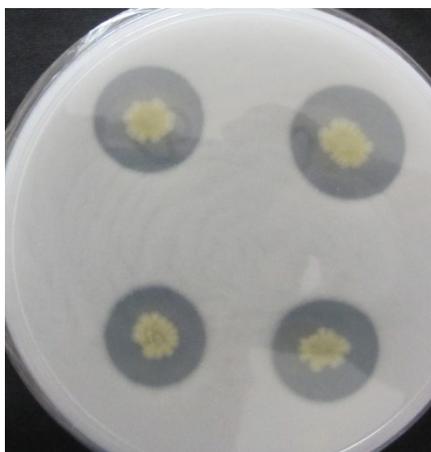


Figura 1 - Halo de solubilização em meio de cultura sólido formado por micro-organismos capazes de solubilizarem fosfato tricálcio e/ou fitato de sódio, fontes exclusivas de fósforo adicionado ao meio de cultura. Halo translúcido ao redor da colônia indica processo de solubilização e/ou mineralização de fósforo.

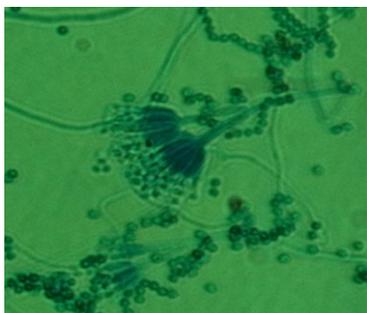
Os índices de solubilização e mineralização variaram significativamente ($p \leq 0,05$) entre os isolados avaliados. Do total de 200 isolados bacterianos e 99 fúngicos, 68 e 32

respectivamente não foram capazes de formar halo e a presença do halo de solubilização sugere a eficiência dos microrganismos em solubilizar P de fontes insolúveis. De acordo com os índices de solubilização (Tabela 1) os isolados foram classificados como estirpes de baixa solubilização/mineralização ($IS/M < 2$), média ($2 \leq IS/M \leq 4$) e alta solubilização ($IS/M > 4$) (Berraquero et al., 1976).

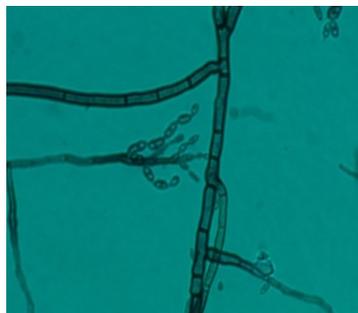
Para a realização deste trabalho, foram selecionados todos os morfotipos distintos que cresceram e que formaram, ou não, halo de solubilização nos meios de cultura utilizados. Este critério de seleção foi adotado visto que alguns autores como Whitelaw et al. (2000), relataram que o potencial de solubilização e mineralização de fosfato é proporcional ao tamanho do halo e à sua relação com o tamanho da colônia. Porém, a confiabilidade desta técnica é questionável uma vez que isolados que não produzem qualquer halo visível indicativo de solubilização podem solubilizar e/ou mineralizar formas insolúveis de fosfatos inorgânicos e/ou orgânicos em meio líquido (Oliveira et al., 2009; Sousa, 2010; Abreu, 2014).

Por meio da técnica do microcultivo em lâminas foram identificados os gêneros distintos de fungos filamentosos, levando em consideração as estruturas reprodutivas (conídios e conidióforos) e suas hifas. Além disso, foi considerado o tamanho da colônia (diâmetro), cor, textura (cremosa, mucóide, cotonosa, aveludada, serosa, granulosa, pulverulenta, membranosa, coriácea e verrucosa), aspectos da borda (regulares, irregulares e radiadas), o seu aspecto no verso e anverso da placa, se houve produção de exudatos e corantes, sempre considerando a temperatura e período de incubação.

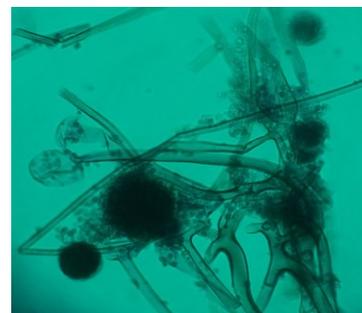
Após analisadas, as lâminas foram registradas e os seus respectivos fungos foram armazenados e preservados para compor a Coleção de Micro-Organismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo (Figura 2), ficando a disposição para trabalhos futuros.



Penicillium sp.



Cladosporium sp.



Mucor sp.



Aspergillus sp.



Helminthosporium sp.



Acremonium sp.

Figura 2 - Registro fotográfico das estruturas reprodutivas fúngicas sobre as lâminas pela técnica do microcultivo. As lâminas foram coradas em lactofenol azul de algodão, visualizadas e registradas em microscopia óptica no aumento de 100X.

Entre os isolados identificados pela técnica de microcultivo houve predominância do gênero *Penicillium* seguido por *Aspergillus*. Alguns gêneros de fungos filamentosos são frequentemente encontrados na maioria dos tipos de solos. No grupo dos fungos, os gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mortierella*, *Rhizopus*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Sclerotium*, *Torula*, *Trichoderma*, *Fusarium* e *Glomus*, compreendem aqueles de maior potencial na solubilização de fosfato (Alori et al., 2017).

Em especial os fungos filamentosos que compõem a microbiota do solo representam uma das linhagens evolutivas mais amplas e juntamente com uma complexa comunidade de micro e macro-organismos contribuem efetivamente para vários serviços indispensáveis ao funcionamento sustentável de todos os ecossistemas (Muller et al., 2004). Nos solos, os fungos constituem-se em um grupo de destaque na decomposição da matéria orgânica complexa, degradando a celulose e lignina, entre outros polímeros, na estabilidade de agregados e ciclagem de nutrientes (Behera et al., 2014).

Segundo Zhang et al. (2018), fungos solubilizadores de fosfato geralmente melhoram o P liberado do solo, o que contribui para a exigência desse elemento das plantas, especialmente em regiões limitantes do mesmo. Em um estudo correlacionando nutrição vegetal com disponibilidade de fósforo, Satyaprakash et al (2017) relatam que micro-organismos solubilizadores de P compreendem um grupo amplo, incluindo tanto bactérias quanto fungos, visto que a comunidade fúngica apresenta uma diversidade e abundância que são expressivas nos solos.

A prevalência dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* em amostras de solo sob efeito de adubação fosfatada é relatada em estudos que correlacionam mecanismos diretamente ligados à capacidade das plantas em adquirirem P da solução do solo. No trabalho de Coutinho et al. (2014) diferenças comportamentais de fungos solubilizadores de P quanto às fontes de carbono apontam *Aspergillus* sp. como maior produtor de biomassa seca e P solúvel. Li et al. (2016) relataram que *Aspergillus niger* apresentou maior capacidade de solubilização de P em comparação com *Penicillium oxalicum*. Gaind (2016) aponta que a presença de *Aspergillus niger* e *Trichoderma harzianum* foi capaz de minimizar o efeito deletério de estresse salino em mudas de trigo ao promover o crescimento das plantas.

Dentre todos os isolados de bactérias e fungos caracterizados macromorfologicamente, houve variabilidade entre os parâmetros avaliados. Estes resultados indicam uma possível diversidade entre os isolados, que será verificada posteriormente pela realização da caracterização molecular dos mesmos por meio do sequenciamento da região 16S e ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do gene do rDNA em trabalhos futuros financiados pela Embrapa Milho e Sorgo.

4. CONCLUSÃO

A caracterização macromorfológica permitiu identificar o fenótipo de cada cepa na coleção de micro-organismos, facilitando o processo de purificação e reativação em novos cultivos e testes.

O tipo de adubação fosfatada em milho influenciou o número de isolados obtidos, dependendo da disponibilidade de P no solo. O maior número de isolados foi mensurado em solo sem adubação fosfatada, seguido dos tratamentos com adição de fosfato natural.

Os resultados indicam o potencial solubilizador e mineralizador dos micro-organismos para uso na cultura do milho a serem selecionados em áreas agrícolas com menor quantidade de P solúvel e sustentam a importância da coleção de micro-organismos, pois um dos focos da mesma é prospecção da biodiversidade, mediante manutenção, conservação e organização do acervo disponível.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, C.S.; FIGUEIREDO, J.E.; OLIVEIRA, C.A.; DOS SANTOS, V.L.; GOMES, E.A.; RIBEIRO, V.P.; BARROS, B.A.; LANA, U.G.; MARRIEL, I.E. Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. *Genetics and Molecular Research*, v.16, n.1, p. 1-13, 2017.

AIRA, M.; GÓMEZ-BRANDÓN, M.; LAZCANO, C.; BAATH, E.; DOMÍNGUEZ, J. Plant Genotype Strongly Modifies the Structure and Growth of Maize Rhizosphere Microbial Communities. *Soil Biology and Biochemistry*, v.42, n.12, p.2276–2281, 2010.

ALORI, E.T.; GLICK, B.R.; BABALOLA, O.O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*, v.8, n.971, p.1-8, 2017.

ANDA. Agência Nacional para difusão de adubos Disponível em: <<http://www.anda.org.br/>> Acesso em 09 de setembro de 2019.

ARRUDA, L.; BENEDUZI, A.; MARTINS, A.; LISBOA, B.; LOPES, C.; BERTOLO, F.; PASSAGLIA, L.M.P.; VARGAS, L.K. Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L) in Rio Grande do Sul State (south Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. *Applied Soil Ecology*, v.63, p.15–22, 2013.

BEHERA, B.C.; SINGDEVSACHAN, S.K.; MISHRA, R.R.; DUTTA, S.K.; THATOI, H.N. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove – a review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v.3, n.2, p.97-110, 2014.

BEHERA, B.C.; YADAV, H.; SINGH, S.K.; MISHRA, R.R.; SETHI, B.K.; DUTTA, S.K.; THATOI, H.N. 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*, v.15, p. 169-178, 2017.

BERRAQUERO, F.R.; BAYA, A.M.; CORMENZANA, A.R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. *Ars Pharmaceutica*, v.17, p.399-406, 1976.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.42, p.225-226, 1939.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant Growth- Promoting Bacteria in the Rhizo-and Endosphere of Plants: Their Role, Colonization, Mechanisms Involved and Prospects for Utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, v.42, n.5, p.669–678, 2010.

COUTINHO, F. P.; SILVA, J.F.D.; SANTANA, I.P.D.; FELIX, W.P.; YANO-MELO, A.M. Solubilização de fosfatos in vitro por *Aspergillus brasiliensis* Varga, Frisvad & Samson na presença de fontes de carbono. *Hoehnea*, v.41, n.2, p.277-282, 2014.

DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. *Compendium of soil fungi*. Volume 1, London: Academic Press, 87p, 1980.

GAIND, S. Phosphate dissolving fungi: Mechanism and application in alleviation of salt stress in wheat. *Microbiological Research*, v.193, p.94-102, 2016.

GOMES, E.A.; OLIVEIRA, C.A.; LANA, U.G.P.; NODA, R.W.; MARRIEL, I.E.; SOUZA, F.A. Arbuscular Mycorrhizal Fungal Communities in the Roots of Maize Lines Contrasting for Al Tolerance Grown in Limed and Non-Limed Brazilian Oxisoil. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.25, n.7, p.978–87, 2015.

HINSINGER, P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil*, v. 237, p.173-195, 2001.

HUNGRIA, M.; SILVA, K. *Manual de curadores de germoplasma – Micro-organismos: rizóbios e bactérias promotoras do crescimento vegetal*. Documentos 332 e 333, 20 p. Embrapa Soja e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, 2011.

JOHNSTON-MONJE, D.; LUNDBERG, D.S.; LAZAROVITS, G.; REIS, V.M.; RAIZADA, M.N. Bacterial Populations in Juvenile Maize Rhizospheres Originate from Both Seed and Soil. *Plant and Soil*, v.405, p.337-355, 2016.

KLIEMANN, H.J.; LIMA, D.V. Eficiência agronômica de fosfatos naturais e sua influência no fósforo disponível em dois solos de Cerrado. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v.31, n.2, p.111-119, 2001.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. *Tratado de Micologia Médica*. Prefácio: Bertrand Dupont. 9. edição. São Paulo: Sarvier, 1104p., 2002.

LI, X. Z.; RUI, J. P.; MAO, Y. J.; YANNARELL, A.; MACKIE, R. Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar. *Soil Biology and Biochemistry*, v.68, p.392–401, 2014.

LI, Z.; BAI, T.; DAI, L.; WANG, F.; TAO, J.; MENG, S.; HU, Y.; WANG, S.; HU, S. A study of organic acid production in contrasts between two phosphate solubilizing fungi: *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger*. *Scientific reports*, v.6, p.1-8, 2016.

LIU, Y.; ZUO, S.; XU, L.; ZOU, Y.; SONG, W. Study on Diversity of Endophytic Bacterial Communities in Seeds of Hybrid Maize and Their Parental Lines. *Archives of Microbiology*, v.194, n.12, p.1001–1012, 2012.

LIU, Y.; ZUO, S.; ZOU, Y.; WANG, J.; SONG, W. Investigation on diversity and population succession dynamics of endophytic bacteria from seeds of maize (*Zea mays* L., Nongda108) at different growth stages. *Annals of Microbiology*, v.63, n.1, p.71-79, 2013.

MAPA. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento - Assessoria de gestão estratégica. *Brasil projeções do agronegócio 2011/2012 a 2021/2022*. Resumo executivo, Brasília, 2019.

MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.; RENGELET, Z. Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis e model and research methods. *Soil Biology and Biochemistry*, v.43, p.883-894, 2011.

MIDC. Ministério do desenvolvimento, indústria e comércio exterior. *Balança comercial Brasileira* Novembro/2013. Disponível em: <http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivos/dwnl_1386017020.pdf> Acesso em 08 de dezembro de 2019.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2 edição, Atual e ampl. Lavras: Editora UFLA, 729p, 2006.

NAUTIYAL, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, v.170, n.1, p. 265-270, 1999.

OLIVEIRA, C.A.; ALVES, V.M.; MARRIEL, I.E.; GOMES, E.A.; MUZZI, M.R.S.; CARNEIRO, N.P.; GUIMARAES, C.T.; SCHAFFERT, R.E; SÁ, N.M.H. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biology and Biochemistry*, v.41, n.9, p.1782–1787, 2009.

PEIFFER, J.A.; SPOR, A.; KOREN, O.; JIN, Z.; TRINGE, S.G.; DANGL, J.L.; BUCKLER, E.S.; LEY, R.E. Diversity and Heritability of the Maize Rhizosphere Microbiome under Field Conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.110, n.16, p.6548–6553, 2013.

PÉREZ-MONTAÑO, F.; ALÍAS-VILLEGAS, C.; BELLOGÍN, R.A.; CERRO, P. del.; ESPUNY, M.R.; JIMÉNEZ-GUERRERO, I.; LÓPEZ-BAENA, F.J.; OLLERO, F.J.; CUBO, T. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*, v.169, n.5-6, p.325-336, 2014.

RICHARDSON, A.E.; HADOBAS, P.A. Soil isolates of *Pseudomonas* spp. that utilize inositol phosphates. *Canadian Journal of Microbiology*, v.43, n.6, p.509- 516, 1997.

SATYAPRAKASH, M.; NIKITHA, T.; REDDI, E. U. B.; SADHANA, B.; VANI, S. S. Phosphorous and phosphate solubilising bacteria and their role in plant nutrition. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v.6, n.4, p.2133-2144, 2017.

SMYTH, E. *Selection and analysis of bacteria on the basis of their ability to promote plant development and growth*. 2011. Tese de Doutorado – University College Dublin, Dublin – Irlanda.

SOUCHIE, E.L.; ÁZCON, R.; BAREA, J.M.; SAGGIN-JUNIOR, O.J.; SILVA, E.M.R. Solubilização de fosfatos em meio sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.40, n.11, p.1149-1152, 2005.

SOUZA, C.A. *Solubilização de fósforo por bactérias endofíticas*. 2010. 38 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife - PE.

VANCE, C.P.; UHDE, S.C.; ALLAN, D.L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*, v.157, p.423-447, 2003.

WHITELAW, M.A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*, New York, v. 69, p. 99-151, 1999.

ZHANG, Y.; CHEN, F-S.; WU, X-Q.; LUAN, F-G.; ZHANG, L-P.; FANG, X-M.; WAN, S-Z.; HU, X-F.; YE, J-R. 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*, v.13, n.7, p.1-14, 2018.

CAPÍTULO II

**EFEITO DA INOCULAÇÃO DE ISOLADOS DE MICRO-ORGANISMOS
SOLUBILIZADORES DE FOSFATO SOBRE A ATIVIDADE MICROBIANA DO
SOLO EM RELAÇÃO À CICLAGEM DE FÓSFORO**

RESUMO

Bactérias ambientais se associam com raízes de plantas e transformam fósforo orgânico (Po) em fósforo inorgânico (Pi), presente no solo através da secreção de enzimas extracelulares denominadas fosfatases. Em geral, as plantas são incapazes de assimilar fontes de Po diretamente do solo e, para tanto, as fosfatases realizam a mineralização do Po, que é a forma predominante deste elemento nos solos. Este trabalho objetivou avaliar a dinâmica da atividade das enzimas fosfatases ácida e alcalina de solo rizosférico de milho cultivado em diferentes manejos de adubação fosfatada para seleção de bactérias potencialmente eficientes na biossolubilização de P. O experimento foi conduzido na Embrapa Milho e Sorgo distribuído em delineamento de blocos casualizados, com três repetições, esquema de parcela subdividida, com quatro estirpes e três tipos de adubação distribuídos em faixas: Super Fosfato Triplo (SFT), Fosfato de Araxá (FA), uma mistura da metade da dose com SFT e outra metade com Fosfato de Araxá (STFA) e controle sem fósforo (P0). Os inoculantes foram constituídos de bactérias rizosféricas e endofíticas de milho (B70L, B119, B2084, B2082). O solo rizosférico foi coletado no estágio de floração do milho, com 5 plantas em cada parcela. A atividade biológica de P no solo foi mensurada pela determinação das fosfatases ácida e alcalina. Os resultados mostraram a ocorrência de diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos com adubação e tipos de inoculantes. Independente do tipo de inoculante, a maior atividade de ambas as fosfatases ocorreu no tratamento sem adubação. Nos tratamentos inoculados com a cepa B70L, independente do tipo de adubação, ocorreram os maiores valores das enzimas fosfatases, indicando que esta cepa estimulou a atividade biológica do solo relacionada à ciclagem de P. As bactérias deste estudo são potencialmente úteis para agregar valor fertilizante aos fosfatos de baixa solubilidade, visando a utilização destes como fonte de P na agricultura.

Termos de indexação: fósforo, bactérias rizosféricas, fosfato de rocha, *Zea mays* L.

ABSTRACT

Environmental bacteria associate with plant roots and transform organic phosphorus (Po) in inorganic phosphorus (Pi), present in the soil through the secretion of extracellular enzymes called phosphatases. In general, plants are unable to assimilate Po sources directly from the soil, and phosphatases do Po mineralization, which is the predominant form of Po in soil. The objective of this work was to evaluate the activity dynamics of the acid and alkaline phosphatase enzymes of rhizospheric soil of corn cultivated in different phosphate fertilization management for selection of potentially efficient bacteria in P. biosolubilization. randomized blocks, with three replications, split plot scheme, with four strains and three types of fertilization distributed in bands: Triple Super Phosphate (TSP), Araxá Phosphate (PA), a mixture of half the dose with TSP and the other half with Araxá Phosphate (STFA) and control without phosphorus (P0). The inoculants were rhizospheric and endophytic bacteria from maize (B70L, B119, B2084, B2082). Rhizospheric soil was collected at the flowering stage of maize, with 5 plants in each plot. The biological activity of P in the soil was measured by the determination of acid and alkaline phosphatases. The results showed the occurrence of significant difference ($p \leq 0,05$) between the treatments with fertilization and types of inoculants. Regardless of the type of inoculant, the highest activity of both phosphatases occurred in the treatment without fertilization. In treatments inoculated with strain B70L, regardless of the type of fertilization, the highest values of phosphatase enzymes occurred, indicating that this strain stimulated soil biological activity related to P cycling. The bacteria in this study are potentially useful for adding fertilizer value to phosphates of low solubility, aiming at their use as a source of P in agriculture.

Keywords: phosphorus, rhizospheric bacteria, rock phosphate, *Zea mays* L.

1. INTRODUÇÃO

Os solos da região do Cerrado apresentam baixa disponibilidade de fósforo (P), sendo imprescindível a adição deste nutriente para o desenvolvimento favorável das plantas para a produção de alimentos, fibras e carne e de culturas como o milho (Sousa et al., 2010). A baixa disponibilidade de P nesses solos ocorre devido à reação ácida a moderadamente ácida de óxidos de ferro e alumínio que apresentam-se preferencialmente com cargas positivas, possibilitando a retenção em sua superfície de vários tipos de ânions, como os íons fosfatos.

Na região do Cerrado, para garantir a resposta das culturas ao P é necessária adubação de correção para elevar o nível de disponibilidade deste elemento a valores aceitáveis antes da implantação dos sistemas produtivos. A adubação de manutenção é importante para manter o nível adequado de P ao longo das safras agrícolas, visando repor o que foi retirado por ocasião das colheitas (Sousa & Lobato, 2004). Contudo, a construção da fertilidade do solo e sua manutenção ao longo de vários plantios/safras é relatado como ineficiente em função da capacidade dreno do solo ser muito maior que a das plantas cultivadas, principalmente nesses solos intemperizados (Novais et al., 2007), como os de Cerrado.

Neste contexto, temos a matéria orgânica do solo como reservatório de nutrientes constituída basicamente por carbono (C), hidrogênio (H), oxigênio (O), nitrogênio (N), enxofre (S) e fósforo (P). Essa matéria orgânica é considerada como componente principal de fertilidade do solo, desempenhando papel fundamental na capacidade de troca catiônica (CTC) e fornecimento de nutrientes (Bayer e Mielniczuk, 2008). Esse reservatório pode ser afetado, dentre outros fatores, pela quantidade e qualidade dos resíduos aportados e pela atividade microbiana e suas enzimas, que controlam a decomposição de resíduos e o acúmulo e liberação de nutrientes através dos processos de imobilização e mineralização, funcionando como fonte e dreno destes compostos (Singh et al., 1989).

As enzimas presentes no solo podem ser produzidas, em geral, por micro-organismos, via intra e extracelulares, por catálise de reações que biodisponibilizam nutrientes no solo beneficiando as plantas e os micro-organismos (Moreira e Siqueira, 2006). As enzimas do solo sulfatases, ureases, desidrogenases e, especialmente, as fosfatases, estão associadas aos ciclos biogeoquímicos do C, N, P e S. As fosfatases ácida e alcalina disponibilizam P para as plantas. São classificadas em ácidas ou alcalinas, de acordo com a atividade ótima de pH

ácido (6,5) e alcalino (11) (Tabatabai, 1969), sendo respectivamente produzidas tanto por micro-organismos quanto por plantas e outros organismos edáficos (pertencente ou relativo ao solo) e produzidas basicamente por micro-organismos.

Fosfatases são enzimas que catalisam a hidrólise, tanto de ésteres quanto de anidridos de ácido fosfórico (Schmidt et al., 1961). De acordo com o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, as fosfatases podem ser classificadas em hidrolases fosfóricas monoéster ou fosfomonoesterases (EC 3.1.3), hidrolases fosfóricas diéster ou fofodiesterases (EC 3.1.4), hidrolases trifosfóricas monoéster (EC 3.1.5), enzimas que atuam sobre anidridos fosforil (EC 3.6.1) e enzimas que atuam em ligações P-N (EC 3.9). As fosfomonoesterases podem ser classificadas em ácidas, neutras, alcalinas, fosfoproteínas, fosfatases e fitases.

O P no solo pode ser encontrado sob duas formas, de acordo com o composto em que está ligado: fósforo inorgânico (Pi) e fósforo orgânico (Po). O Pi é composto pelos minerais primários, P adsorvido e pequenas quantidades de P da solução do solo. Além da solubilização do Pi, os micro-organismos podem disponibilizar o fosfato para as plantas a partir da mineralização do Po (MMP – micro-organismos mineralizadores de fósforo). O fosfato inositol (fitato, $C_6H_{18}O_{24}P_6$) é a principal forma de Po encontrada em muitos solos (Turner, 2007; Gerke, 2015) e a mineralização do P retido nessa molécula ocorre mediante a liberação de enzimas fosfatases e fitases (Greiner, 2006), sendo que fosfatases não específicas desfosforilam o P de ligações fosfoéster ou fosfoanidro da matéria orgânica (Rodriguez et al., 2006), disponibilizando o P em formas solúveis (PO_4^-) para as plantas. Como as plantas são incapazes de assimilar fontes de Po diretamente do solo, para tanto, as fosfatases realizam a mineralização do Po, que é a forma predominante de Po nos solos.

No sistema solo-planta, os micro-organismos na rizosfera (área de solo influenciada diretamente pelas raízes das plantas pelo fornecimento de exsudatos que permite manter as populações microbianas) podem aumentar o conteúdo de P pela hidrólise do Po através da ação de enzimas fosfatases, sendo a produção de fosfatases ácidas atribuída à atividade metabólica de raízes e fungos, e de fosfatases alcalinas a fungos e bactérias da rizosfera (Jorquera et al., 2011). O fato de uma fração considerável da microbiota do solo ser capaz de produzir fosfatases extracelulares sugere que esse é um mecanismo importante para a obtenção de P para o seu metabolismo.

Desta forma, este trabalho objetivou avaliar a dinâmica da atividade das enzimas fosfatases ácida e alcalina de solo rizosférico de milho cultivado em diferentes manejos de adubação fosfatada para seleção de bactérias potencialmente eficientes na biossolubilização de P.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de coleta e amostragem

As amostras de solo rizosférico foram coletadas em experimento de campo em que a cultura do milho se apresentava no estágio de floração, cuja plantação foi realizada em Latossolo Vermelho Distrófico, na Embrapa Milho e Sorgo (19°28'S 44°15'W), município de Sete Lagoas-MG, na safra 2015.

As adubações de P utilizadas no plantio foram: Super Fosfato Triplo (ST), Fosfato natural de Araxá (FA) e uma mistura (1:1) de Super Fosfato Triplo (STFA) e Fosfato natural de Araxá (STFA). O plantio sem adição de P foi utilizado como controle. A adubação de plantio foi realizada com aplicação de 300 kg.ha⁻¹, na dose de P de 100 kg P₂O₅ ha⁻¹, exceto no controle sem adubação fosfatada (PO).

O solo rizosférico foi coletado no estágio de floração do milho, com 5 plantas em cada parcela dos tratamentos de adubação para a coleta de amostras de solo de acordo com Oliveira et al. (2009), considerando-se como solo rizosférico o fortemente aderido a raízes centrais e finas. O solo coletado foi homogeneizado, adicionado em sacos plásticos, devidamente identificados, acondicionados em caixas térmicas contendo gelo e transportados para ao Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo, onde foram peneirados em peneiras de 2 mm de abertura da malha e armazenados em câmara fria a ± 4 °C até a execução das análises.

Os inoculantes foram constituídos de bactérias rizosféricas (B70L – *Bacillus* sp e B119 – *Bacillus megaterium*) e endofíticas (B2084 – *Bacillus subtilis*, B2082 *Bacillus subtilis*) de milho.

2.2 Atividade enzimática

A atividade biológica de P no solo foi mensurada pela determinação da atividade enzimática, expressa em µg p-nitrofenol h⁻¹.g⁻¹ realizada pela determinação da atividade das fosfatases ácida e alcalina no solo (Tabatabai, 1994; Freitas et al., 1997). De acordo com Tabatabai (1994) e Freitas et al.(1997), o princípio do método para determinar as fosfatases ácida e alcalina, é baseado na determinação do *p*-nitrofenol produzido após a incubação da amostra de solo com o substrato *p*-nitrophenyl phosphate por 1 hora a 37 °C. Partindo desse

princípio, em tubos de ensaio com 0,5 g de solo foram adicionados: 0,125 mL de Tolueno; 2 mL de solução tampão universal modificado (Modified Universal Buffer-MUB) em pH 6,5 para a fosfatase ácida e pH 11 para a fosfatase alcalina; 0,5 mL *p*-nitrophenyl phosphate 15 mM (diluído no MUB com pH correspondente a enzima desejável), posteriormente agitados em vórtex e incubados a 37 °C por 1 hora.

Após a incubação, na finalidade de paralisar a ação do substrato, as amostras foram colocadas em caixas térmicas com gelo e iniciou-se a extração do *p*-nitrofenol do solo, com a adição de: 0,5 mL de CaCl₂ (0,5 M); 2 mL de NaOH (0,5 M), seguindo com agitação em vórtex e posterior filtragem da suspensão em papel filtro Whatman n° 2. Imediatamente, o filtrado, com típica coloração de amarelo translúcido, foi mensurado em espectrofotômetro em absorvância a 400 nm. Esse processo foi realizado em triplicatas de cada amostra de solo, e para as amostras controles, seguiu-se o mesmo processo descrito, porém, nessas amostras não foi adicionado o solo. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, onde, a partir do mensurado na amostra controle, foram obtidas as leituras das demais amostras, já descontando os valores das leituras dos reagentes.

A concentração de *p*-nitrofenol liberado após reação enzimática foi estimada a partir de uma curva padrão com os níveis de 0; 2,5; 5; 7,5 e 10 µg *p*-nitrofenol.mL⁻¹ (com R₂ ≥ 0,95 na regressão linear) e os resultados foram expressos em µg *p*-nitrofenol g⁻¹ solo seco h⁻¹.

2.3 Análise estatística

Todos os ensaios foram analisados segundo o delineamento inteiramente casualizado com três repetições por amostra em esquema de parcela subdividida. Os resultados de cada ensaio foram submetidos individualmente à análise de variância e, quando ocorreram diferenças significativas pelo teste F ($p \leq 0,05$), os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa Sisvar 5.3 (Ferreira, 2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ocorreu diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos com adubação de P e tipos de inoculantes para a atividade enzimática. A maior atividade de ambas as fosfatases ocorreu no tratamento sem adubação de P, independente do tipo de inoculante (Figura 1). Observou-se que os tratamentos sem adubação diferiram estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) apresentando, em média, maior atividade para a fosfatase ácida.

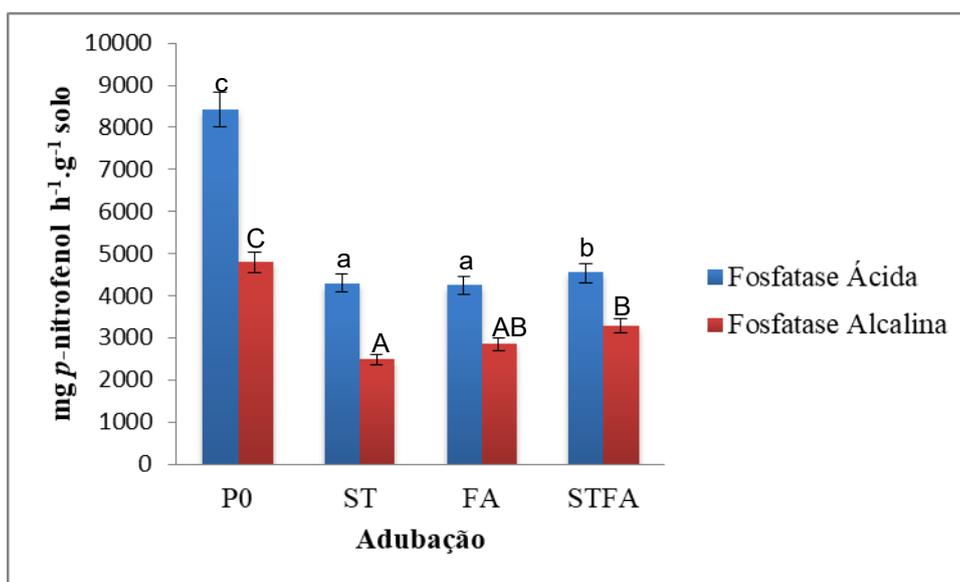


Figura 1 – Atividade enzimática das fosfatases ácida e alcalina para diferentes manejos de adubação fosfatada. Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula e minúscula, em cada tipo de adubação não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. P0: sem adubação fosfatada; ST: Super Fosfato Triplo; FA: Fosfato natural de Araxá; STFA: mistura (1:1) de Super Fosfato Triplo (STFA) e Fosfato natural de Araxá (STFA). Barras verticais indicam o erro padrão da média de três repetições.

A baixa disponibilidade de P e/ou a ausência de adubação pode explicar os resultados obtidos para a atividade enzimática da fosfatase ácida. Gomide et al. (2011), relata a indução de produção desta enzima, pelos micro-organismos, na baixa disponibilidade de P no solo, visto que não há necessidade da célula microbiana gastar energia para assimilá-lo, uma vez que este elemento já está disponível (Wallenstein e Weintraub, 2008). Neste presente trabalho, para a atividade da fosfatase ácida, observou-se maiores valores, em média, com a

inoculação da estirpe B70L (*Bacillus* sp), independente do tipo de adubação fosfatada (Figura 2). A fosfatase ácida possui relevante importância na mineralização do Po do solo, especialmente quando se trata de solos do Cerrado, em que a disponibilidade deste nutriente é restrita. Por estar relacionadas com a degradação de compostos orgânicos do solo, essa enzima sofre influência indireta do carbono e nitrogênio do solo ao estimular a atividade microbiana (Salazar et al., 2011).

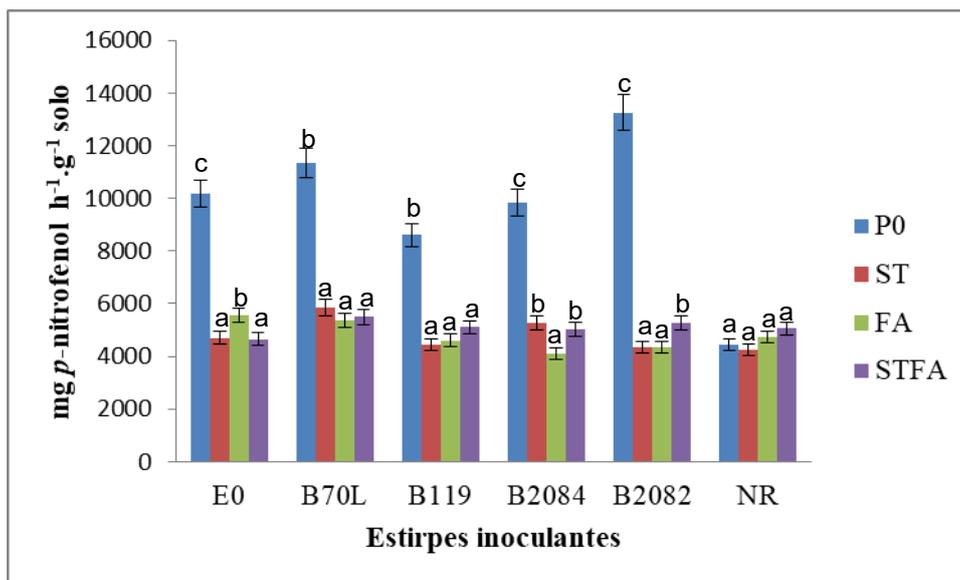


Figura 2 – Atividade enzimática das fosfatases ácida para os diferentes micro-organismos utilizados de acordo com a fonte de adubação. Médias seguidas pela mesma letra em cada tipo de adubação não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. P0: sem adubação fosfatada; ST: Super Fosfato Triplo; FA: Fosfato natural de Araxá; STFA: mistura (1:1) de Super Fosfato Triplo (STFA) e Fosfato natural de Araxá (STFA); NR: solo não rizosférico. E0: sem inoculante. Barras verticais indicam o erro padrão da média de três repetições.

As fosfatases ácidas têm sido comumente encontradas no solo (Melo et al., 2010). Elas desempenham um importante papel na qualidade do solo e na nutrição de plantas uma vez que estão envolvidas na mineralização do P e sua consequente absorção pelas plantas, uma vez que transformam o Po em Pi que é a forma passível de ser absorvida pelas plantas. Dessa forma, desempenham um importante papel na ciclagem de fosfato, pois uma grande proporção do fósforo presente no solo está na forma orgânica e se tornam lábeis após a

mineralização que se dá por meio de hidrólise enzimática, principalmente a ácida. Segundo Giles et al. (2018), as fosfatases são mais encontradas na rizosfera que na solução do solo, explicitando que desempenham um importante papel na nutrição de P para a planta. Pausch et al. (2016) relatam que a rizosfera apresenta características intrínsecas envolvidas na nutrição das plantas e, conseqüentemente, na assimilação de P. Ainda segundo Giles et al. (2018), regiões específicas da zona capilar das raízes (aproximadamente 2 cm da ponta da raiz) são importantes para promover a distribuição de fosfatase derivada de plantas ou via estimulação de micro-organismos, o que destaca a interação raiz-solo.

Hofmann et al. (2016) encontraram efeitos estatisticamente significativos da disponibilidade de P na atividade da fosfatase ácida na rizosfera relacionada à reabsorção de P e atividade da fosfatase do solo como dependente da disponibilidade de fosfato. O aumento da atividade de fosfatases em resposta à deficiência de Pi e a ocorrência de atividade elevada na rizosfera, comparado com o solo livre de raízes, são considerados como evidências do envolvimento destas enzimas na nutrição de plantas (Cabugao et al., 2017). Lisboa et al. (2012) verificaram em seu estudo incremento na atividade da fosfatase ácida sob sistema de plantio direto, quando comparado ao sistema convencional.

Para a atividade da fosfatase alcalina, observou-se maiores valores, em média, com a inoculação da estirpe B2084 – *Bacillus subtilis* (Figura 3).

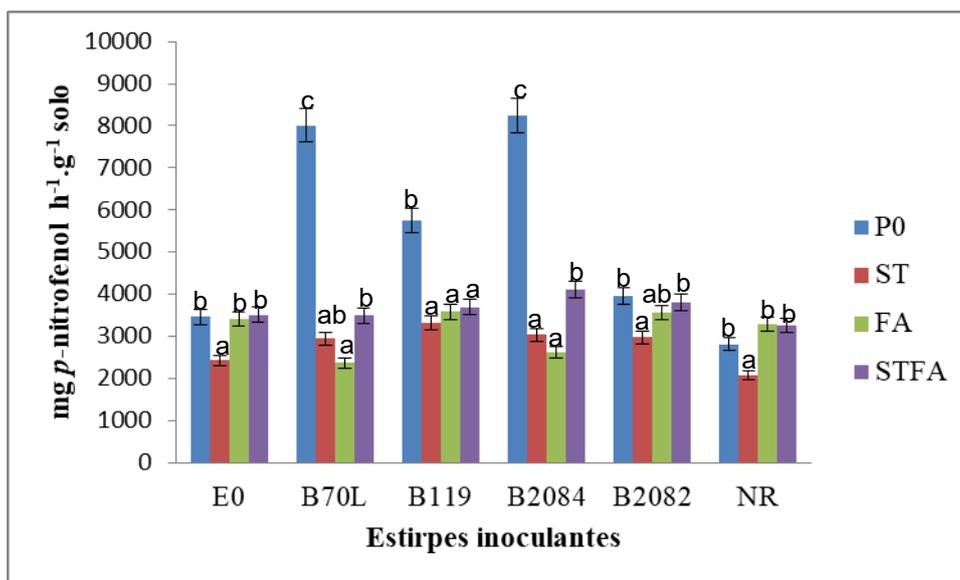


Figura 3 – Atividade enzimática das fosfatases alcalina para os diferentes micro-organismos utilizados de acordo com a fonte de adubação. Médias seguidas pela mesma letra em cada tipo

de adubação não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. P0: sem adubação fosfatada; ST: Super Fosfato Triplo; FA: Fosfato natural de Araxá; STFA: mistura (1:1) de Super Fosfato Triplo (STFA) e Fosfato natural de Araxá (STFA); NR: solo não rizosférico. E0: sem inoculante. Barras verticais indicam o erro padrão da média de três repetições.

As fosfatases alcalinas necessitam da presença de cátions mono e divalentes para a catálise tais como, magnésio, cobalto e manganês (Aoyama et al., 2003). Os microorganismos e as plantas sintetizam as fosfatases ácidas, em contrapartida, as alcalinas são produzidas apenas pela microbiota (Tabatabai, 1994), que é a fonte mais significativa de fosfatases no solo, devido à sua grande biomassa e elevada atividade metabólica, permitindo a síntese e liberação de grandes concentrações de enzimas extracelulares em comparação com os vegetais (Zhang et al., 2018). De acordo com Holz et al. (2019), o conhecimento sobre as comunidades microbianas relativas a traços radiculares específicos ainda é limitado e deve ser amplamente estudado visto que a microbiota do solo é associada à liberação ativa de fosfatases, especialmente as alcalinas, para aumentar a disponibilidade de P (Dalling et al., 2016). Em um estudo de Holz et al. (2019), é relatado alta atividade enzimática de fosfatase alcalina próximo à raiz, o que permite a rápida difusão de exoenzimas e esse aumento da atividade da fosfatase na rizosfera, em comparação com o bulk soil (solo não rizosférico), solo a granel pode ser explicado pela liberação de fosfatase alcalina devido à atividade microbiana na rizosfera.

Os resultados da inoculação de isolados de bactérias solubilizadoras de P sobre a atividade microbiana do solo obtidos neste trabalho apontam que as estirpes B70L e B2084 (*Bacillus subtilis*) estimularam a atividade biológica do solo, relacionada à ciclagem de P, sendo candidatos à formulação de bioinoculantes. Entre as fosfatases do solo, as fosfomonoesterases são as mais comumente estudadas (Liang et al., 2017). Essas enzimas são, em geral, produzidas e secretadas por plantas, bactérias e fungos, tendo como exceção as fosfatases alcalinas que não são produzidas em plantas superiores (Hou et al., 2015). As bactérias são as principais fontes de fosfomonoesterases alcalinas no solo enquanto fosfomonoesterases ácidas e fitases podem derivar de plantas, fungos e bactérias, sendo que os maiores produtores são fungos do gênero *Aspergillus*, *Emmericella* e *Penicillium* (Nannipieri et al., 2011; Behera et al., 2017). Desta forma, a produção de fosfatases ácidas é

atribuída à atividade metabólica de raízes e fungos, e de fosfatases alcalinas a fungos e bactérias da rizosfera (Jorquera et al., 2011). O fato de uma fração considerável da microbiota do solo ser capaz de produzir fosfatases extracelulares sugere que esse é um mecanismo importante para a obtenção de P para o seu metabolismo.

Como grande parcela do P que é aplicado no solo via adubação rapidamente se torna indisponível para as plantas, devido ao fenômeno de complexação com componentes da solução do solo e formação de frações de P_i e P_o , as plantas podem utilizar o P_o de forma mais eficiente quando o solo é enriquecido por fosfatases provenientes da microbiota micorrízica (Katsalirou et al., 2016). Segundo Nahas et al. (1994), fosfatases liberadas pelas raízes de plantas e micro-organismos catalisam a conversão da forma orgânica de fosfato em P solúvel. Para Yadav e Tarafdar (2003), *Aspergillus niger* foi capaz de produzir e liberar elevada quantidade de fosfatase ácida. Além disso, Hidayat et al. (2006) relatam que a secreção de enzimas extracelulares por fungos está diretamente relacionada à extensão e crescimento de hifas.

Uma forma alternativa de mecanismo para solubilização de P é a utilização de rochas fosfáticas como insumo estratégico em muitos países (Mechri et al., 2014). Porém, a utilização de fosfato de rocha como fonte de fertilizante não disponibiliza o P prontamente para as plantas em solos com condições de pH maiores que 5,5 e 6,0 e, mesmo em condições ótimas, os rendimentos são inferiores quando comparados com a utilização de fontes solúveis de P (Mechri et al., 2014). Isso se deve ao fato de grande parte do fosfato de rocha aplicado no solo ser rapidamente imobilizado e tornar-se indisponível para as plantas.

A utilização de inoculantes microbianos como biofertilizante é atualmente considerado uma alternativa viável, tanto para melhorar a eficácia dos fertilizantes quanto para reduzir a dose de fertilizante (Khan et al., 2010). Vários autores têm utilizado esta abordagem biotecnológica para aumentar a eficácia dos fertilizantes de P_i (Vassilev et al., 2014). Estratégias têm buscado a utilização de micro-organismos potencialmente capazes de solubilizarem fosfato natural e incrementar a disponibilidade deste nutriente a partir de distintos tipos desses compostos de baixa solubilidade (Gomes et al., 2014; Mechri et al., 2014), reduzindo os custos e perdas energéticas para a utilização agrônômica dos mesmos (Mohammadi, 2012).

No presente trabalho, a associação entre o Fosfato natural de Araxá com o Super Fosfato Triplo apresentou os maiores resultados para a atividade enzimática de fosfatase

alcalina na presença de inoculação pelo inoculante B2084 (*Bacillus subtilis*). Estudos têm demonstrado a potencialidade de rochas fosfáticas serem utilizadas como biofertilizantes em associação com microrganismos solubilizadores de fósforo. Yadav et al. (2011) concluíram que a utilização de hidroxiapatita em ensaio de solubilização por *Brevibacillus* sp. proporcionou os melhores valores de liberação de P quando comparado a outras fontes de fosfato. Kureka et al. (2013) relataram que a associação entre hidroxiapatita e outras fontes de P promoveram ganhos de eficiência no processo de solubilização por *Pseudomonas luteola*. Koppelaar & Weikard (2013) relataram que *Pseudomonas luteola* em associação com hidroxiapatita promoveu o crescimento de plantas e apresentou potencial para uso como biofertilizante. Gomes et al. (2014), em estudo com micro-organismos isolados de solo rizosférico, relataram que a maioria dessas bactérias foram capazes de solubilizar os fosfatos de Araxá e Itafós.

4. CONCLUSÃO

As estirpes deste estudo são potencialmente úteis para agregar valor fertilizante aos fosfatos de baixa solubilidade.

O efeito positivo do uso de inoculantes na atividade enzimática mostrou-se dependente do tipo de adubação fosfatada.

As estirpes B70L (*Bacillus* sp) e B2084 (*Bacillus subtilis*) estimularam a atividade biológica do solo, relacionada à ciclagem de fósforo, sendo candidatas à formulação de bioinoculantes.

A atividade enzimática para ambas as fosfatases obtidas neste estudo demonstram que em solos intemperizados, como os de Cerrado, o suprimento de fósforo pode ser fornecido pela atividade da microbiota do solo e/ou pela rizosfera das plantas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOYAMA, H.; SILVA, T.M.A.; MIRANDA, A.; FERREIRA, C.V. Proteínas tirosinas fosfatases: propriedades e funções biológicas. *Química Nova*, v.26, p.896-900, 2003.

BAYER, C.; MIELNICSUK, J. Fundamentos da matéria orgânica do solo. In: SANTOS, G.A.; SILVA, L. S.; CANELLAS, L. P.; CAMARGO, F. A. O. *Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais*. 2ª. edição, Porto Alegre: Metrópole, p. 7-18, 2008.

BEHERA, B.C.; YADAV, H.; SINGH, S.K.; MISHRA, R.R.; SETHI, B.K.; DUTTA, S.K.; THATOI, H.N. 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*, v.15, p. 169-178, 2017.

CABUGAO, K.G.; TIMM, C.M.; CARRELL, A.A.; CHILDS, J.; LU, T.Y.S.; PELLETIER, D.A.; WESTON, D.J.; NORBY, R. J. Root and rhizosphere bacterial phosphatase activity varies with tree species and soil phosphorus availability in Puerto Rico tropical forest. *Frontiers in Plant Science*, v.8, n.1834, p. 1-14, 2017.

DALLING, J. W.; HEINEMAN, K.; LOPEZ, O. R.; WRIGHT, S. J.; TURNER, B. L. Nutrient availability in tropical rain forests: the paradigm of phosphorus limitation. *Tropical tree physiology*, p. 261-273, 2016.

FERREIRA, D.F. *SISVAR – Sistema de análise de variância*. Versão 5.3, Lavras – MG, Universidade de Lavras, UFLA, 2010.

FREITAS, J.R.; BANERJEE, M.R.; GERMIDA, J.J. Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biology and Fertility of Soils*, v.24, n.4, p. 358-364, 1997.

GERKE, J. Phytate (inositol hexakisphosphate) in soil and phosphate acquisition from inositol phosphates by higher plants. A review. *Plants*, v.4, n.2, p.253-266, 2015.

GILES, C.D.; DUPUY, L.; BOITT, G.; BROWN, L.K.; CONDRON, L.M.; DARCH, T.; BLACKWELL, M.S.A.; MENEZES-BLACKBURN, D.; SHAND, C.A.; STUTTER, M.I.; LUMSDON, D.G.; WENDLER, R.; COOPER, P.; WEARING, C.; ZHANG, H.

- HAYGARTH, P.M.; GEORGE, T.S. Root development impacts on the distribution of phosphatase activity: Improvements in quantification using soil zymography. *Soil Biology and Biochemistry*, v.116, p.158-166, 2018.
- GOMES, E.A.; SILVA, U.C.; MARRIEL, I.E.; OLIVEIRA, C.A.; LANA, U.G.P. Rock phosphate solubilizing microorganisms isolated from maize rhizosphere soil. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.13, p.69-81, 2014.
- GOMIDE, P. H. O.; SILVA, M. L. N.; SOARES, C. R. F. S. Atributos físicos, químicos e biológicos do solo em ambientes de voçorocas no município de Lavras-MG. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.35, p.567-577, 2011.
- GREINER, R. Phytate-degrading enzymes: regulation of synthesis in microorganisms and plants. In: Turner, B.L.; Richardson, A.E.; Mullaney, E.J. (eds) *Inositol phosphates: linking agriculture and environment*. CAB International, London, p. 78-96, 2006.
- HIDAYAT, B.J.; ERIKSEN, N.T.; WIEBE, M.G. Acid phosphatase production by *Aspergillus niger* N402A in continuous flow culture. *FEMS Microbiology Letters*, v.254, p.324-331, 2006.
- HOFMANN, K.; HEUCK, C.; SPOHN, M. 2016. Phosphorus resorption by young beech trees and soil phosphatase activity as dependent on phosphorus availability. *Oecologia*, v.181, n.2, p. 369-379, 2016.
- HOLZ, M.; ZAREBANADKOUKI, M.; CARMINATI, A.; HOVIND, J.; KAESTNER, A.; SPOHN, M. Increased water retention in the rhizosphere allows for high phosphatase activity in drying soil. *Plant and Soil*, v.443, n.1-2, p.259-271, 2019
- HOU, E.; CHEN, C.; WEN, D.; LIU, X. Phosphatase activity in relation to key litter and soil properties in mature subtropical forests in China. *Science of the Total Environment*, v.515-516, p.83-91, 2015.
- JORQUERA, M.A.; CROWLEY, D.E.; MARSCHNER, P.; GREINER, R.; FERNÁNDEZ, M.T.; ROMERO, D.; MENEZES-BLACKBURN, D.; DE LA LUZ MORA, M. Identification of b-propeller phytase-encoding genes in culturable *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. from the rhizosphere of pasture plants on volcanic soils. *FEMS Microbiology Ecology*, v.75, n.1, p.163-172, 2011.

KATSALIROU, E.; DENG, S.; GERAKIS, A.; NOFZIGER, D.L. Long-term management effects on soil P, microbial biomass P, and phosphatase activities in prairie soils. *European Journal of Soil Biology*, v.76, p.61-69, 2016.

KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; AHMED, M.; OVES, M.; WANI, P.A. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, v.56, n.1, p.73–98, 2010.

KOPPELAAR, R.H.E.M.; WEIKARD, H.P. Assessing phosphate rock depletion and phosphorus recycling options. *Global Environmental Change*, v.23, p.1454–1466, 2013.

KUREKA, E.; OZIMEK, E.; SOBICSEWSKIB, P.; STOMKA, A.; JAROSZUK, J. Effect of *Pseudomonas luteola* on mobilization of phosphorus and growth of Young apple trees (Ligol)—Pot experiment. *Scientia Horticulturae*, v.164, p.270–276, 2013.

LIANG, X.; JIN, Y.; HE, M.; LIU, Y.; HUA, G.; WANG, S.; TIAN, G. Composition of phosphorus species and phosphatase activities in a paddy soil treated with manure at varying rates. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v.237, p.173-180, 2017.

LISBOA, B. B.; VARGAS, L. K.; SILVEIRA, A. O. da; MARTINS, A. F.; SELBACH, P. A. Indicadores Microbianos de Qualidade do Solo em Diferentes Sistemas de Manejo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.36, p.45-55, 2012.

MECHRI, B.; ATTIA, F.; TEKAYA, M.; CHEHEB, H., HAMMAMI, M. Agronomic application of olive mill wastewaters with rock phosphate increase the 10Me18:0 fatty acid marker of actinomycetes and change rhizosphere microbial functional groups under long-term field conditions. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 70, p.62-65, 2014.

MELO, A.S. O que ganhamos ‘confundindo’ riqueza de espécies e equabilidade em um índice de diversidade? *Biota Neotropical*, Porto Alegre, v.3, p.21-27, 2008.

MOHAMMADI, K. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *Resource and Environment Journal*, v.2, p.80-85, 2012.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2 edição, Atual e ampl. Lavras: Editora UFLA, 729p, 2006.

NAHAS, E.; CENTURION, J.F.; ASSIS, L.C. Microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases de vários solos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.18, p. 43-48, 1994.

NANNIPIERI, P.; GIAGNONI, L.; LANDI, L.; RENELLA, G. Role of Phosphatase Enzymes in Soil. In: Phosphorus in action. *Soil Biology*, v.100, p. 215-243, 2011.

NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J.; NUNES, F.N. Fósforo. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. *Fertilidade do solo*. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.471-537, 2007.

PAUSCH, J.; LOEPPMANN, S.; KÜHNEL, A.; FORBUSH, K.; KUZYAKOV, Y.; CHENG, W. Rhizosphere priming of barley with and without root hairs. *Soil Biology and Biochemistry*, v.100, p.74-82, 2016.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R.; GONZALEZ, T.; BASHAN, Y. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil*, v.287, p.15-21, 2006.

SALAZAR, S.; SANCHEZ, L.E.; ALVAREZ, J.; VALVERDE, A.; GALINDO, P.; IGUAL, J.M.; PEIX, A.; SANTA-REGINA, I. Correlation among soil enzyme activities under different forest system management practices. *Ecological Engineering*, Salamanca, v.37, p. 1123-1131, 2011.

SCHMIDT, G.; LASKOWSKI SR, M. Phosphate ester cleavage (Survey). *The enzymes*, 2nd edn. Academic Press, New York, p.3-35, 1961.

SINGH, J. S.; RAGHUBANSHI, A. S.; SINGH, R, S.; SRIVASTAVA, S. C. Microbial biomass acts as source of plant nutrients in dry tropical forest and savanna. *Nature*, v.338, n.6215, p.499-500, 1989.

SOUSA, D.M.G.; LOBATO, E. *Cerrado: Correção do solo e adubação*. 2ª ed. Planaltina, Embrapa Cerrados, 416p., 2004.

SOUZA, C.A. Solubilização de fósforo por bactérias endofíticas. 2010. 38 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife - PE.

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

TABATABAI, M.A. Soil enzymes. In: Weaver, R.W.; Angle, S.; Bottomley, P.S.; Bezdicek, D.; Smith, S.; Tabatabai, A.; Wollum, A. (ed.) *Methods of Soil Analysis. Part 2: Microbiological and Biochemical Properties*. Inc. Madison: Soil Science Society of America, p.778-833, 1994.

TURNER, B.L.; PAPHÁZY, M.J.; HAYGARTH, P.M.; MCKELVIE, I.D.; Inositol phosphates in the environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, v.357, n.1420, p.449-469, 2007.

VASSILEV, N.; MENDES, G.; COSTA, M.; VASSILEVA, M. Biotechnological Tools for Enhancing Microbial Solubilization of Insoluble Inorganic Phosphates. *Geomicrobiology Journal*, v.31, p.751–763, 2014.

WALLENSTEIN, M. D.; WEINTRAUB, M. N. Emerging tools for measuring and modeling the *in situ* activity of soil extracellular enzymes. *Soil Biology and Biochemistry*, v.40, n.9, p.2098-2106, 2008.

YADAV, R.S.; TARAFDAR, J.C. Phytase and phosphatase producing fungi in arid and semi-arid soils and their efficiency in hydrolyzing different organic p compounds. *Soil Biology and Biochemistry*, v.35, p.1-7, 2003.

YADAV, J.; VERMA, J.P.; TIWARI, K.N. Plant growth promoting activities of fungi and their effect on Chickpea plant growth. *Current microbiology*, v.4, n.3, p.291-299, 2011.

ZHANG, Y.; CHEN, F-S.; WU, X-Q.; LUAN, F-G.; ZHANG, L-P.; FANG, X-M.; WAN, S-Z.; HU, X-F.; YE, J-R. 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*, v.13, n.7, p.1-14, 2018.

CAPÍTULO III

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO DE ROCHA COM POTENCIAL PARA A FORMULAÇÃO DE BIOINOCULANTES DE MILHO

RESUMO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas de maior importância para o agronegócio brasileiro em face do advento do milho safrinha associado a novas técnicas agrícolas e à utilização e incorporação de terras não cultivadas principalmente em regiões de Cerrado e da demanda da agroindústria de rações de aves, suínos e bovinos. Com isso, o aumento de produção nesta cultura gera maior demanda por insumos e torna o agronegócio brasileiro altamente dependente do mercado externo no que se refere, principalmente, à utilização de adubação fosfatada, visto que cerca de 50% deste adubo no Brasil é proveniente de importação. Micro-organismos solubilizadores de fósforo (MSP) estão sendo utilizados como alternativa para otimizar a eficiência na utilização de fósforo (P), principalmente por meio da biossolubilização de rochas fosfáticas e produção de ácidos orgânicos. Neste contexto, o presente trabalho objetivou selecionar e caracterizar micro-organismos rizosféricos de milho solubilizadores de fosfato *in vitro* com potencial para biossolubilização de rochas fosfáticas. Os experimentos foram conduzidos utilizando-se delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições. O material vegetal foi coletado em experimento de campo contendo milho no estágio de floração da safra 2016. Os ensaios de solubilização de P foram realizados em meio NBRIP contendo fosfato de ferro e alumínio, em meio fitato de sódio e no ensaio com solubilização de rocha a fonte de P foi fosfato de Araxá. A produção de ácidos orgânicos foi mensurada por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Todas as estirpes apresentaram eficiência relativa de solubilização *in vitro*. Com relação à produção de ácidos orgânicos pelos MSP, houve diferença estatística segundo o tipo de ácido e a fonte de P.

Palavras-chave: solubilização de fósforo, fosfato de rocha, *Zea mays*.

ABSTRACT

The maize (*Zea mays* L.) is one of the most important crops for Brazilian agribusiness in view of the advent of safrinha corn associated with new agricultural techniques and the use and incorporation of uncultivated land mainly in Cerrad regions and agro-industry demand, poultry, pig and cattle feed. As a result, the increase in production in this crop generates greater demand for inputs and makes Brazilian agribusiness highly dependent on the foreign market, mainly regarding the use of phosphate fertilizer, since about 50% of this fertilizer in Brazil comes from import. Phosphorus solubilizing microorganisms (PSM) are being used as an alternative to optimize phosphorus (P) utilization efficiency, mainly through phosphate rock biosolubilization and organic acid production. In this context, the present work aimed to select and characterize in vitro phosphate solubilizing corn rhizospheric microorganisms with potential for phosphate rock biosolubilization. The experiments were conducted using a completely randomized design with 3 replications. Plant material was collected in a field experiment containing corn at the flowering stage of the 2016 crop. P solubilization assays were performed in NBRIP medium containing iron and aluminum phosphate, sodium phytate medium and in rock solubilization assay. P source was Araxá phosphate. The production of organic acids was measured by HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). All strains showed relative efficiency of in vitro solubilization. Regarding the production of organic acids by PSM, there was a statistical difference according to the type of acid and the source of P.

Termos de indexação: phosphorus, rhizospheric bacteria, rock phosphate, *Zea mays* L.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do milho tem papel importante dentro do cenário agropecuário do Brasil, considerando que a agroindústria de rações de aves, suínos e bovinos é composta basicamente por farelo de milho, tornando-o uma mercadoria estratégica para expansão do agronegócio brasileiro (Abreu, 2014), sendo o grão a principal forma exportada desta cultura (Ministério do desenvolvimento, indústria e comércio exterior, 2019).

Esse incremento na produção do milho ocasiona, conseqüentemente, uma maior demanda por insumos e torna o agronegócio brasileiro altamente dependente do mercado externo no que se refere à utilização de adubação fosfatada, visto que cerca de 50% do adubo fosfatado utilizado no Brasil é proveniente de importação (ANDA, 2018). Neste contexto, para a obtenção de níveis elevados de produtividade nesta cultura, necessita-se de um manejo adequado das práticas culturais e, dentre estas, merece destaque o manejo da nutrição e adubação, com ênfase no fósforo (P) (IPNI, 2018). Nos solos de Cerrado, altas doses de adubos fosfatados têm sido adicionadas por causa das características de elevado intemperismo, mobilidade do P, e grande adsorção por minerais e elementos químicos (Novais & Smith, 1999; Novais et al, 2007).

Dentre as culturas de grãos, o milho é considerado a segunda cultura com maior demanda por P, ficando atrás apenas da cultura da soja (IPNI, 2018). O P é um dos macronutrientes requerido pelos vegetais e o terceiro componente que limita o crescimento das plantas, estando abaixo apenas do nitrogênio e da água, devido a sua importância no metabolismo vegetal e atuação nas funções básicas das células como na formação de biomoléculas de ácidos nucleicos (DNA e RNA) e de fosfolípidos e em processos biológicos, como fotossíntese e respiração (Vance et al., 2003). O fósforo é, portanto, essencial para o crescimento e produtividade das plantas.

A proporção de P inorgânico (composto por minerais primários, P adsorvido e pequenas quantidades de P da solução do solo) adicionado no solo que é reabsorvida na primeira colheita de uma cultura de grãos é bastante baixa, variando de 5 a 10%, ou seja, 90 a 95% do fertilizante fosfatado que foi adicionado no solo é fixado com minerais, como o ferro e alumínio, que liberam lentamente o P para as plantas (Novais e Smith, 1999). Como os solos de Cerrado são caracteristicamente ácidos, possuem baixa fertilidade natural e,

consequentemente, baixa disponibilidade de P (Novais et al., 2007; Marra et al., 2012), mesmo quando há aplicação de adubação fosfatada, devido à adsorção do fosfato e às reações de precipitação com íons de alumínio (Al), ferro (Fe) e cálcio (Ca) presentes na solução do solo, são formados compostos de solubilidade variável, constituindo o fenômeno genericamente denominado fixação de P com componentes do solo (Resende, 2004), o que torna este elemento menos disponível para as plantas (Smyth, 2011).

Para contornar este problema de fixação de P, torna-se necessário a aplicação de alta quantidade de fertilizantes (ANDA, 2018). Somado a isso, essa prática onera os custos de produção, o que se agravou nos últimos anos com o aumento nos preços dos insumos e maior pressão por oferta de alimentos. Além disso, a adubação fosfatada é proveniente de fontes limitadas de rochas apatitas ou fosforitas que envolvem gastos significativos de energia provenientes de fontes não renováveis para seu processamento, transporte e distribuição. Por outro lado, o uso intensivo de fertilizantes fosfatados de alta solubilidade oferece risco de impactos negativos sobre o ambiente, principalmente em ecossistemas aquáticos (Oliveira et al., 2009).

Uma forma alternativa de incremento de fósforo no solo sem uso de fontes solúveis é a utilização de rochas fosfáticas (fosfato natural) como adubo, que tem sido um insumo estratégico para redução de custos e danos ambientais em muitos países (Singh & Reddy, 2011; Mechri et al., 2014). Fosfato de rocha (PR – *Phosphate Rock*) é um termo geral para descrever diferentes tipos de apatitas $[Ca_{10}(PO_4)_6(F,OH,Cl)_2]$ que são utilizadas diretamente como fertilizantes fosfatados de baixa solubilidade ou para a produção de fertilizante químico a partir do fosfato inorgânico (Zapata & Roy, 2007). As apatitas possuem diferentes sítios de substituição como Ca^{2+} por Na^{1+} e Mg^{2+} , PO_4^{3-} por CO_3^{2-} (exemplo $Ca_{10-x-y}Na_xMg_y(PO_4)_6-z(CO_3)_zF_2$) que produzem diferentes tipos de fosfato de rocha (Vassileva et al., 2000; Singh & Reddy, 2011).

A aplicação de fosfato de rocha como fertilizante em ambientes tropicais é vantajosa, especialmente com relação à taxa de dissolução das rochas e a reação entre as superfícies minerais e solução do solo, que são intensificadas com temperatura e umidade presentes nesses ambientes (Van Straaten, 2006). No entanto, a aplicação direta de fosfatos naturais como fertilizante, principalmente para culturas anuais como o milho, não é economicamente viável em solos com alta capacidade de absorção e baixa capacidade de troca iônica como os de Cerrado (Simpson et al., 1997; Oliveira et al., 2009; Gomes et al., 2014), devido a baixa

solubilidade destas rochas. Uma alternativa para aumentar a eficiência de utilização dos fosfatos naturais como insumo agrícola é a sua combinação com a microbiota do solo, com os micro-organismos solubilizadores de fósforo (MSP), capazes de solubilizar o fosfato proveniente destas rochas (Whitelaw 2000; Vassilev & Vassileva, 2003; Goldstein et al., 2003; Stamford et al., 2006; Khan et al., 2010; Singh & Reddy, 2011). Neste caso, a inoculação com MSP, que produzem ácidos orgânicos acelerando a dissolução dos fosfatos de rocha, torna-se uma estratégia biotecnológica viável para aumentar a efetividade dos fertilizantes e/ou para diminuir a dose de fertilizantes solúveis (Liang et al., 2017).

Várias estratégias têm buscado a utilização de micro-organismos potencialmente capazes de solubilizarem fosfato de rocha e incrementar a disponibilidade deste nutriente a partir de distintos tipos desses compostos de baixa solubilidade (Rajapaksha et al., 2011; Gomes et al., 2014, Mechri et al., 2014), reduzindo os custos e perdas energéticas para a utilização agrônômica dos mesmos (Mohammadi, 2012). Dentre essas estratégias, a quantificação de ácidos orgânicos metabolizados por MSP merece destaque devido a variabilidade desses ácidos presentes no processo de solubilização de P: ácidos glucônico, láctico, cítrico, oxálico, succínico, tartárico, entre outros (Goldstein, 2000; Pérez et al., 2007; Mander et al., 2012; Behera et al., 2014; Kaur & Reddy, 2014). Acredita-se que a capacidade de solubilização de P correlaciona-se, principalmente, com o potencial de liberação de ácidos orgânicos pelos micro-organismos (Mendes et al., 2013). MSP, em geral, excretam ácidos orgânicos que dissolvem diretamente o material fosfático e/ou quelam cátions que acompanham o ânion fosfato (Marra et al., 2012).

Diante disto, o objetivo deste trabalho foi selecionar e caracterizar bactérias solubilizadoras de fosfato *in vitro* com potencial para biossolubilização de rochas fosfáticas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de coleta e amostragem

As amostras de solo rizosférico foram coletadas em experimento de campo contendo milho no estágio de floração da safra 2016 proveniente de distintos genótipos de milho plantados em latossolo vermelho distrófico na Embrapa Milho e Sorgo (19°28'S 44°15'W), município de Sete Lagoas-MG.

O solo rizosférico foi coletado no estágio de floração do milho, com 5 plantas em cada parcela dos tratamentos de adubação para a coleta de amostras de solo de acordo com Oliveira et al. (2009), considerando-se como solo rizosférico o fortemente aderido a raízes centrais e finas. O solo coletado foi homogeneizado, adicionado em sacos plásticos, devidamente identificados, acondicionados em caixas térmicas contendo gelo e transportados para ao Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo, onde foram peneirados em peneiras de 2 mm de abertura da malha e armazenados em câmara fria a ± 4 °C até a execução das análises.

2.2 Isolamento de micro-organismos rizosféricos

Um total de 5 g de solo rizosférico foram peneirados, acrescentados a 45 mL de solução salina 0,85% e homogeneizados por 30 minutos. Após homogeneização, uma alíquota de 1 mL foi retirada e procedeu-se às diluições seriadas decimais (10^{-3} a 10^{-5}) para selecionar os micro-organismos e efetuar as contagens em cada tratamento.

2.3 Seleção de micro-organismos rizosféricos

Após o isolamento, 100 μ L de cada diluição seriada foi plaqueada em meio de cultura NBRIP (*National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium*) (Nautiyal, 1999) modificado com adição de fosfato de ferro, fosfato de alumínio, e nos meios de cultura com fosfato de Araxá e Fitato de Sódio (Richardson et al., 2001), contendo, respectivamente, fontes inorgânicas e orgânicas de P. As placas inoculadas foram incubadas a 25 ± 3 °C por até 10 dias, sendo o crescimento dos micro-organismos acompanhado diariamente.

2.4 Eficiência de solubilização de fósforo por microrganismos endofíticos em meio de cultura sólido

Os isolados foram selecionados pelo crescimento e/ou formação de halo transparente indicador de solubilização no meio de cultura e o número total de isolados foram mensurados. Foram realizadas três repetições para cada plaqueamento. No tratamento controle, as placas foram inoculadas com solução salina (0,85%) esterilizada.

O halo de solubilização foi medido pelo seguinte critério: diâmetro total (ϕ halo + ϕ colônia) dividido pelo diâmetro da colônia, considerando-se a média de quatro repetições para cada amostra. O resultado obtido foi expresso pelo Índice de Solubilização por meio da fórmula proposta por Berraquero et al. (1976):

$$IS = \phi \text{ Halo (mm)} / \phi \text{ Colônia (mm)}$$

Para este estudo, foram utilizados 17 isolados selecionados quanto a eficiência de solubilização de fósforo *in vitro* em meio sólido.

2.5 Eficiência de solubilização de fósforo por micro-organismos em meio de cultura líquido

As estirpes isoladas foram crescidas em meio de cultura TSB (*Trypticase Soy Broth*) e incubadas a 30 °C por 3 a 5 dias, sob agitação constante. Após o período de incubação as amostras foram avaliadas em espectrofotômetro a 540 nm para ajuste da densidade ótica (*Optical Density* - DO) de cada isolado e padronização do inóculo a ser utilizado nos testes de solubilização *in vitro*. Após o ajuste da DO, 100 μ L de cada cultura foi adicionado em tubos falcon estéreis contendo 15 mL de meio de cultura NBRIP (Nautiyal, 1999), sendo incubadas a 30 °C sob agitação constante.

Para determinação do fósforo solubilizado foram consideradas três repetições por isolado, no período 3, 6, 9 e 12 dias de incubação. Após cada período de incubação as culturas foram centrifugadas e o sobrenadante filtrado em papel de filtro Whatman n°42 para determinação da concentração de P solúvel e pH em água. Para determinação do P solubilizado em meio de cultura foi utilizado o método colorimétrico de Murphy & Riley (1962), subtraindo-se o P solúvel contido na amostra controle (meio de cultura sem inoculação). Todo o material utilizado nas análises foi descartável, para evitar contaminações

com fósforo livre nas vidrarias e tubos, com exceção dos funis de vidro que foram tratados com ácido clorídrico (10% v/v).



Figura 1 – Material descartável utilizado para análise de fósforo.

2.6 Quantificação de ácidos orgânicos

A quantificação dos ácidos orgânicos acético, butírico, glucônico, láctico e propiônico foi realizada no Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Minas Gerais, por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). As estirpes foram inoculadas em meio líquido NBRIP (*National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium*) (Nautiyal, 1999) modificado com adição de fosfato de ferro, fosfato de alumínio, e nos meios de cultura com fosfato de Araxá e Fitato de Sódio (Richardson et al., 2001) e os sobrenadantes da análise de solubilização de fósforo em meio líquido foram utilizados para a quantificação dos ácidos orgânicos.

A concentração dos ácidos orgânicos foi determinada utilizando um cromatógrafo modelo LC-20A Prominence, Shimadzu (Japão). Foi utilizada coluna SUPELCOGEL C-610H 30 cm x 7,8 mm (Sigma) com pressão de 90 kgf.

A separação ocorreu a 65°C, sendo a fase móvel H₂SO₄ 5mM com um fluxo de 0,6mL.min⁻¹. Foi utilizado detector de índice refrativo RID-10A, com a temperatura da célula do detector a 45°C. A área do pico gerada pelo índice de refração foi calculada para

determinar-se a concentração de cada ácido orgânico.

2.7 Análise estatística

Todos os ensaios foram analisados segundo o delineamento inteiramente casualizado com três repetições por amostra em esquema de parcela subdividida. Os resultados de cada ensaio foram submetidos individualmente à análise de variância e, quando ocorreram diferenças significativas pelo teste F ($p \leq 0,05$), os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade utilizando o programa Sisvar 5.3 (Ferreira, 2010). Para as análises de correlação de Pearson foi utilizado o programa R (R Development Core Team 2011).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para se determinar o período de incubação necessário para a quantificação do P a ser solubilizado pelos micro-organismos, foram realizados ensaios com 3, 6, 9 e 12 dias de incubação. Desta forma, a taxa de solubilização foi expressa como sendo o somatório do valor absoluto de P solubilizado pelos micro-organismos durante 9 dias de incubação. A comparação entre os valores obtidos de P demonstram que aos 9 dias de incubação a maioria dos isolados apresentou, em média, maiores valores absolutos de P solubilizado.

Isso indica que, para este estudo, é recomendado que a incubação das amostras ocorra até o 9º dia, o que viabiliza os ensaios do ponto de vista de tempo e economia, pois no término do 9º dia de incubação a diferença nos valores de P foi pequena quando comparada ao 12º dia.

Outro fator que corrobora para esta recomendação é que a redução do P solubilizado do 6º para o 9º dia de incubação pode ser decorrente do maior consumo de P pelas estirpes que, possivelmente, atingiram a população máxima suportada no meio de cultura (Sousa, 2010), incorporando à biomassa microbiana boa parte do P que foi solubilizado, associado a mecanismos de reimplantação do P solubilizado.

De acordo com os resultados da biossolubilização, observou-se diferença significativa ($p \leq 0,05$) para os isolados em todas as fontes de P utilizadas neste trabalho (Tabela 1). Os valores de pH em água de cada amostra foram mensurados antes de se proceder a quantificação de P e observou-se redução significativa ($p \leq 0,05$) entre os isolados testados (Tabela 1). Foi observada uma correlação de Pearson negativa de -0,27 ($p > 0,05$) entre a eficiência solubilizadora de fosfato de Araxá dos isolados em meio líquido e a acidificação do meio. Para o fosfato de ferro foi observada uma correlação de Pearson de 0,48 ($p \leq 0,05$), para o fitato de sódio foi observada uma correlação de Pearson negativa de -0,56 ($p \leq 0,05$), para o fosfato de alumínio não foi correlação entre a eficiência solubilizadora e o pH do meio.

A acidificação do meio pela produção de ácidos orgânicos ou pela liberação de íons H^+ são mecanismos relatados como responsáveis pela disponibilização do P a partir de fontes insolúveis, como os fosfatos de rocha (Mendes et al., 2013; Silva et al., 2014; Mendes et al., 2013; Vassilev et al., 2013 ; Johnston-Monje et al., 2016). Em geral, é observado que para alguns isolados a acidificação do meio pode ser a

etapa inicial do processo de solubilização o que, no decorrer do tempo, pode ser maximizado ou até mesmo permanecer estável de acordo com as características de cada micro-organismo.

Esses resultados demonstram que a maioria dos micro-organismos em estudo possuem potencial solubilizador e podem ser utilizados para formulação de bioinoculantes em substituição e/ou associação à adubação química.

Tabela 1 – Biossolubilização de fósforo por bactérias rizosféricas de milho cultivadas em meio líquido contendo fontes inorgânicas (ferro e alumínio) e orgânicas (fosfato natural de rocha Araxá e Fitato de Sódio) como fontes exclusivas de fósforo. Valores em mg.L⁻¹ de fósforo solubilizado, da média de três repetições por amostra, após 9 dias de incubação.

Isolado	Araxá ¹		P-Fe ²		P-Al ³		Fitato ⁴	
	P ⁶	pH ⁷	P ⁶	pH ⁷	P ⁶	pH ⁷	P ⁶	pH ⁷
C ⁵	0,01 l	4,44 a	0,07 d	4,13 c	0,03 h	4,18 b	0 h	4,27 a
2050	19,20 i	4,18 b	22,46 c	3,74 d	5,13 e	3,42 e	10,53 f	4,10 a
2237	98,13 b	4,10 b	20,36 c	4,05 c	3,71 f	3,89 d	0 h	4,03 b
2247	73,79 d	3,89 c	14,30 c	3,85 d	8,86 b	3,89 d	19,75 d	4,24 a
2257	29,60 h	3,41 e	41,82 a	3,87 d	0 h	4,21 b	0 h	3,76 c
2268	45,34 g	3,89 c	37,11 b	4,08 c	6,81 d	3,94 c	4,80 g	3,89 c
2272	65,74 e	3,77 d	7,32 d	3,62 e	1,20 g	3,73 d	30,42 b	3,16 e
2273	53 f	4,20 b	28 b	3,16 g	5,36 e	4,04 c	13,42 e	3,81 c
2286	81,68 c	3,81 d	20,64 c	3,81 d	6,93 d	2,37 h	48,08 a	3,23 e
2293	114,22 a	3,24 e	28,51 b	3,23 f	0 h	3,82 d	21,38 d	4 b
2296	114,61 a	3,30 e	3,96 d	3,07 g	8,25 c	4,24 b	0 h	3,91 c
2326	95,60 b	3,41 e	33,96 b	4,21 b	9 b	4 c	23,38 c	3,99 b
2332	28,72 h	4,21 b	35,56 b	4,55 a	0 h	4,54 a	4,91 g	4,19 a
2337	77,69 d	4,54 a	3,10 d	3,82 d	9,92 a	4 c	9,38 f	3,65 d
2338	43,48 g	3,43 e	52,65 a	4,05 c	6,85 c	3,16 f	0,76 h	3,83 c
2342	75,42 d	4,10 b	43,44 a	4,20 b	8,44 c	3,81 d	22,88 c	3,89 c
2372	13,30 j	3,75 d	10,75 d	3,17 g	0,23 h	3,23 f	0 h	3,99 b
2395	10,20 k	3,82 d	32,54 b	3,31 f	0,27 h	3,10 g	14,66 e	3,61 d

Médias seguidas de mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ¹Fosfato natural de Araxá. ²Fosfato de ferro. ³Fosfato de alumínio. ⁴Fitato de Sódio. ⁵Meio de cultura sem inoculação de micro-organismos. ⁶Valor de solubilização de fósforo (mg.L⁻¹) de acordo com as fontes Araxá, ferro, alumínio e fitato de sódio aos 9 dias de incubação. ⁷pH em água mensurados aos 9 dias de incubação.

Os tratamentos com adição de fosfato de Araxá apresentaram, em média, melhor eficiência solubilizadora em comparação com as demais fontes de fosfato utilizadas neste trabalho (Figura 2). Os isolados 2296 e 2293 apresentaram, em média, maior solubilização no meio de cultura com o P-Araxá como fonte exclusiva de fósforo e tal fato sugere que a solubilização de fosfato de rocha por MSP depende da composição química de cada tipo de rocha, ou seja, sugere que a composição mineral interfere diretamente na labilidade da fonte de fosfato.

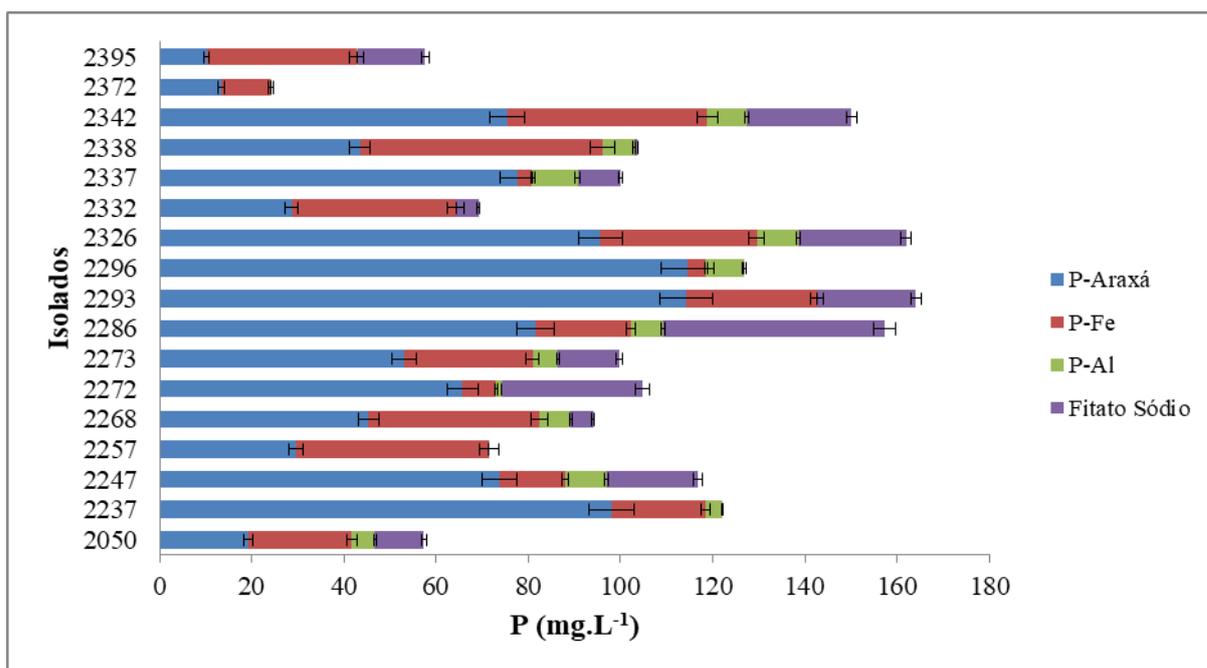


Figura2 – Potencial de solubilização de fósforo por isolados bacterianos de solo rizosférico de milho. Barras horizontais indicam o erro padrão da média de três repetições. P-Araxá: fosfato de Araxá. P-Fe: fosfato de ferro. P-Al: fosfato de alumínio.

Estudos têm demonstrado a potencialidade de rochas fosfáticas serem utilizadas como biofertilizantes em associação com micro-organismos solubilizadores de P. Yadav et al. (2013) concluíram que a utilização de hidroxiapatita em ensaio de solubilização por *Brevibacillus* sp proporcionou os melhores valores de liberação de P quando comparado a outras fontes de fosfato. Kureka et al. (2013) relataram que a associação entre hidroxiapatita e outras fontes de P promoveram ganhos de eficiência no processo de solubilização por *Pseudomonas luteola*. Koppelaar & Weikard (2013) relataram que *Pseudomonas luteola* em associação com hidroxiapatita promoveu o crescimento de plantas e apresentou potencial para uso como biofertilizante. Gomes et al. (2014), em estudo com micro-organismos isolados de solo rizosférico, relataram que a maioria dessas bactérias foram capazes de solubilizar os

fosfatos de Araxá e Itafós. Holz et al. (2019) relatam que uma forma alternativa de incremento de P no solo sem uso de fontes solúveis é a utilização de rochas fosfáticas (fosfato natural) como adubo e que tal prática tem sido um insumo estratégico para redução de custos e danos ambientais em muitos países.

Fosfato de rocha (PR) é um termo geral que descreve diferentes tipos de apatitas $[Ca_{10}(PO_4)_6(F,OH,Cl)_2]$ que são utilizadas diretamente como fertilizantes fosfatados de baixa solubilidade ou para a produção de fertilizante químico a partir do fosfato inorgânico (Zapata & Roy, 2007). As apatitas possuem diferentes sítios de substituição como Ca^{2+} por Na^{1+} e Mg^{2+} , PO_4^{3-} por CO_3^{2-} (exemplo $Ca_{10-x-y}Na_xMg_y(PO_4)_{6-z}(CO_3)_zF_2$) que produzem diferentes tipos de fosfato de rocha (Vassileva et al., 2000; Singh & Reddy, 2011).

De acordo com a figura 2 observa-se que a eficiência solubilizadora de fosfato de ferro, fitato e fosfato de alumínio seguiram, em média, esta ordem crescente quanto à taxa de P solubilizado pelos isolados. Esses resultados corroboram para a justificativa da aplicação de fosfato de rocha como fertilizante em ambientes tropicais, especialmente com relação à taxa de dissolução das rochas e a reação entre as superfícies minerais e solução do solo, que são intensificadas com temperatura e umidade presentes nesses ambientes (Manzoor et al., 2017).

Devido à baixa concentração do P na solução do solo, este deve ser continuamente ressuprido pela fase sólida do solo para promover a nutrição vegetal. O P liberado via adubação fosfatada passa para a solução do solo e, em seguida, para a fase sólida em que é convertido inicialmente em P lábil (P prontamente disponível). Com o tempo, esse P passa para formas não lábeis (Raij, 2004; Resende, 2004) que não são passíveis de aproveitamento imediato pelas plantas.

No entanto, a aplicação direta de fosfatos naturais como fertilizante, principalmente para culturas anuais como o milho, não é economicamente viável em solos com alta capacidade de absorção e baixa capacidade de troca iônica como os de Cerrado (Simpson et al., 1997; Oliveira et al., 2009; Gomes et al., 2014), devido a baixa solubilidade destas rochas. Uma alternativa para aumentar a eficiência de utilização dos fosfatos naturais como insumo agrícola é a sua combinação com a microbiota do solo capaz de solubilizar o fosfato proveniente destas rochas, como os MSP (Singh & Reddy, 2011; Satyaprakash et al., 2017).

A análise cromatográfica para determinação de ácidos orgânicos produzidos por MSP foi realizada considerando-se o tempo de incubação de 9 dias, pois nesse período observou-se que a maioria dos isolados apresentaram, em média, maiores valores absolutos de P

solubilizado. A produção dos ácidos orgânicos variou significativamente ($p \leq 0,05$) entre os isolados analisados, assim como o tipo de ácido produzido por cada isolado (Tabela 2). Observou-se que todos os isolados produziram os cinco tipos de ácidos orgânicos mensurados neste estudo. Este resultado pode ser explicado pelo fato da detecção desses ácidos orgânicos contar com a presença interferentes tais como composição e concentração de substratos utilizados no meio de cultivo dos micro-organismos (He et al., 2013, Giles et al., 2014).

Vários mecanismos estão diretamente ligados à capacidade das plantas em adquirirem P da solução do solo e dentre esses destaca-se a produção de ácidos orgânicos por MSP. Dentre os ácidos orgânicos presentes no processo de solubilização de P, destacam-se os ácidos glucônico, láctico, acético, butírico e propiônico (Goldstein, 2000; Pérez et al., 2007; Mander et al., 2012; Behera et al., 2014; Kaur & Reddy, 2014; Barboza et al., 2017). Micro-organismos solubilizadores de fósforo inorgânico, em geral, excretam ácidos orgânicos que dissolvem diretamente o material fosfático e/ou quelam cátions que acompanham o ânion fosfato (Marra et al., 2012).

Miller et al. (2010) reportaram em estudo de solubilização de fosfato inorgânico por *Pseudomonas* que o ácido glucônico foi detectado em maior proporção que o ácido 2-cetoglucônico. Chuang et al. (2011) trabalhando com solubilização por *Aspergillus niger* também detectou a presença de ácidos orgânicos. Behera et al. (2014) relataram que a produção de ácidos orgânicos por bactérias envolvidas na solubilização de P tem sido frequentemente documentada e que os ácidos glucônico, acético, butírico e propiônico são encontrados na maioria dos MSP.

Entre os padrões de ácidos orgânicos analisados, o ácido glucônico foi o mais frequente para os isolados analisados (Tabela 2), o que já era esperado uma vez que, dentre os ácidos produzidos pelo metabolismo de MSP, o mais frequentemente detectado é o glucônico (Yu et al., 2011), seguido do propiônico (Kan et al., 2010), láctico (Bidondo et al., 2012), acético e butírico (Silva et al., 2016). A predominância do ácido glucônico pode ser explicada pelo seu mecanismo de metabolismo oxidativo direto em que ocorre oxidação da glicose mediada por ação enzimática e formação dos ácidos glucônico e 2-cetoglucônico como produtos finais da via metabólica. Além disso, micro-organismos com elevada capacidade de solubilização de fosfato tem apresentado a produção do ácido glucônico nos sistemas de solubilização de P (Chuang et al., 2011; Mendes et al., 2013; Li et al., 2015).

Tabela 2 – Produção de ácidos orgânicos por micro-organismos rizosféricos de milho solubilizadores de fósforo.

FOSFATO DE ARAXÁ (ppm)					
Isolado	Acético	Butírico	Glucônico	Lático	Propiônico
2050	102,12 k	2,15 c	339,17 a	81,44 d	11,78 a
2237	542,29 a	1,75 d	106,78 c	23,56 d	6,15 d
2247	231,98 c	2,69 b	199,12 b	79,03 d	7,49 c
2257	161,69 e	2,69 b	48,76 d	59,81 d	5,18 e
2268	109,97 j	2,41 c	79,97 c	145,67 c	7,79 c
2272	100,25 l	2,04 d	60,09 d	50,20 d	9,77 b
2273	204,06 d	2,01 d	46,13 d	207,78 c	7,17 d
2286	132,21 h	4,89 a	45,27 d	514,14 a	6,37 d
2293	124,97 i	2,63 b	49,29 d	28,95 d	4,30 e
2296	156,58 f	2,32 c	184,58 b	183,86 c	8,92 c
2326	98,06 m	2,19 c	119,23 c	402 b	8,42 c
2332	81 o	1,89 d	106,78 c	545,47 a	7,83 c
2337	304,22 b	2,13 c	83,42 c	131,14 d	6,37 d
2338	137,09 g	1,42 e	49,29 d	212,22 c	10,10 b
2342	96,14 n	1,98 d	184,58 b	245,10 c	8,72 c
2372	80,90 o	1,89 d	121,70 c	262,57 c	6,77 d
2395	69,14 p	1,23 e	106,22 c	82,25 d	3,48 e
FOSFATO DE FERRO (ppm)					
Isolado	Acético	Butírico	Glucônico	Lático	Propiônico
2050	12,24 e	1,30 j	21,02 b	46,91 j	8,26 d
2237	27,71 e	1,82 h	75,60 a	16,55 n	11,78 b
2247	42,39 e	2,45 f	21,24 b	51,31 j	6,15 f
2257	67,59 d	3,04 d	55,78 a	74,31 i	7,49 e
2268	66,17 d	2,20 g	86,35 a	130,84 f	5,08 g
2272	147,46 c	3,07 d	68,59 a	288,19 e	8,06 d

Médias seguidas de mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 2 – Continuação.

FOSFATO DE FERRO (ppm)					
Isolado	Acético	Butírico	Glucônico	Lático	Propiônico
2273	74,94 d	3,72 c	70,52	90,41 g	3,83 h
2286	215,38 a	3,10 d	40,86 b	26,31 m	9,48 c
2293	78,88 d	2,82 e	82,72 a	19,64 n	5,89 f
2296	172,92 b	1,60 i	32,30 b	36,03 k	6,98 e
2326	34,53 e	4,88 a	45,48 b	32,72 l	6,80 e
2332	101,62 d	4,57 b	53,19 a	80,27 h	9,55 c
2337	32,86 e	3,76 c	23,83 b	126,20 f	12,77 a
2338	28,74 e	2,55 f	50,02 b	293,22 d	6,88 e
2342	125,05 c	3,11 d	30,95 b	405,46 c	11,43 b
2372	138,33 c	2,85 e	62,56 a	591,67 b	12,75 a
2395	179,27 b	2,02 g	80,58 a	810,67 a	13,05 a
FOSFATO DE ALUMÍNIO (ppm)					
Isolado	Acético	Butírico	Glucônico	Lático	Propiônico
2050	32,94 o	2,35 b	18,04 n	35,81 m	6,51 d
2237	96,72 j	2,02 c	36,41 m	40,87 m	8,43 b
2247	71,75 l	2,08 c	57,91 j	47,56 l	6,89 c
2257	87,90 k	2,51 b	130,36 e	124,73 g	6,51 d
2268	191,09 g	2,63 b	83,59 h	108,35 h	7,59 c
2272	53,80 m	2,57 b	65,19 i	83,55 j	5,11 e
2273	98,57 j	2,17 c	44,95 l	76,55 k	6,06 d
2286	115,45 i	2,22 c	206,53 d	74,29 k	8,26 b
2293	203,73 f	1,77 c	345,90 b	107,33 h	11,78 a
2296	378,67 c	1,30 d	248,93 c	89,93 i	7,49 c
2326	890,29 a	1,82 c	411,33 a	316,22 f	5,08 e
2332	114,85 i	2,44 b	110,71 f	578,38 b	8,06 b
2337	121,67 h	3,04 a	66,63 i	892,11 a	7,49 c
2338	369,63 d	3,02 a	64,29 i	112,74 h	5,18 e

Médias seguidas de mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 2 – Continuação.

FOSFATO DE ALUMÍNIO (ppm)					
Isolado	Acético	Butírico	Glucônico	Lático	Propiônico
2342	49,97 n	1,91 c	48,57 k	388,63 e	11,78 a
2372	786,23 b	1,57 d	51,37 k	472,89 d	8,42 b
2395	300,83 e	2,09 c	102,79 g	546,23 c	11,78 a
FITATO DE SÓDIO (ppm)					
Isolado	Acético	Butírico	Glucônico	Lático	Propiônico
2050	58,01 k	2,33 c	77,19 c	73,35 g	4,66 e
2237	78,45 h	1,81 d	26,39 k	88,90 g	6,08 d
2247	32,98 m	2,54 c	71,32 d	153,30 e	8,29 b
2257	24,66 n	2,95 b	37,13 h	55,10 h	7,11 c
2268	181,52 b	3,30 b	43,68 g	43,76 h	5,02 e
2272	132,62 c	2,16 c	34,10 i	65,81 g	5,03 e
2273	105,49 e	1,97 d	88,12 b	55,45 h	7,80 b
2286	24,52 n	2,44 c	27,78 k	81,44 g	5,30 e
2293	98,20 g	1,04 e	99,19 a	79,03 g	6,16 d
2296	69,04 j	2,15 c	50 f	288,19 d	4,64 e
2326	121,89 d	1,75 d	78,57 c	126,20 f	6,55 c
2332	131,73 c	2,35 c	47,29 f	293,22 d	11,78 a
2337	72,01 i	2,02 d	31,11 j	810,67 a	7,49 b
2338	325,79 a	2,20 c	56,52 e	331,70 c	6,15 d
2342	45,41 l	3,07 b	23,83 l	591,67 b	7,17 c
2372	100,63 f	3,72 a	50,02 f	46,91 h	6,25 d
2395	71,50 i	3,100 b	48,76 f	23,56 h	5,30 e

Médias seguidas de mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Ácidos orgânicos estão envolvidos com o processo de solubilização do P mediada pelos micro-organismos e têm sido avaliados com a capacidade de solubilização de P dos fosfatos de rocha (Mendes et al., 2013; Silva et al., 2014). Os grupos hidroxila e carboxila dos ácidos orgânicos acidificam o meio, formam complexos e podem quelar cátions presentes na estrutura do fosfato de rocha, como o de Araxá, liberando o P em forma solúvel (Sagoe et al., 1998). Além disso, a produção de ácidos orgânicos confere vantagens competitivas aos micro-organismos: em meio com alto teor de alumínio e ferro, os ácidos orgânicos formam complexos organo-metálicos, que podem diminuir a toxicidade desses elementos (Jarosz-Wilkolazka & Gadd, 2003; Magnuson & Lasure, 2004). Também a liberação de íons H^+ durante a assimilação de amônio ou através de outras reações metabólicas que desencadeiam a excreção de prótons, como a respiração, pode resultar na solubilização de P (Illmer & Schinner, 1995).

Em geral, os micro-organismos capazes de solubilizar o P liberam ácidos orgânicos no meio que atuam na hidrólise das moléculas de fosfato e/ou na quelação de íons que estão ligados ao fosfato, liberando-o na solução do meio. MSP compreendem um grupo amplo, incluindo tanto bactérias quanto fungos (Panhwar et al., 2013; Mendes et al., 2015; Satyaprakash et al., 2017) e possuem como principal mecanismo associado à solubilização de P a liberação de ácidos orgânicos durante o crescimento microbiano (Mendes et al., 2013).

4. CONCLUSÃO

Os isolados deste estudo, em geral, são potencialmente úteis para a formulação de bioinoculantes e agregar valor fertilizante aos fosfatos de baixa solubilidade.

Os isolados 2050, 2286, 2293, 2326, 2337, 2332, 2372 apresentaram capacidade solubilizadora para o fosfato de Araxá, bem como para a produção de ácidos orgânicos, sendo candidatos à formulação de bioinoculantes.

A atividade solubilizadora das fontes de fosfato obtidas neste estudo demonstram que em solos intemperizados, como os de Cerrado, o suprimento de fósforo pode ser suprido via utilização de MSP.

5. REFERÊNCIAS

ABREU, C.S.; FIGUEIREDO, J.E.; OLIVEIRA, C.A.; DOS SANTOS, V.L.; GOMES, E.A.; RIBEIRO, V.P.; BARROS, B.A.; LANA, U.G.; MARRIEL, I.E. Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. *Genetics and Molecular Research*, v.16, n.1, p. 1-13, 2017.

ANDA. Agência Nacional para difusão de adubos Disponível em: <<http://www.anda.org.br/>> Acesso em 09 de setembro de 2019.

BARBOZA, N.R.; MORAIS, M.M.; QUEIROZ, P.S.; AMORIM, S.S.; GUERRA-SÁ, R.; LEÃO, V.A. High Manganese tolerance and biooxidation ability of *Serratia marcescens* isolated from manganese mine water in Minas Gerais, Brazil. *Frontiers in Microbiology*, v.8, 1946.

BEHERA, B.C.; SINGDEVSACHAN, S.K.; MISHRA, R.R.; DUTTA, S.K.; THATOI, H.N. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove – a review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v.3, n.2, p.97-110, 2014.

BERRAQUERO, F.R.; BAYA, A.M.; CORMENZANA, A.R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. *Ars Pharmaceutica*, v.17, p.399-406, 1976.

BIDONDO, L.F.; BOMPADRE, J.; PERGOLA, M.; SILVANI, V.; COLOMBO, R.; BRACAMONTE, F.; GODEAS, A. Differential interaction between two *Glomus* intraradices strains and a phosphate solubilizing bacterium in maize rhizosphere. *Pedobiologia*, v.55, p.227-232, 2012.

CHUANG, C.C.; KUO, Y.L.; CHAO, C.C.; CHAO, W.L. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biology and Fertility of Soils*, v. 43, p.575–584, 2011.

GILES, C.D.; HSU, P.C.; RICHARDSON, A.E.; HURST, M.R.H.; HILL, J.E. Plant assimilation of phosphorus from an insoluble organic form is improved by addition of an organic anion producing *Pseudomonas* sp. *Soil Biology & Biochemistry*, v.68, p.263-269, 2014.

GOLDSTEIN, A.H. Bioprocessing of rock phosphate ore: essential technical considerations for the development of a successful commercial technology. In: *Proceedings of the International Fertilizer Technical Association Conference*, New Orleans, United States, p.1–21, 2000.

GOLDSTEIN, A.; LESTER, T.; BROWN, J. Research on the metabolic engineering of the direct oxidation pathway for extraction of phosphate from ore has generated preliminary evidence for PQQ biosynthesis in *Escherichia coli* as well as a possible role for the highly conserved region of quinoprotein dehydrogenases. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1647, p.266–271, 2003.

GOMES, E.A.; SILVA, U.C.; MARRIEL, I.E.; OLIVEIRA, C.A.; LANA, U.G.P. Rock phosphate solubilizing microorganisms isolated from maize rhizosphere soil. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.13, p.69-81, 2014.

HE, Z. L.; BIAN, W.; ZHU, J. Screening and identification of microorganisms capable of utilizing phosphate adsorbed by goethite. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. v.33, p.647-663, 2013.

HOLZ, M.; ZAREBANADKOUKI, M.; CARMINATI, A.; HOVIND, J.; KAESTNER, A.; SPOHN, M. Increased water retention in the rhizosphere allows for high phosphatase activity in drying soil. *Plant and Soil*, v.443, n.1-2, p.259-271, 2019.

ILLMER, P.; SCHINNER, F. Solubilization of Inorganic Calcium Phosphates—solubilization Mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry*, v.27, n.3, p.257–63, 1995.

IPNI - International Plant Nutrition Institute. Disponível em: <<http://www.ipni.net/publications>>. Acesso em 07 de julho de 2019.

JAROSZ-WILKOLAZKA, A.; GADD, G. Oxalate production by wood-rotting fungi growing in toxic metal-amended medium. *Chemosphere*, v.52, p.541-547, 2003.

JOHNSTON-MONJE, D.; LUNDBERG, D.S.; LAZAROVITS, G.; REIS, V.M.; RAIZADA, M.N. Bacterial Populations in Juvenile Maize Rhizospheres Originate from Both Seed and Soil. *Plant and Soil*, v.405, p.337-355, 2016.

KAUR, G.; REDDY, M.S. Influence of P-solubilizing bacteria on crop yield and soil fertility at multilocal sites. *European Journal of Soil Biology*, v. 61, p.35-40, 2014.

KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; AHMED, M.; OVES, M.; WANI, P.A. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, v.56, n.1, p.73–98, 2010.

KOPPELAAR, R.H.E.M.; WEIKARD, H.P. Assessing phosphate rock depletion and phosphorus recycling options. *Global Environmental Change*, v.23, p.1454–1466, 2013.

KUREKA, E.; OZIMEK, E.; SOBICSEWSKIB, P.; STOMKA, A.; JAROSZUK, J. Effect of *Pseudomonas luteola* on mobilization of phosphorus and growth of Young apple trees (Ligol)—Pot experiment. *Scientia Horticulturae*, v.164, p.270–276, 2013.

LI, P.; KWOK, A. H. Y.; JIANG, J.; RAN, T.; XU, D.; WANG, W.; LEUNG, F. C. Comparative Genome Analyses of *Serratia marcescens* FS14 Reveals Its High Antagonistic Potential. *PLoS ONE*, v.10, n.4, 2015.

LIANG, X.; JIN, Y.; HE, M.; LIU, Y.; HUA, G.; WANG, S.; TIAN, G. Composition of phosphorus species and phosphatase activities in a paddy soil treated with manure at varying rates. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v.237, p.173-180, 2017.

MAGNUSON, J.; LASURE, L. Organic Acid Production by Filamentous Fungi. *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine* (Tkacz J & Lange L, eds.), p. 307-340, 2004.

MANDER, C.; WAKELIN, S.; YOUNG, S.; CONDRON, L.; CALLAGHAN, M. Incidence and diversity of phosphate-solubilising bacteria are linked to phosphorus status in grassland soils. *Soil Biology & Biochemistry*, v.44, p.93-101, 2012.

MANZOOR, M.; ABBASI, M. K.; SULTAN, T. Isolation of phosphate solubilizing bacteria from maize rhizosphere and their potential for rock phosphate solubilization–mineralization and plant growth promotion. *Geomicrobiology Journal*, v.34, n.1, p.81-95, 2017.

MARRA, L.M. *Solubilização de fosfatos por bactérias e sua contribuição no crescimento de leguminosas e gramíneas*. 2012. 141 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo). Universidade Federal de Lavras-UFLA, Lavras - MG.

MECHRI, B.; ATTIA, F.; TEKAYA, M.; CHEHEB, H., HAMMAMI, M. Agronomic application of olive mill wastewaters with rock phosphate increase the 10Me18:0 fatty acid marker of actinomycetes and change rhizosphere microbial functional groups under long-term field conditions. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 70, p.62-65, 2014.

MENDES, G.O.; VASSILEV, N.B.; BONDUKI, V.H.A.; DA SILVA, I.R.; RIBEIRO, J.I.; COSTA, M.D. Inhibition of *Aspergillus niger* Phosphate Solubilization by Fluoride Released from Rock Phosphate. *Applied and Environmental Microbiology*, v.79, n.16, p.4906-4913, 2013.

MENDES, G.O.; FREITAS, A.L.M.; PEREIRA, O.L.; SILVA, I.R.; VASSILEV, N.B.; COSTA, M.D. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Annals of Microbiology*, v.64, n.1, p.239-49, 2013.

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J.M. The Rhizosphere Microbiome: Significance of Plant Beneficial, Plant Pathogenic, and Human Pathogenic Microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, v.37, n.5, p.634-63, 2013.

MENDES, G.D.O.; SILVA, N.M.R.M.; ANASTÁCIO, T.C.; VASSILEV, N.B.; RIBEIRO, J.I.; SILVA, I.R.; COSTA, M.D. Optimization of *Aspergillus niger* rock phosphate solubilization in solid-state fermentation and use of the resulting product as a P fertilizer. *Microbial biotechnology*, v.8, n.6, p.930-939, 2015.

MIDC. Ministério do desenvolvimento, indústria e comércio exterior. *Balança comercial Brasileira* Novembro/2013. Disponível em: <http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivos/dwnl_1386017020.pdf> Acesso em 08 de dezembro de 2019.

MILLER, S.H.; BROENE, P.; PRIGENT-COMBARET, C.; COMBES-MEYNET, E.; MORRISSEY, J.P.; O’GARA, F. Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology Reports*, v.2, n.3, p. 403-411, 2010.

MOHAMMADI, K. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *Resource and Environment Journal*, v.2, p.80-85, 2012.

MURPHY, J., RILEY, J.P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, v. 27, p.31-36, 1962.

NAUTIYAL, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, v.170, n.1, p. 265-270, 1999.

NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J. *Fósforo em solo e planta em condições tropicais*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 399p, 1999.

NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J.; NUNES, F.N. Fósforo. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. *Fertilidade do solo*. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.471-537, 2007.

OLIVEIRA, C.A.; ALVES, V.M.; MARRIEL, I.E.; GOMES, E.A.; MUZZI, M.R.S.; CARNEIRO, N.P.; GUIMARAES, C.T.; SCHAFFERT, R.E; SÁ, N.M.H. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biology and Biochemistry*, v.41, n.9, p.1782–1787, 2009.

PANHWAR, Q.A.; RADZIAH, O.; NAHER, U.A.; ZAHARAH, A.R.; RAZI, M.I.; SHAMSHUDDIN, J. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and oxalic acid on phosphate uptake from diferente P fractions and growth improvement of aerobic rice using ³²P technique. *Australian Journal of Crop Science*, v.7, n.8, p.1131, 2013.

PÉREZ, E.; SULBARÁN, M.; BALL, M.M.; YARZÁBAL, L.A. Soil biology and biochemistry. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biology and Biochemistry*, v.39, p. 2905-2914, 2007.

R Development Core Team. R: (2011) A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <http://www.R-project.org>.

RAIJ, B.V. Fósforo no solo e interação com outros elementos. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S.R.S., eds. *Fósforo na Agricultura Brasileira*. Piracicaba, Potafos, p.107-115, 2004.

RAJAPAKSHA, R.M.C.P.; HERATH, D.; SENANAYAKE, A.P.; SENEVIRATHNE, M.G.T.L. Mobilization of rock phosphate phosphorus through bacterial inoculants to enhance growth and yield of wetland rice. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, New York, v.42, p.301-314, 2011.

RESENDE, A.V. *Fontes e modos de aplicação de fósforo para o milho em solo cultivado da região do cerrado*. 2004. 169p. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras-UFLA, Lavras - MG.

RICHARDSON, A.E.; HADOBAS, P.A.; HAYES, J.E.; O'HARA, C.P.; SIMPSON, R.J. Utilization of phosphorus and pasture plants supplied with myo-inositol hexaphosphate is enhanced by the presence of soil microorganisms. *Plant and Soil*, v.229, p.47-56, 2001.

SAGOE, C. I.; ANDO, T.; KOUNO, K.; NAGAOKA, T. Relative importance of protons and solution calcium concentration in phosphate rock dissolution by organic acids. *Soil Science and Plant Nutrition*, v.44, n.4, p.617-625, 1998.

SATYAPRAKASH, M.; NIKITHA, T.; REDDI, E. U. B.; SADHANA, B.; VANI, S. S. Phosphorous and phosphate solubilising bacteria and their role in plant nutrition. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v.6, n.4, p.2133-2144, 2017.

SILVA, U.C.; MENDES, G.O.; SILVA, N.M.R.; DUARTE, J.L.; SILVA, I.R.; TÓTOLA, M.R.; COSTA, M.D. Fluoride-tolerant mutants of *Aspergillus niger* show enhanced phosphate solubilization capacity. *PLoS ONE*, v.9, n.10, p.1-9, 2014.

SILVA, U.C.; DE OLIVEIRA, C.A.; LANA, U.G.P.; GOMES, E.A.; DOS SANTOS, V.L. Growth Promotion Features of the Maize Microbiome: From an Agriculture Perspective. In *Plant-Microbe Interaction: An Approach to Sustainable Agriculture*. Springer Singapore, p.345-374, 2016.

SIMPSON, P. G.; SALE, P. W. G.; TENNAKOON, S. B. An economic analysis of the field performance of North Carolina reactive phosphate rock compared with single superphosphate for selected sites from the national reactive phosphate rock project. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, Melbourne, v.37, p.1061-1076, 1997.

SINGH, H.; REDDY, M. Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. *European Journal of Soil Biology*, v.47, p.30-34, 2011.

SMYTH, E. *Selection and analysis of bacteria on the basis of their ability to promote plant development and growth*. 2011. Tese de Doutorado – University College Dublin, Dublin – Irlanda.

STAMFORD, N.P.; LIMA, R.A.; SANTOS, C.R.S.; DIAS, S.H.L. Rock Biofertilizers with *Acidithiobacillus* on Sugarcane Yield and Nutrient Uptake in a Brazilian Soil. *Geomicrobiology Journal*, v.23, n.5, p.261–265, 2006.

VAN STRAATEN, P. Farming with rocks and minerals: challenges and opportunities. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.78, n.4, p.731-747, 2006.

VANCE, C.P.; UHDE, S.C.; ALLAN, D.L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*, v.157, p.423-447, 2003.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M. Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.61, n.5-6, p.435–440, 2003.

VASSILEV, N.; MENDES, G.; COSTA, M.; VASSILEVA, M. Biotechnological Tools for Enhancing Microbial Solubilization of Insoluble Inorganic Phosphates. *Geomicrobiology Journal*, v.31, p.751–763, 2014.

VASSILEVA, M.; AZCON, R.; BAREA, J.; VASSILEV, N. Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*, v.35, n.7, p.693-697, 2000.

WHITELAW, M.A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*, New York, v. 69, p. 99-151, 1999.

YADAV, H.; GOTHWAL, R.K.; NIGAM, V.K.; SINHA-ROY, S.; GHOSH, P. Optimization of culture conditions for phosphate solubilization by a thermo-tolerant phosphate-solubilizing bacterium *Brevibacillus* sp. BISR-HY65 isolated from phosphate mines. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v.2, p.217–225, 2013.

YU, X.; LIU, X.; ZHU, T.H.; LIU, G.H.; MAO, C. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from walnut and their effect on growth and phosphorus mobilization. *Biology and Fertility of Soils*, v.47, p.437–446, 2011.

ZAPATA, F.; ROY, R.N. Utilización de las rocas fosfóricas para una agricultura sostenible. *Boletín FAO fertilizantes y nutrición vegetal*, v.13, p.3-10, 2007.

CAPÍTULO IV

ESTUDO DA DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS PRESENTES EM AMOSTRAS DE SOLO RIZOSFÉRICO E NÃO RIZOSFÉRICO DA CULTURA DO MILHO SOB DIFERENTES MANEJOS DE ADUBAÇÃO FOSFATADA

RESUMO

Micro-organismos solubilizadores de fósforo (MSP) estão sendo utilizados como alternativa para otimizar a eficiência na utilização de P, principalmente por serem eficientes na biossolubilização de rochas fosfáticas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho é prospectar grupos funcionais de bactérias eficientes na solubilização de P para uso como inoculantes em culturas de grãos. Para o estudo da microbiota não cultivável, foram coletadas amostras de solo rizosférico e não rizosférico em experimento de campo contendo o genótipo de milho DKB 390 no estágio de floração, na safra 2015/16. O experimento de campo foi conduzido utilizando-se delineamento em blocos casualizados com 3 repetições, sendo os tratamentos constituídos das adubações de P utilizadas no plantio: Super Fosfato Triplo (SFT), Fosfato de Rocha Itafós (FRI), Fosfato Reativo Bayóvar (FRB) e tratamento testemunha sem adição de fosfato. Foram coletadas 5 plantas em cada parcela dos tratamentos de adubação para a coleta de amostras de solo de acordo com Oliveira et al. (2009), considerando-se como solo rizosférico o fortemente aderido a raízes centrais e finas. O perfil da comunidade de bactérias das amostras foi analisado por meio da construção de bibliotecas de amplicons rRNA 16S e sequenciamento na plataforma Illumina Miseq (metataxonômica). A riqueza estimada não variou significativamente para a rizosfera e solo não rizosférico. A rizosfera e o *bulk soil* apresentaram uma diversidade para a comunidade microbiana. Observou-se abundância de táxons bacterianos relacionados à solubilização de fósforo no solo fertilizado por fosfato de rocha.

Termos de indexação: fósforo, bactérias rizosféricas, metagenômica.

ABSTRACT

Phosphorus solubilizing microorganisms (PSM) are being used as an alternative to optimize P utilization efficiency, mainly because they are efficient in phosphate rock biosolubilization. In this context, the objective of this work is to prospect functional groups of bacteria efficient in solubilizing P for use as inoculants in grain cultures. For the study of non-cultivable microbiota, samples of rhizospheric and non-rhizospheric soil were collected in a field experiment containing the DKB 390 maize genotype at flowering stage in the 2015/16 crop. The field experiment was conducted using a randomized block design with 3 replications. The treatments consisted of P fertilizers used in the planting: Triple Super Phosphate (TSP), Itafós Rock Phosphate (RPI), Bayóvar Reactive Phosphate (RPB) and control treatment without phosphate addition. Five plants were collected in each portion of the fertilization treatments to collect soil samples according to Oliveira et al. (2009), considering as rhizospheric soil the strongly adhered to central and thin roots. The bacterial community profile of the samples was analyzed by constructing 16S rRNA amplicon libraries and sequencing on the Illumina Miseq platform (metataxonomic). Estimated richness did not vary significantly for rhizosphere and non-rhizospheric soil. The rhizosphere and bulk soil showed diversity for the microbial community. Plenty of bacterial taxa related to phosphorus solubilization were observed in rock phosphate fertilized soil.

Keywords: phosphorus, rhizospheric bacteria, metagenomics.

1. INTRODUÇÃO

A incorporação de novas tecnologias somada ao advento do milho safrinha, principalmente em regiões de Cerrado, destaca o agronegócio brasileiro no cenário da economia nacional. Neste contexto, a cultura do milho se destaca considerando que a agroindústria de rações de aves, suínos e bovinos é composta basicamente por farelo de soja e de milho, tornando o milho uma commodity estratégica para expansão do agronegócio brasileiro (Abreu, 2014).

A fertilidade do solo de regiões tropicais, como a de Cerrado, fica substancialmente limitada pela baixa disponibilidade natural de fósforo (P), uma vez que a deficiência de P no solo potencialmente ocasiona alterações no metabolismo das plantas, a exemplo, prejudicando o estoque de energia e a produção de carboidratos o que substancialmente ocasiona queda da produtividade e até mesmo a inviabilidade da safra. Como forma de correção dessa deficiência e para viabilizar a exploração agrícola do Cerrado, agricultores adotam práticas de adubação fosfatada em quantidades elevadas para manutenção e/ou melhoria da capacidade produtiva dos solos devido à perda de parte do P que é fornecido via adubação pelo fenômeno de fixação em reações com componentes do solo (Novais et al., 2007).

Micro-organismos solubilizadores de fósforo (MSP) estão sendo utilizados como alternativa para otimizar a eficiência na utilização de P por desempenharem papel primordial no ciclo biogeoquímico deste elemento, disponibilizando-o para as plantas, através do fluxo de P pela biomassa microbiana, da solubilização do P inorgânico, da mineralização do P orgânico. Neste contexto, há um crescente interesse na utilização de micro-organismos em práticas agrícolas, principalmente para a promoção de crescimento vegetal, entre outras aplicações, o potencial de colonização de rizobactérias (Santos & Varavallo, 2011; Leite et al., 2013; Manzoor et al., 2017).

A caracterização molecular de MSP tem sido amplamente utilizada por possibilitar uma identificação taxonômica e por permitir a análise de mecanismos envolvidos no processo de labilidade de P. Portanto, uma maior compreensão de mecanismos moleculares, eficiência e da capacidade da comunidade microbiana em solubilizar diversas fontes de fosfatos poderá favorecer a seleção e identificação de estirpes potencialmente úteis para agregar valor

fertilizante aos fosfatos de baixa solubilidade, visando a utilização destes como fonte de P na agricultura.

Técnicas dependentes de cultivo, isto é, que se baseiam no isolamento e estudo de micro-organismos (Schneider et al., 1998; Bogino et al., 2013) são amplamente utilizados em estudos sobre diversidade microbiana. Embora essas técnicas sejam bastante difundidas, sua utilização para compreensão de funções e diversidade da comunidade microbiana em ambientes estruturalmente complexos, como a rizosfera, fica substancialmente limitada, pois uma minoria de micro-organismos é selecionada quando comparada à microbiota comunitária da rizosfera (Jang et al., 2015). Por sua vez, técnicas moleculares independentes de cultivo, que se baseiam no estudo do DNA para a análise da estrutura e função microbiana tem se tornado uma ferramenta para a compreensão da diversidade de micro-organismos. Dentre essas técnicas, as análises metagenômica, por meio da extração do DNA microbiano diretamente das amostras ambientais, permitem o acesso ao material genético coletivo de toda a microbiota presente no ambiente estudado, sejam eles cultiváveis ou não, fornecendo uma ampla perspectiva da variedade ecológica e taxo-funcional dos micro-organismos no ambiente.

Nas técnicas tradicionais de cultivo somente de 1 a 10% dos micro-organismos presentes no ambiente podem ser cultivados em laboratório (Amann et al., 1995; Jurelevicius et al., 2013; Sierra-García et al., 2014). Desta forma, a estrutura real da comunidade microbiana e sua potencialidade é determinada de forma a subestimar a realidade da ecologia de micro-organismos. Os métodos tradicionais de cultivo estão sendo complementados e/ou substituídos por técnicas moleculares independentes de cultivo, baseadas no estudo do DNA comunitário (DNA da comunidade microbiana amostrada) para a análise de diversidade (*metabarcoding*), levando ao desenvolvimento de um grande número de metodologias baseadas no estudo do DNA para a análise da diversidade e função microbiana (Amann et al., 1995; Tringe et al., 2005; Hemme et al., 2015).

Diante disto, o objetivo deste trabalho é prospectar grupos funcionais de bactérias eficientes na solubilização de P para uso como inoculante na cultura do milho, bem como avaliar o perfil da comunidade microbiana não cultivável rizosférica e não rizosférica (*bulk soil*) de milho sob diferentes manejos de adubação fosfatada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de coleta e amostragem

As amostras de solo rizosférico e não rizosférico (*bulk soil*) foram coletadas em experimento de campo contendo o genótipo de milho DKB 390 no estágio de floração, plantado em Latossolo Vermelho distrófico no campo experimental da Embrapa Milho e Sorgo (19°28'S 44°15'W), município de Sete Lagoas-MG, na safra 2015/2016. Na área experimental é realizado rotação de cultura com feijão (*Phaseolus vulgaris*).

Os tratamentos foram constituídos de adubações de fósforo utilizadas no plantio, distribuídos em faixas (blocos inteiramente casualizados) com 3 repetições: Super Fosfato Triplo (SFT), Fosfato de Rocha Itafós (FI), Fosfato Reativo Bayóvar (FB) e tratamento testemunha sem adição de fosfato, totalizando 12 amostras para o solo rizosférico e 12 amostras para o *bulk soil*. A adubação de plantio foi realizada com base na dose de P de 200 kg P₂O₅ ha⁻¹, exceto no controle sem adubação fosfatada (PO). Foram coletadas 5 plantas em cada parcela, segundo delineamento em blocos casualizados, dos tratamentos de adubação para a coleta de amostras de solo de acordo com Oliveira et al. (2009), considerando-se como solo rizosférico o fortemente aderido a raízes centrais e finas.

O solo coletado foi homogeneizado, adicionado em sacos plásticos, devidamente identificados, acondicionados em caixas térmicas contendo gelo e transportados para ao Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo, onde foram peneirados em peneiras de 2 mm de abertura da malha e armazenados em ultra freezer (-80 °C) até a execução das análises.

2.2 Análises físico-químicas das amostras

Anterior ao plantio das amostras de milho (Híbrido DKB 390) na safra 2015/2016, foi realizada a análise físico-químico do solo para correção dos parâmetros avaliados (matéria orgânica, alumínio, cálcio, magnésio, potássio, saturação de bases e porcentagem da saturação de bases). Nesta análise prévia do solo, dois extratores, Mehlich 1 e Mehlich 3, foram utilizados para mensurar o teor de fósforo residual no solo.

2.3 Extração de DNA metagenômico das amostras de solo

Para a extração do DNA metagenômico das amostras de solo rizosférico e não rizosférico as amostras foram submetidas à extração com o uso do PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA), de acordo com instruções do fabricante. A qualidade do DNA foi avaliada em eletroforese de gel de agarose 1% e a quantificação realizada por meio da leitura da absorvância a 280 e 260 nm em espectrofotômetro (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

2.4 Amplificação da região 16S rDNA e construção da biblioteca

A amplificação de fragmentos de 250 bases da região hipervariável V4 do gene ribossomal 16S rRNA foi efetuada utilizando-se os primers universais 515F e 806R e as seguintes condições de PCR: 94°C por 3 min; 18 ciclos de 94°C por 45 seg, 50°C por 30 seg e 68°C por 60 seg; seguido de 72°C por 10 min. A partir destes amplificados foi construída a biblioteca metagenômica utilizando-se o kit comercial Nextera DNA Library Preparation Kit da Illumina®. Os amplificados foram reunidos em *pools* e posteriormente sequenciados no sequenciador MiSeq da Illumina® (Degnan and Ochman, 2012).

2.5 Avaliação da diversidade taxonômica bacteriana

As leituras ou *reads* obtidos no sequenciador foram analisadas na plataforma QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) (Caporaso et al., 2010; Caporaso et al., 2011), seguindo-se um fluxo de trabalho desde a remoção de sequências de baixa qualidade, filtração, remoção de quimeras e classificação taxonômica. As sequências foram classificadas em gêneros bacterianos através do reconhecimento de unidades taxonômicas operacionais (OTUs), neste caso, a identidade (>97%) entre as sequências quando comparadas contra uma base de dados.

Para comparar as sequências foi utilizada a atualização (SILVA 132) do ano 2018 do banco de dados de sequências ribossomais SILVA database (Yilmaz et al., 2013). Para gerar a classificação das comunidades bacterianas por identificação de OTUs, foram utilizadas 13.000 leituras por amostra, isso com a finalidade de normalizar os dados e não comparar

amostras com diferente número de leituras, evitando dessa forma um viés na taxonomia.

2.6 Análises estatísticas

Os ensaios de análise físico-química do solo foram analisados segundo o delineamento inteiramente casualizado com três repetições por amostra. Os resultados de cada ensaio foram submetidos individualmente à análise de variância e, quando ocorreram diferenças significativas pelo teste F ($p < 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa Sisvar 5.3 (Ferreira, 2010).

Para determinar a diferença estatística da prevalência de táxons bacterianos entre os tratamentos foi aplicado o teste de Anova com teste post-hoc de Tukey Kramer ($P \leq 0,05$) e posterior correção de Bonferroni. As análises foram feitas no programa estatístico de metagenômica STAMP: *Statistical Analysis of Metagenomic Profiles* (Parks et al., 2014). As médias referentes à biodiversidade entre os tratamentos foram comparadas através do índice Chao1 e o número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) pelo teste de Kruskal Wallis ($P \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Previamente ao plantio das amostras de milho (Híbrido DKB 390) na safra 2015/2016, foi realizada a análise físico-químico (Tabela 1) do solo para correção dos parâmetros avaliados. Nesta análise prévia do solo, dois extratores, Mehlich 1 e Mehlich 3, foram utilizados para mensurar o teor de fósforo residual no solo.

O P mensurado pelo extrator Mehlich 1 apresentou diferença significativa ($p \leq 0,05$) de acordo com as fontes de adubação utilizada (Tabela 1). O extrator Mehlich 1 extrai o P ligado ao cálcio (Ca), o chamado P não lábil (não prontamente disponível) para as plantas. Como os fosfatos reativos e não reativos são fosfatos de cálcio, logo o P aplicado é não lábil e o Mehlich 1 é capaz de mensurar esse P não lábil presente no solo. Desta forma, o Mehlich 1 é capaz de detectar o P aplicado após adubações com fosfatos naturais (Korndörfer, Lara-Cabezas & Horowitz, 1999). Assim, o Mehlich 1 foi capaz de mensurar o P residual oriundo da rotação de culturas presente na área experimental deste estudo.

O P mensurado pelo extrator Mehlich 3 não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) de acordo com as fontes de adubação utilizada (Tabela 1). Os fosfatos naturais são insolúveis em água e o P continua a apresentar-se não lábil para as plantas, além de sua dissociação só ocorrer em solos ácidos. Então, para mensurar esta dissociação ácida, o extrator Mehlich 3 é amplamente empregado. Apesar de ácido, o Mehlich 3 é tamponado e possui unidades complexantes de cátions, o que possibilita retirar do solo apenas o P lábil, desprezar o P não lábil, além de permitir a extração de cátions trocáveis como cálcio, magnésio e potássio.

As parcelas sem adição de fontes de fosfato (controle) e as com adição de fosfato reativo Bayóvar (FB) apresentaram, em média, os menores ($4,65 \text{ mg.dm}^{-3}$) e maiores ($12,60 \text{ mg.dm}^{-3}$) valores de fósforo residual (Tabela 1), respectivamente. Este resultado corrobora com o padrão de reatividade dos fosfatos utilizados neste trabalho, uma vez que o FB apresenta alto grau de substituição isomórfica do íon fosfato por carbonato, o que lhe confere maior velocidade de reação no solo, quando comparado a outros fosfatos naturais (Novais et al., 2007), como o fosfato de Itafós, estudado neste trabalho.

O FB é um fosfato de origem sedimentar e orgânico, formado pela deposição e posterior decomposição de restos de animais marinhos, sendo proveniente da região de Bayóvar (Sechura) no Peru, possui elevada superfície específica o que confere maior contato com a solução do solo e permite uma maior labilidade de P para as plantas, face a sua alta

reatividade quando comparado com os demais tipos de fosfato naturais (Rajapaksha, 2011), além de proporcionar maior efeito residual, é menos solúvel podendo ser facilmente hidrolisado, isto é, apresenta alta reatividade no solo (Kaur et al., 2014). Enquanto que o fosfato de Itafós, também chamado de fosfato de Arraias, é de origem sedimentar e extraído de fosforitas da Formação Sete Lagoas, porção basal do Grupo Bambuí, região de Campos Belos, GO, e Arraias, TO (Monteiro, 2009), sendo mais reativo e adequado para aplicação direta no solo que as fontes de origem ígnea, pois se apresenta menos cristalino, mais poroso e hidrolisável (Souza et al., 2014).

A reatividade dos fosfatos naturais é bastante distinta entre eles: muitos são praticamente inertes quando usados como fonte de P para as plantas, como a maioria dos fosfatos de origem geológica ígnea e metamórfica (Moreira, 2006), porém a maioria dos fosfatos de origem sedimentar, como o FB, apresentam resultados satisfatórios (Nahas et al., 1994; Nannipieri et al, 2011). O FB apresenta solubilidade intermediária entre as fontes de P solúveis e os fosfatos naturais (Raij, 2004).

Tabela 1 – Resultado da análise físico-química do solo antes do plantio.

Fonte de Fósforo	pH (água)	P-Mehlic 1 (mg.dm ⁻³)	P-Mehlic 3 (mg.dm ⁻³)	MO (dag.kg ⁻¹)	Al (cmolc.dm ⁻³)	Ca (cmolc.dm ⁻³)	Mg (cmolc.dm ⁻³)	K (mg.dm ⁻³)	SB (cmolc.dm ⁻³)	V (%)
Controle	5,88 a	4,65 a	13,15 a	3,93 a	0,08 a	2,93 a	0,64 a	102,50 a	3,84 a	38,75 a
FI	5,85 a	7,91 ab	12,86 a	3,86 a	0,07 a	2,54 a	0,57 a	86,75 a	3,33 a	36,50 a
FB	5,98 a	12,60 b	19,35 a	4,07 a	0,02 a	2,71 a	0,69 a	77,50 a	3,59 a	40,50 a
SFT	5,85 a	7,44 ab	19,51 a	4,04 a	0,04 a	2,63 a	0,63 a	77,00 a	3,49 a	36,00 a

Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Fontes de fósforo (P):

Controle: sem adição de fosfato. FI: Fosfato de rocha (natural) Itafós. FB: Fosfato reativo Bayóvar. SFT: Superfosfato triplo.

Os parâmetros ecológicos associados à dinâmica da comunidade de bactérias foram determinados através dos índices de diversidade obtidos, Shannon e Simpson, bem como o estimador de riqueza Chao1 (Tabela 2). Em relação à riqueza de OTUS observadas, os menores e maiores valores foram, respectivamente, para os tratamentos com adubação de SFT no solo não rizosférico e controle no solo rizosférico (Tabela 2).

De acordo com o índice de Chao1, um estimador de riqueza que considera também o número de *singletons* e *doubletons* nas amostras, a menor e maior riqueza foi observada, respectivamente, no tratamento com adubação de SFT no solo não rizosférico e no tratamento controle do solo rizosférico (Tabela 2).

Os índices de diversidade Shannon e Simpson diferiram entre os tratamentos tanto no solo rizosférico quanto no solo não rizosférico (*bulk soil*) ($p \leq 0,05$). O índice de Shannon considera as espécies raras e abundantes com igual peso, sendo mais sensível a mudanças nas espécies raras da comunidade (Magurran, 2004), já o índice de Simpson mede a probabilidade de dois indivíduos, selecionados ao acaso no grupo amostral, pertencer à mesma espécie e é mais sensível às mudanças nas espécies abundantes (Magurran, 2004). Assim, foi possível inferir que a diversidade abrangeu as espécies sequenciadas e abundantes de forma distinta, ou seja, houve uma significância para a diversidade quando considerado esses dois índices de diversidade (Tabela 2).

Tabela 2– Média do número de 16S OTUS observados, estimadores de riqueza e índices de diversidade calculados para a comunidade de bactérias das amostras de solo rizosférico e não rizosférico (*bulk soil*) de milho em solo adubado com diferentes fontes de fósforo.

Amostras	OTUS Observados	Estimador de Riqueza			Índice de Diversidade	
		Chao1	Shannon	Simpson		
Solo Não Rizosférico						
Controle	4166 ± 327	5247 ± 228 a	6,4 ± 0,4 b	0,92 ± 0,03 b		
FI	4889 ± 127	6011 ± 115 a	7,6 ± 0,35 a	0,98 ± 0,01 a		
FB	4515 ± 91	5426 ± 122 a	8,3 ± 0,03 a	0,99 ± 0,01 a		
TSP	3412 ± 852	4414 ± 863 a				
Solo Rizosférico						
Controle	5103 ± 183	6148 ± 189 a	5,4 ± 0,4 a	0,92 ± 0,03 a		
FI	4811 ± 384	5795 ± 396 a	6,1 ± 0,1 a	0,96 ± 0,01 a		
FB	4735 ± 350	5632 ± 299 a	5,2 ± 0,8 a	0,86 ± 0,01 a		
TSP	4789 ± 345	5780 ± 324 a	6,4 ± 0,4 b	0,92 ± 0,03 b		
			7,6 ± 0,35 a	0,98 ± 0,01 a		

Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ±: indica o erro padrão por fonte de fosfato. Controle: sem adição de fosfato. FI: Fosfato de rocha (natural) Itafós. FB: Fosfato reativo Bayóvar. SFT: superfosfato triplo.

A nível de gênero, a classificação taxonômica para o ambiente rizosfera identificou 241 gêneros bacterianos, mas adotando um valor de abundância superior a 2% foram encontradas diferenças estatísticas significativas somente para 11 gêneros (Figura 1).

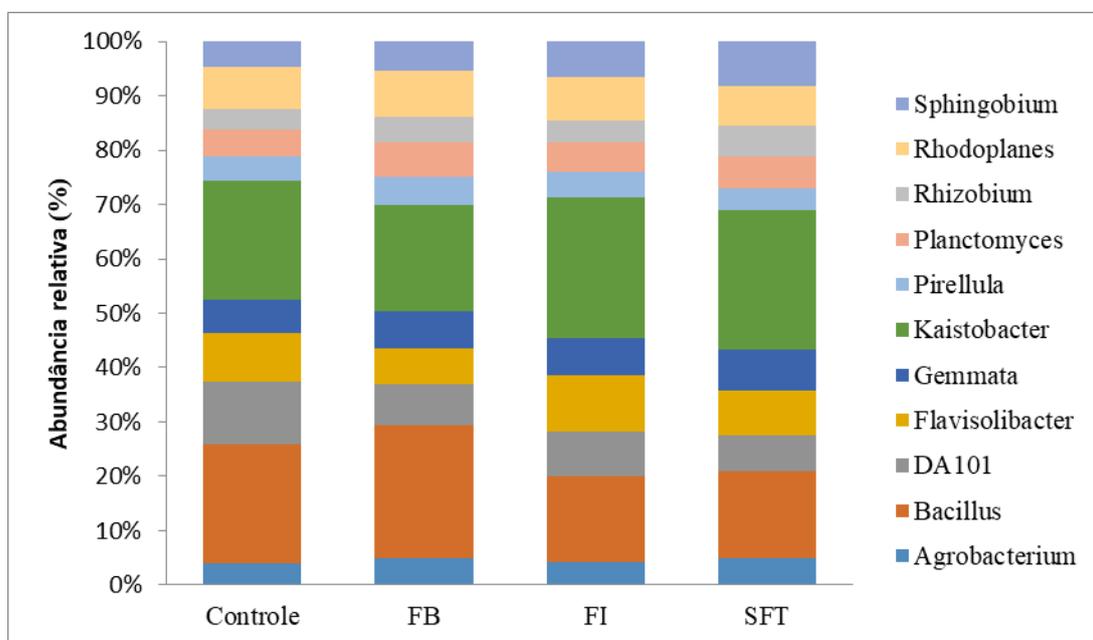


Figura 1– Abundância relativa dos gêneros de bactéria presentes nas amostras de solo rizosférico de milho. Resultado de três repetições por amostra. Controle: sem fonte de fosfato; FB: fosfato reativo Bayóvar; FI: fosfato de rocha Itafós; SFT: Super Fosfato Triplo.

Em geral, observou-se diferença estatística para a composição da comunidade microbiana rizosférica de acordo com as fontes de adubação fosfatada utilizadas neste estudo. Entre os tipos de fosfato utilizados, observou-se maior abundância relativa para o fosfato de Itafós (FI) seguido do fosfato Bayóvar (B) e do Super Fosfato Triplo (SFT). Esses resultados já eram esperados, visto que o FI é mais reativo e adequado para aplicação direta no solo que as fontes de origem ígnea, pois se apresenta menos cristalino, mais poroso e hidrolisável (Souza et al., 2014). Wu et al. (2017), em um estudo sobre análise da comunidade microbiana rizosférica relatam que a diversidade da microbiota em solo rizosférico é ampla e nem sempre de fácil acesso. Bulgarelli et al. (2015), reforçam que as comunidades microbianas que habitam o interior da raiz de plantas saudáveis, bem como a rizosfera, que consiste em partículas do solo firmemente presas às raízes, são responsáveis por relações de simbiose e prospectam a diversidade e abundância desse microbioma.

Pela análise de variância foram identificados 5 gêneros com abundância significativamente diferente entre os tratamentos (Figura 2).

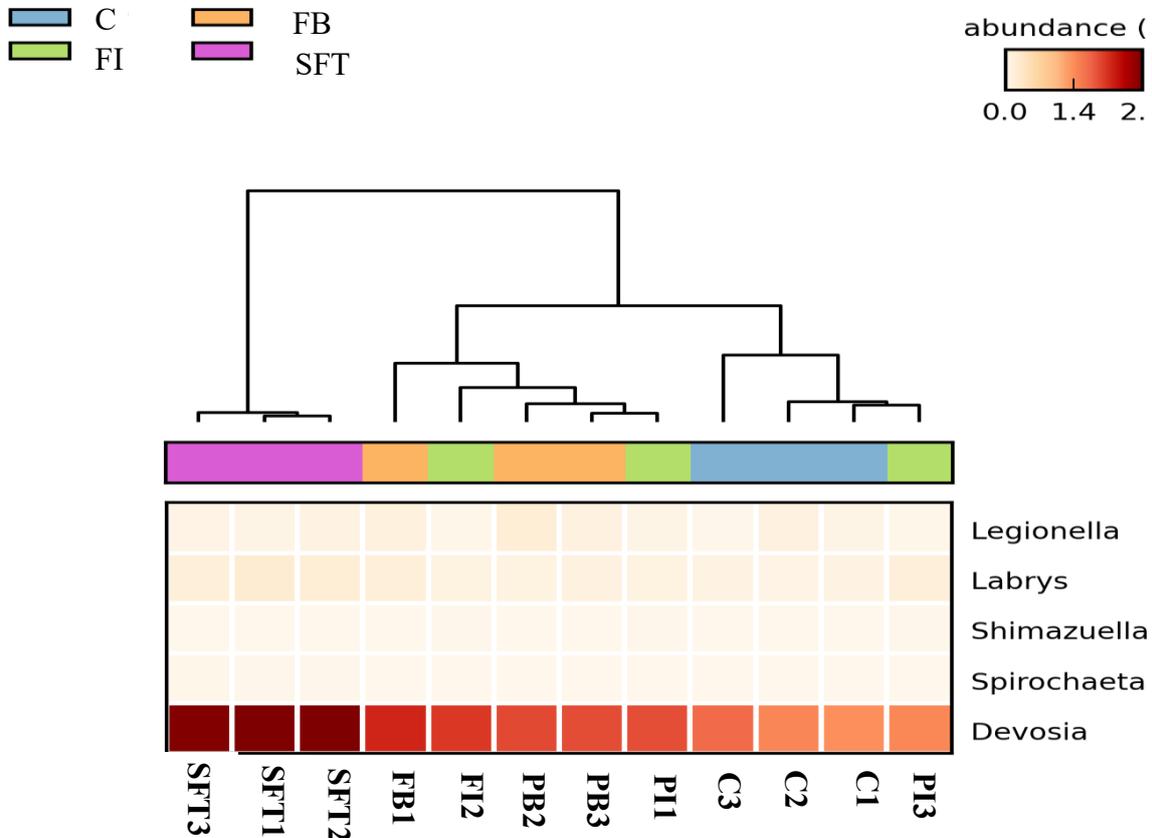


Figura 2 – Gêneros que apresentaram diferença significativa para abundância, entre as fontes de adubação em solo rizosférico de milho, pelo teste de Tukey Kramer ($p < 0,05$). Resultado de três repetições por amostra. Controle: sem fonte de fósforo; FB: fósforo reativo Bayóvar; FI: fósforo de rocha Itafós; SFT: Super Fósforo Triplo.

Observou-se, estatisticamente, aumento significativo dos gêneros *Devosia*, *Labrys* e *Spirochaeta* no tratamento SFT quando comparado aos outros tratamentos (Figura 3A). Já no tratamento com FI foi observado aumento de *Shimazuella*, quando comparado aos demais tratamentos (Figura 3C).

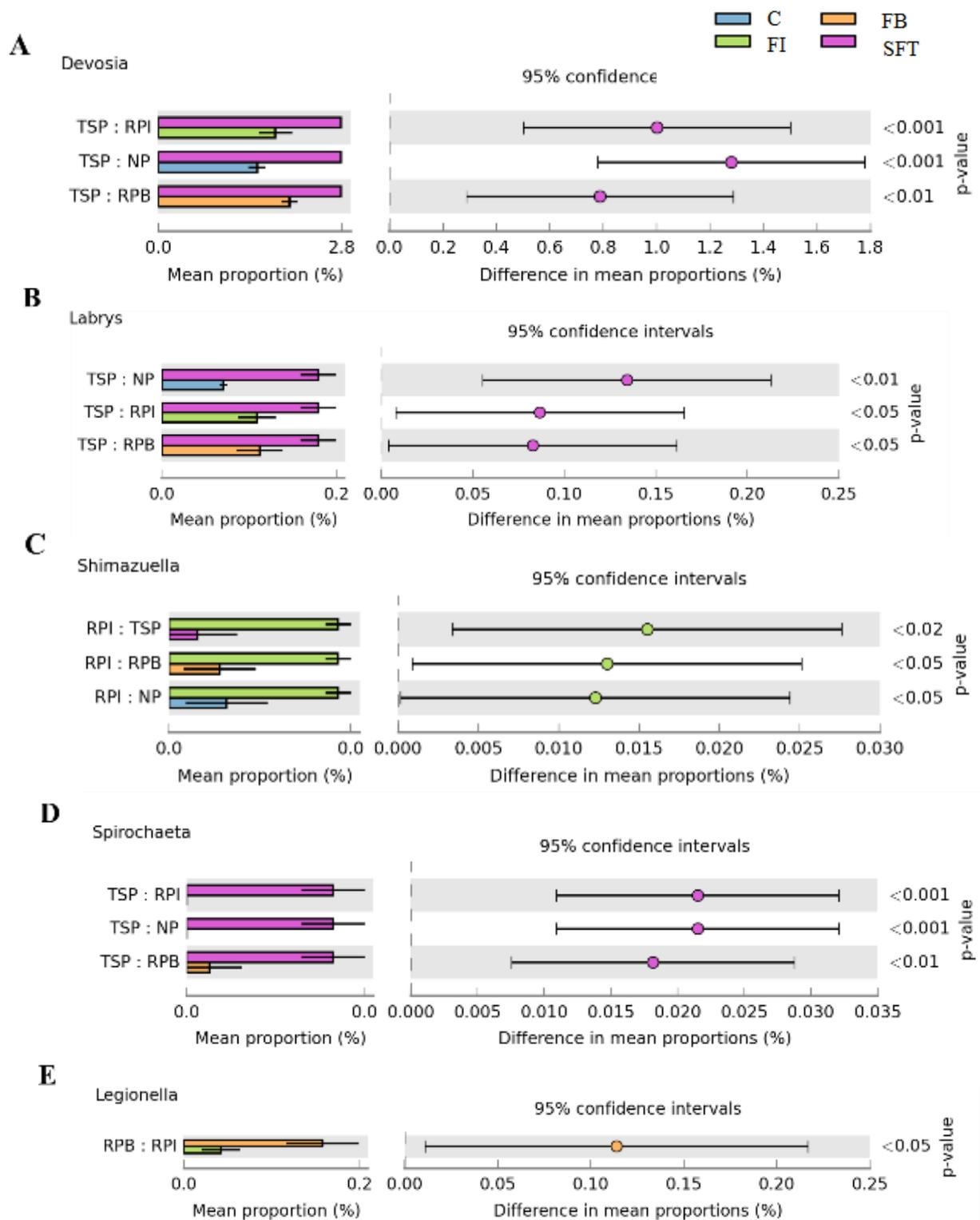


Figura 3 – Gêneros que apresentaram diferença significativa na sua abundância, entre as fontes de adubação de solo rizosférico de milho, pela análise de variância com teste post-hoc de Tukey Kramer ($p < 0,05$). São apresentados os valores da média e desvio padrão para cada gênero. Controle: sem fonte de fósforo; FB: fósforo reativo Bayóvar; FI: fósforo de rocha Itafós; SFT: Super Fósforo Triplo.

Adicionalmente, observou-se uma tendência de agrupamento das amostras, de acordo com a fonte de adubação fosfatada, na análise de componentes principais (PCA), principalmente nos tratamentos SFT e FI, o que sugere uma diferenciação das comunidades bacterianas como resultado do manejo da adubação fosfatada (Figura 4). Assim, o eixo PC1 (variável fonte de adubação/fósforo) explicaria 66% das mudanças nas comunidades bacterianas a nível de gênero.

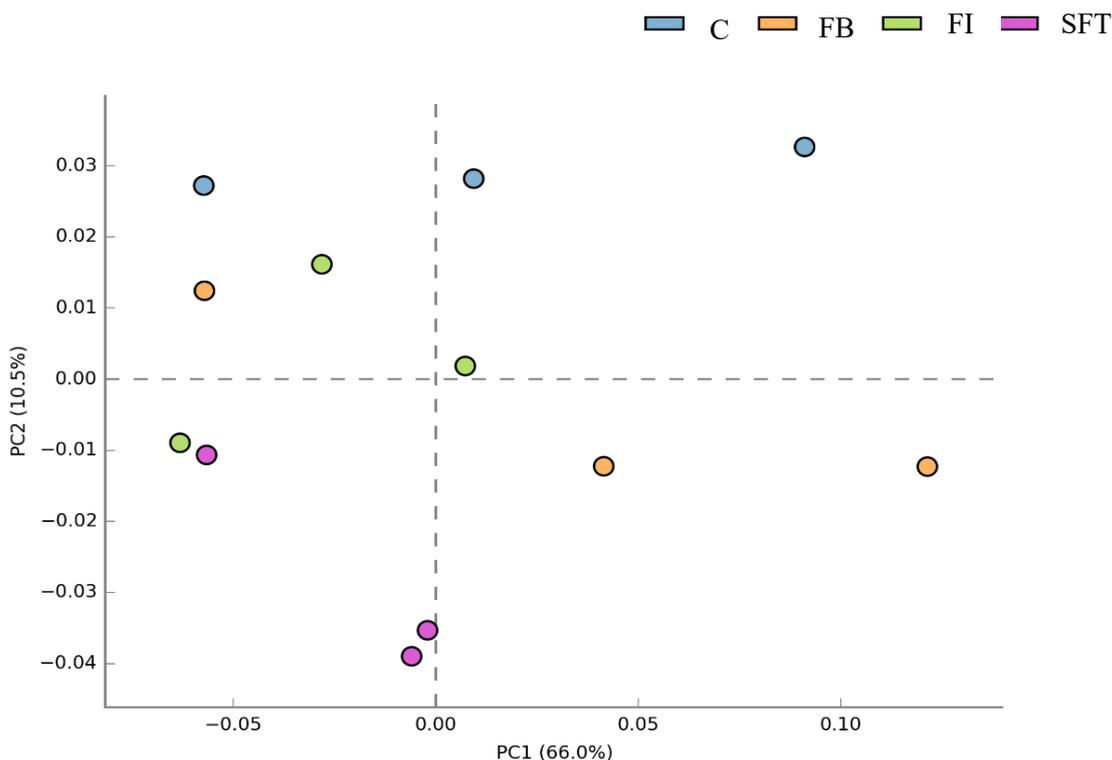


Figura 4 – Análise de componentes principais (PCA) dos gêneros das comunidades bacterianas presentes na rizosfera de milho sob manejo de adubação fosfatada. A figura foi construída empregando o método de distância Bray-Curtis e representa a distância filogenética entre amostras, ou seja, quanto mais próximas duas amostras significa que sua composição bacteriana é muito semelhante. Controle: sem fonte de fosfato; FB: fosfato reativo Bayóvar; FI: fosfato de rocha Itafós; SFT: Super Fosfato Triplo.

Os resultados encontrados de PCA para as amostras de solo rizosférico corroboram com o padrão de reatividade dos fosfatos utilizados, uma vez que o FB apresenta alto grau de substituição isomórfica do íon fosfato por carbonato, o que lhe confere maior velocidade de reação no solo, quando comparado a outros fosfatos naturais (Novais et al., 2007), como o

fosfato de Itafós, estudado neste trabalho. O FI é mais viável para aplicação direta no solo do que as fontes de origem ígnea, pois se apresenta mais hidrolisável (Souza et al., 2014). Já o SFT é altamente concentrado em fósforo, variando de 45 a 46% deste elemento, e muito utilizado nas misturas de fertilizantes para manejo de adubação de diversas culturas por ser originado pelo ataque ácido de ácido fosfórico na rocha fosfática e, com isso, apresenta elevada solubilidade em água (Souza et al., 2014). Desta forma, a tendência de agrupamento na PCA nos tratamentos de SFT e FI sugere que o microbioma formado pela região rizosférica, além de abrigar uma diversidade de espécies, pode determinar a abundância relativa das mesmas, uma vez que houve separação entre as amostras segundo o manejo de adubação fosfatada em cada parcela amostral e isto indica que a diversidade da comunidade microbiana sofreu efeito das fontes de adubação utilizadas neste estudo.

A beta diversidade (β diversidade) é utilizada para comparar a diversidade das comunidades bacterianas entre as amostras, considerando todos os níveis taxonômicos. Para esta comparação, foi realizada a análise de PCA que abrange dados quantitativos para estimar a quantidade mais a presença e ausência de OTUS (*Operacional Taxonomic Unit*), estimando, assim, a riqueza e a abundância de espécies. No geral, o tipo de fertilização de P modificou o perfil da comunidade microbiana e a abundância das OTUs da comunidade de bactéria sofreu maior efeito das fontes de P do que a riqueza, evidenciado pela separação significativa das comunidades dos diferentes tratamentos de P. Bulgarelli et al. (2015) relatam que para elucidar se a composição da comunidade bacteriana da rizosfera de cevada estava correlacionada ou era independente do tipo de amostra e do genótipo, os dados da contagem de OTU foram utilizados para construir matrizes de similaridade. Fierer et al. (2012), apontam que o levantamento mais abrangente da diversidade taxonômica, filogenética e funcional do solo se faz necessário e que abordagens metagenômicas podem ser empregadas para a compreensão de como a diversidade e função microbiana variam através dos biomas terrestres.

Por outro lado, referente aos indicadores de biodiversidade das comunidades bacterianas, não foi observada diferença significativa de riqueza entre as fontes de adubação utilizadas neste estudo. Métricas não ponderadas abrangem dados qualitativos para estimar a presença ou ausência de OTUs, estimando, assim, apenas a riqueza de espécies de um dado ambiente amostral. Por sua vez, as métricas ponderadas abrangem dados quantitativos para estimar a quantidade somada à presença e ausência de OTUS, estimando, assim, a riqueza e a

abundância de espécies. Adicionalmente, análises do *core* da microbiota mostraram 2.815 OTUs únicas no tratamento controle e 3.300 OTUs compartilhadas nas demais fontes de adubação utilizadas neste trabalho (Figura 5) em que cada OTU pode ser considerada como um táxon único. Esses resultados evidenciam a distribuição e ocorrência dos táxons, relacionando as suas ocorrências nas distintas fontes de fósforo utilizadas neste trabalho.

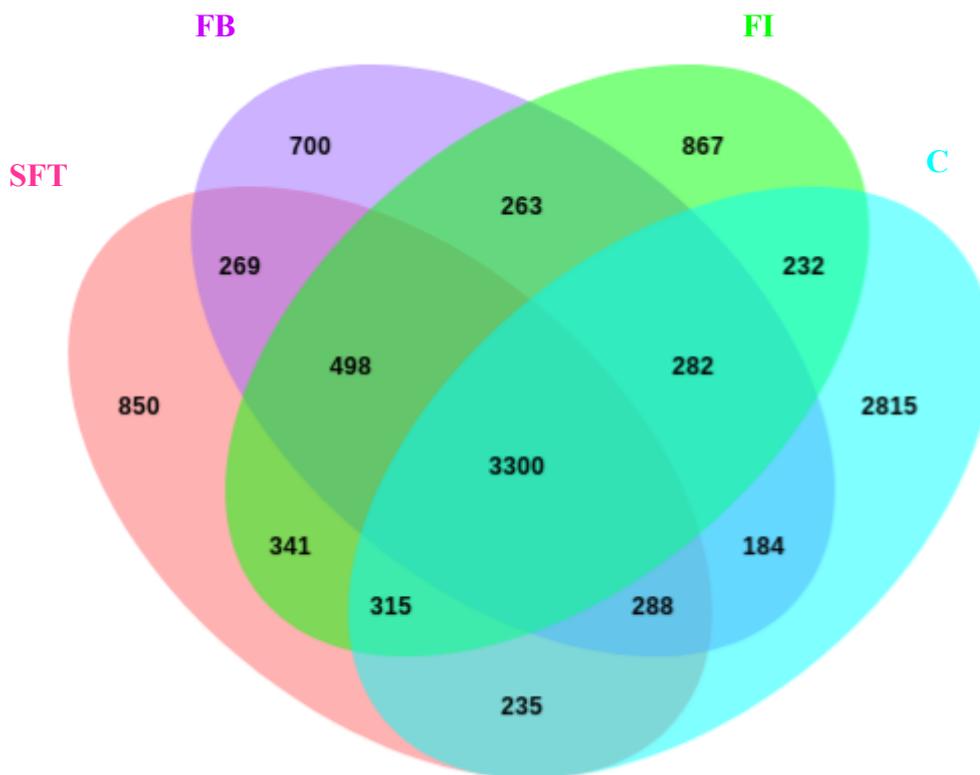


Figura 5 – Diagrama de *Venn* com número de espécies distribuídas entre as fontes de adubação fosfatada de solo rizosférico de milho. Valores fora das interseções representam riqueza de espécies e o número na interseção corresponde às espécies que co-ocorrem em ambas as fontes de adubação. Controle: sem fonte de fósforo; FB: fósforo reativo Bayóvar; FI: fósforo de rocha Itafós; SFT: Super Fósforo Triplo.

A classificação taxonômica para o solo não rizosférico (*bulk soil*) a nível de gênero identificou 241 gêneros bacterianos, mas adotando um valor de abundância superior a 2% foram encontradas diferenças estatísticas significativas somente para 12 gêneros (Figura 6). Além da diferença de solubilidade, a composição química destas rochas pode ter gerado esta

diferença na diversidade dos grupos taxonômicos e na abundância. Isso pode explicar a diferença de diversidade associada à abundância, separando as comunidades bacterianas pelo tipo de fonte de fosfato de rocha utilizada, como discutido anteriormente.

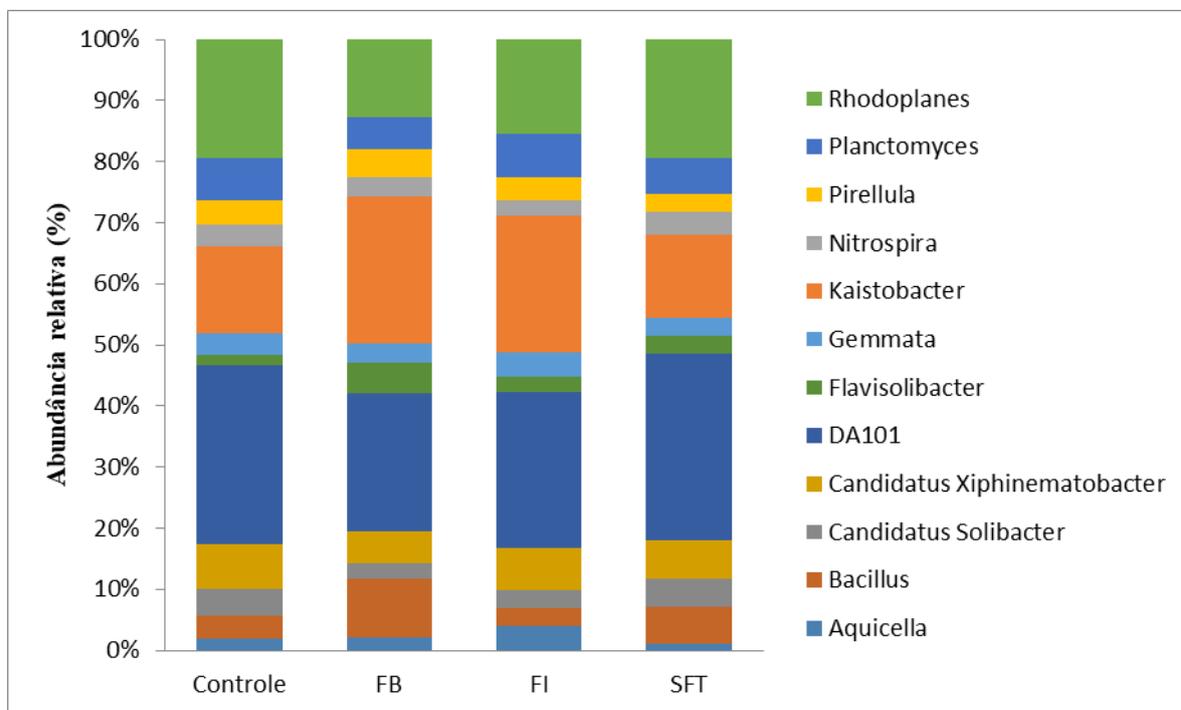


Figura 6– Abundância relativa dos gêneros de bactéria presentes nas amostras de solo não rizosférico de milho. Resultado de três repetições por amostra. Controle: sem fonte de fosfato; FB: fosfato reativo Bayóvar; FI: fosfato de rocha Itafós; SFT: Super Fosfato Triplo.

Por meio da análise de variância identificou-se 10 gêneros com abundância significativamente diferente entre os tratamentos (Figura 7) para o solo não rizosférico. Observou-se, estatisticamente, aumento significativo dos gêneros *Paenibacillus*, *Salinibacterium*, *Sphingomonas* e *Sporosarcina* no tratamento com fosfato Bayóvar quando comparado aos demais fosfatos utilizados neste trabalho (Figura 8).

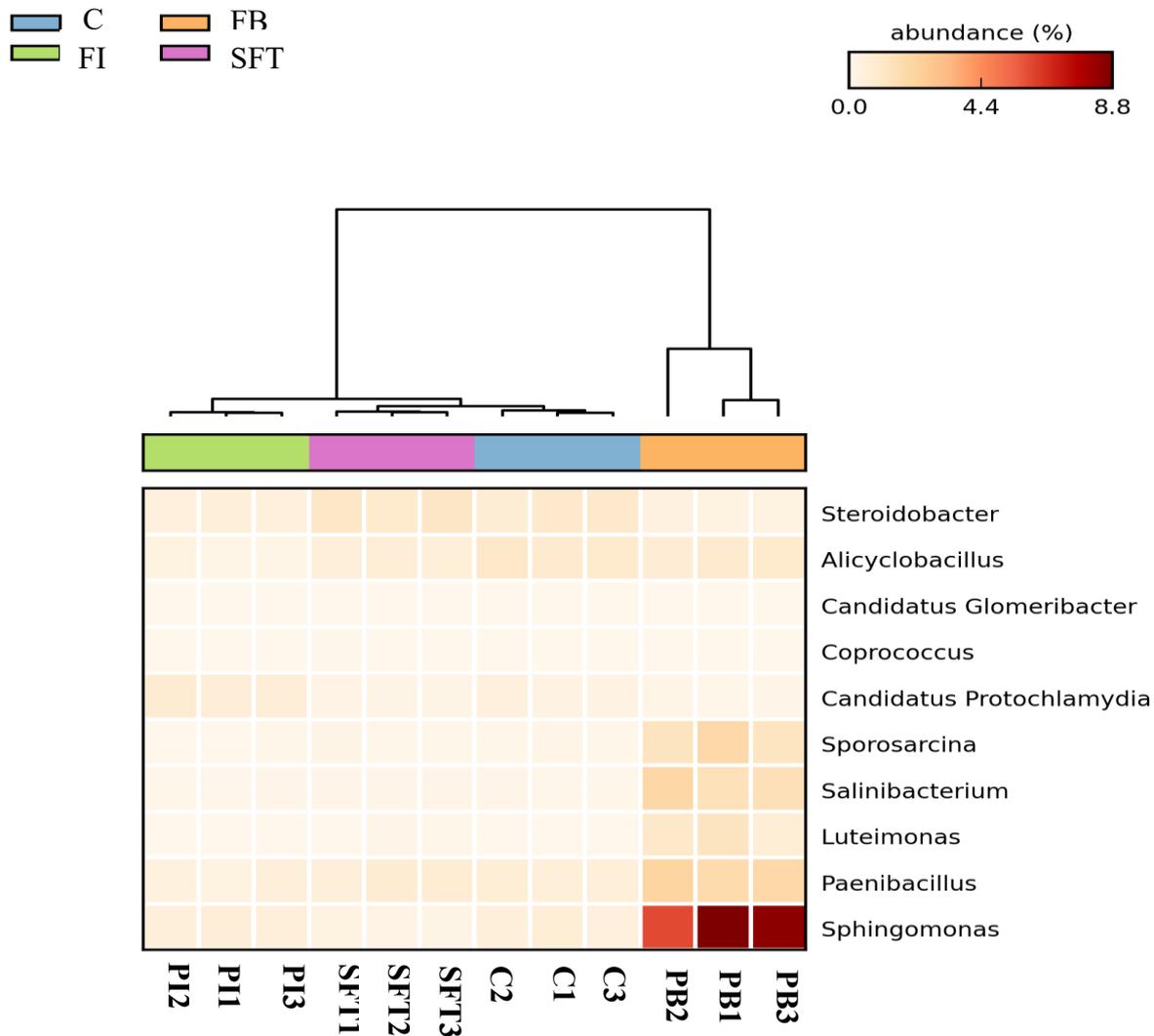


Figura 7 – Gêneros que apresentaram diferença significativa para abundância, entre as fontes de adubação em solo não rizosférico (*bulk soil*) de milho, pelo teste de Tukey Kramer ($p < 0,05$). Resultado de três repetições por amostra. Controle: sem fonte de fósforo; FB: fósforo reativo Bayóvar; FI: fósforo de rocha Itafós; SFT: Super Fósforo Triplo.

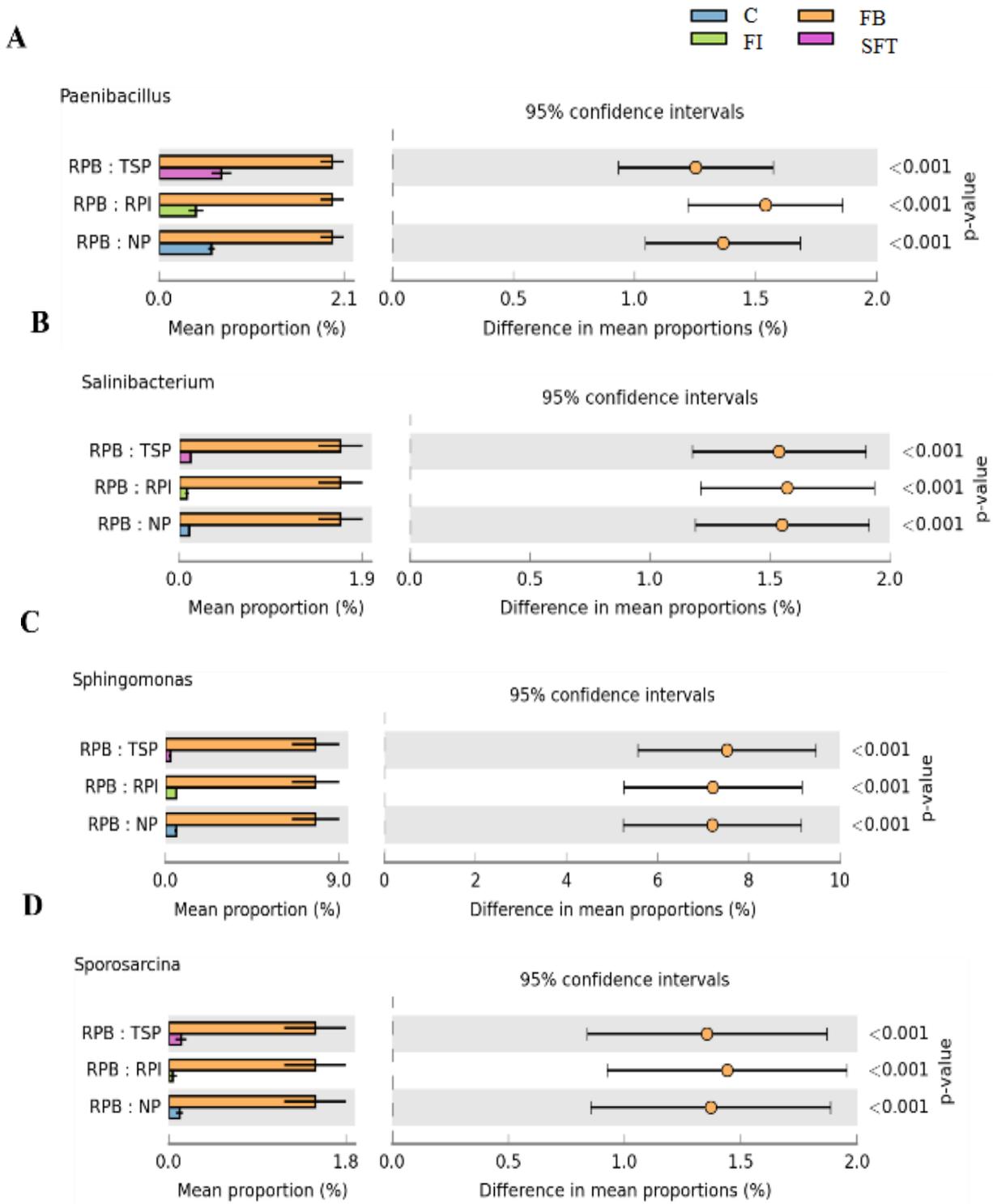


Figura 8 – Gêneros que apresentaram diferença significativa na sua abundância, entre as fontes de adubação de solo não rizosférico (*bulk soil*) de milho, pela análise de variância com teste post-hoc de Tukey Kramer ($p < 0,05$). São apresentados os valores da média e desvio padrão para cada gênero. Controle: sem fonte de fósforo; FB: fósforo reativo Bayóvar; FI: fósforo de rocha Itafós; SFT: Super Fósforo Triplo.

Observou-se uma tendência de agrupamento das amostras de *bulk soil* por tratamento na análise de componentes principais (PCA), o que sugere uma diferenciação das comunidades bacterianas como resultado do manejo das fontes de adubação. Assim, o eixo PC1 (variável fonte de adubação/fósforo) explicaria 71,9% das variações na comunidade bacteriana a nível de gênero (Figura 9).

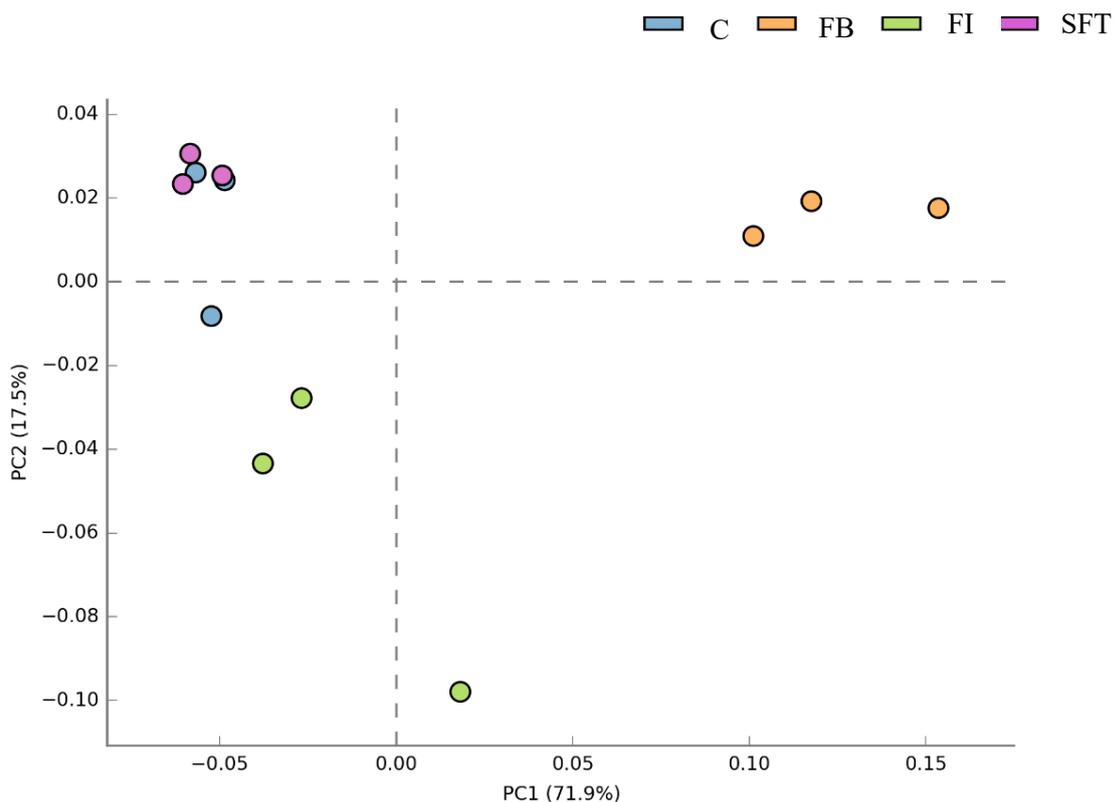


Figura 9 – Análise de componentes principais (PCA) dos gêneros das comunidades bacterianas presentes no solo não rizosférico (*bulk soil*) de milho sob manejo de adubação fosfatada. A figura foi construída empregando o método de distância Bray-Curtis e representa a distância filogenética entre amostras, ou seja, quanto mais próximas duas amostras significa que sua composição bacteriana é muito semelhante. Controle: sem fonte de fosfato; FB: fosfato reativo Bayóvar; FI: fosfato de rocha Itafós; SFT: Super Fosfato Triplo.

Referente aos indicadores de biodiversidade da comunidade bacteriana, não foi observada diferença significativa para riqueza entre os tipos de fosfatos utilizados para adubação. Adicionalmente, análises do *core* da microbiota mostraram 1.132 OTUs no tratamento FI e 2.827 OTUs compartilhadas para os demais fosfatos utilizados neste trabalho (Figura 10). Cada OTU pode ser considerada como um táxon único.

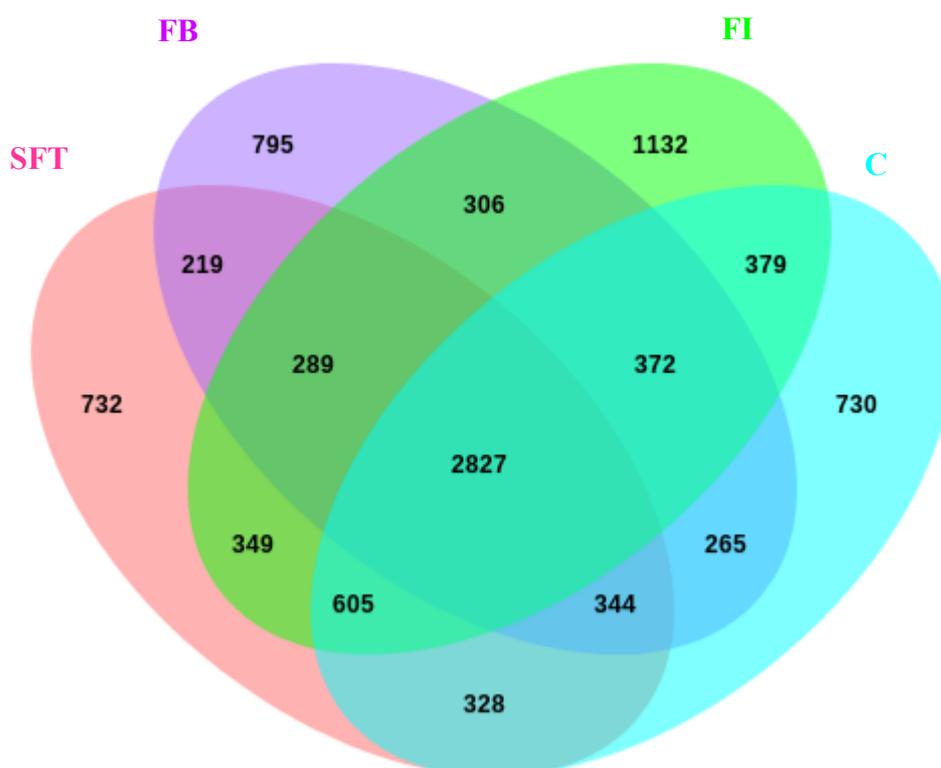


Figura 10 – Diagrama de *Venn* com número de espécies distribuídas entre as fontes de adubação fosfatada de solo rizosférico de milho. Valores fora das interseções representam riqueza de espécies e o número na interseção corresponde às espécies que co-ocorrem em ambas as fontes de adubação. Controle: sem fonte de fosfato; FB: fosfato reativo Bayóvar; FI: fosfato de rocha Itafôs; SFT: Super Fosfato Triplo.

De acordo com os resultados obtidos, pôde-se observar a formação de dois grupos distintos separando a comunidade microbiana dos solos rizosférico (Figura 3) e não rizosférico (Figura 8), considerando as métricas avaliadas. Esses resultados sugerem que tanto

a riqueza quanto a abundância relativa de OTUS observadas são similares em cada um dos grupos formados, considerando as afiliações filogenéticas e abundância relativa das OTUS, quanto à presença de táxons únicos, embora tenha sido observado uma abundância superior no *bulk soil*. Uma alta diversidade genotípica de populações de bactérias ambientais tem sido encontrada tanto no nível similaridade de sequência entre os genes compartilhados quanto no nível do conteúdo genético (Fraser et al., 2009; Cordero & Polz, 2014), não se restringindo a regiões específicas como a rizosfera, como os dados encontrados neste trabalho. De forma geral, a região rizosférica do milho comporta maior abundância de grupos de bactérias quando comparada com a região não rizosférica (Peiffer et al, 2013).

Como já discutido no capítulo 3 deste trabalho, a influência que as raízes exercem sobre a comunidade bacteriana está associada à liberação de mucilagem e exsudados, como ácidos orgânicos (Peiffer et al, 2013; Johnston-Monje et al., 2016) que podem ser utilizados pelos micro-organismos e dessa forma, interferir na estruturação da comunidade microbiana da região rizosférica (Zahar et al., 2012). Porém, a diminuição da riqueza de bactérias na região da rizosfera tem sido descrita (Peifer et al, 2013; Pan et al, 2014), o que sugere uma possível seleção de espécies microbianas pelas plantas.

4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados da análise de diversidade da comunidade microbiana associada ao milho cultivado sob distintas fontes de fosfato, observamos abundância de táxons bacterianos relacionados à solubilização de fósforo no solo fertilizado por fosfato de rocha.

A riqueza estimada variou significativamente para a rizosfera e *bulk soil*.

A rizosfera e o *bulk soil* apresentaram uma diversidade para a comunidade microbiana.

O manejo de adubação fosfatada selecionou espécies bacterianas de acordo com as regiões rizosféricas e não rizosféricas de milho, mas não limitou e/ou condicionou sua riqueza e diversidade a essas regiões.

5. PERSPECTIVAS

Temos como perspectiva dar continuidade às linhas de pesquisa aqui iniciadas, assim como finalizar a validação das cepas isoladas por técnicas de identificação morfológicas e moleculares. Para tanto, as perspectivas são:

Capítulo I: realizar o sequenciamento dos isolados fúngicos e bacterianos, realizar um *screening* para a biossolubilização de fósforo.

Capítulo II: correlacionar os resultados de atividade enzimática com os dados de produtividade de grãos.

Capítulo III: realizar o sequenciamento dos isolados bacterianos.

Capítulo IV: finalizar o *pipeline* para a região ITS e comparar os resultados com os encontrados para a região 16S, correlacionar ambos os resultados com dados de produtividade e solubilização de fósforo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, C.S.; FIGUEIREDO, J.E.; OLIVEIRA, C.A.; DOS SANTOS, V.L.; GOMES, E.A.; RIBEIRO, V.P.; BARROS, B.A.; LANA, U.G.; MARRIEL, I.E. Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. *Genetics and Molecular Research*, v.16, n.1, p. 1-13, 2017.

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews*, v.59, p.143-169, 1995.

BOGINO, P.C.; OLIVA, M.D.L.M.; SORROCHE, F.G.; GIORDANO, W. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *International Journal of Molecular Sciences*, v.14, n.8, p.15838–15859, 2013.

BULGARELLI, D.; GARRIDO-OTER, R.; MÜNCH, P. C.; WEIMAN, A.; DRÖGE, J.; PAN, Y.; MCHARDY, A.C.; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell host & microbe*, v.17, n.3, p.392-403, 2015.

CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; COSTELLO, E.K.; FIERER, N.; PEÑA, A.G.; GOODRICH, J.K.; GORDON, J.I.; HUTTLEY, G.A.; KELLEY, S.T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J.E.; LEY, R.E.; LOZUPONE, C.A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B.D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J.R.; TURNBAUGH, P.J.; WALTERS, W.A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, v.7, p.335-336, 2010.

CAPORASO, J.G.; LAUBER, C.L.; WALTERS, W.A.; BERG-LYONS, D.; LOZUPONE, C.A.; TURNBAUGH, P.J.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the national academy of sciences*, v.108, p.4516-4522, 2011.

CORDERO, O. X.; POLZ, M. F. Explaining microbial genomic diversity in light of evolutionary ecology. *Nature Reviews Microbiology*, v.12, p.263-273, 2014.

FERREIRA, D.F. *SISVAR – Sistema de análise de variância*. Versão 5.3, Lavras – MG, Universidade de Lavras, UFLA, 2010.

FIERER, N.; LEFF, J. W.; ADAMS, B. J.; NIELSEN, U. N.; BATES, S. T.; LAUBER, C. L.; OWENS, S.; GILBERT, J.A.; WALL, D.H.; CAPORASO, J. G. Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.109, n.52, p.21390-21395, 2012.

FRASER, C.; ALM, E. J.; POLZ, M. F.; SPRATT, B. G.; HANAGE, W. P. The bacterial species challenge: making sense of genetic and ecological diversity. *Science*, v.323, p.741–746, 2009.

HEMME, C.L.; TU, Q.; SHI, Z.; QIN, Y.; GAO, W.; DENG, Y.; TRINGE, S.G. Comparative metagenomics reveals impact of contaminants on groundwater microbiomes. *Frontiers in microbiology*, v.6, n.1205, 2015.

JANG, G.; LEE, J.H.; RASTOGI, K.; PARK, S.; OH, S.H.; LEE, J.Y. Cytokinin-dependent secondary growth determines root biomass in radish (*Raphanus sativus* L.). *Journal of experimental botany*, v.66, n.15, p.4607-4619, 2015.

JOHNSTON-MONJE, D.; LUNDBERG, D.S.; LAZAROVITS, G.; REIS, V.M.; RAIZADA, M.N. Bacterial Populations in Juvenile Maize Rhizospheres Originate from Both Seed and Soil. *Plant and Soil*, v.405, p.337-355, 2016.

JURELEVICIUS, D.; ALVAREZ, V.M.; MARQUES, J.M.; DE SOUSA LIMA, L.R.F.; DE ALMEIDA DIAS, F.; SELDIN, L. Bacterial community response to petroleum hydrocarbon amendments in freshwater, marine, and hypersaline water-containing microcosms. *Applied and environmental microbiology*, v. 79, n.19, p. 5927-5935, 2013.

KAUR, G.; REDDY, M.S. Influence of P-solubilizing bacteria on crop yield and soil fertility at multilocational sites. *European Journal of Soil Biology*, v. 61, p.35-40, 2014.

KORNDÖRFER, G.H.; WALDO ALEJANDRO LARA-CABEZAS, W.A.; HOROWITZ, N. Eficiência agrônômica de fosfatos naturais reativos na cultura do milho. *Scientia agricola*, v.56, n.2, 1999.

LEITE, T.S.; FASSONI, A.C.; PEREIRA, O.L.; MIZUBUTI, E.S.G.; ARAÚJO, E.F.; QUEIROZ, M.V. Novel and highly diverse fungal endophytes in soybean revealed by the consortium of two different techniques. *Journal of Microbiology*, v.51,n.1, p. 56-69, 2013.

MAGURRAN, A. E. Measuring biological diversity. *Blackwell Science*, 2004.

MANZOOR, M.; ABBASI, M. K.; SULTAN, T. Isolation of phosphate solubilizing bacteria from maize rhizosphere and their potential for rock phosphate solubilization–mineralization and plant growth promotion. *Geomicrobiology Journal*, v.34, n.1, p.81-95, 2017.

MONTEIRO, C. M. Fosforitos do Grupo Bambuí na região de Campos Belos (GO)/Arraias (TO), na borda oeste do Cráton São Francisco. 2009. 150p. Dissertação -Universidade de Brasília, UnB, Brasília -DF.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2 edição, Atual e ampl. Lavras: Editora UFLA, 729p, 2006.

NAHAS, E.; CENTURION, J.F.; ASSIS, L.C. Microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases de vários solos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.18, p. 43-48, 1994.

NANNIPIERI, P.; GIAGNONI, L.; LANDI, L.; RENELLA, G. Role of Phosphatase Enzymes in Soil. In: Phosphorus in action. *Soil Biology*, v.100, p. 215-243, 2011.

NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J.; NUNES, F.N. Fósforo. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. *Fertilidade do solo*. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.471-537, 2007.

OLIVEIRA, C.A.; ALVES, V.M.; MARRIEL, I.E.; GOMES, E.A.; MUZZI, M.R.S.; CARNEIRO, N.P.; GUIMARAES, C.T.; SCHAFFERT, R.E; SÁ, N.M.H. Phosphate

solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biology and Biochemistry*, v.41, n.9, p.1782–1787, 2009.

PAN, Y.; CASSMAN, N.; DE HOLLANDER, M.; MENDES, L. W.; KOREVAAR, H.; GEERTS, R. H.; VAN VEEN, J.A.; KURAMAE, E. E. Impact of long-term N, P, K, and NPK fertilization on the composition and potential functions of the bacterial community in grassland soil. *FEMS microbiology ecology*, v.90, n.1, p.195-205, 2014.

PARKS, D.H.; TYSON, G.W.; HUGENHOLTZ, P.; BEIKO, R.G. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*, v.30, p.3123-3124, 2014.

PEIFFER, J.A.; SPOR, A.; KOREN, O.; JIN, Z.; TRINGE, S.G.; DANGL, J.L.; BUCKLER, E.S.; LEY, R.E. Diversity and Heritability of the Maize Rhizosphere Microbiome under Field Conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.110, n.16, p.6548–6553, 2013.

RAIJ, B.V. Fósforo no solo e interação com outros elementos. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S.R.S., eds. *Fósforo na Agricultura Brasileira*. Piracicaba, Potafos, p.107-115, 2004.

RAJAPAKSHA, R.M.C.P.; HERATH, D.; SENANAYAKE, A.P.; SENEVIRATHNE, M.G.T.L. Mobilization of rock phosphate phosphorus through bacterial inoculants to enhance growth and yield of wetland rice. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, New York, v.42, p.301-314, 2011.

SANTOS, T.T.; VARAVALLO, M.A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v.32, n.2, p. 199-212, 2011.

SCHNEIDER, K.D.; VAN STRAATEN, P.; ORDUNÃ, R.M.; GLASAUER, S.; TREVORS, J.; FALLOW, D.; SMITH, P.S. Comparing phosphorus mobilization strategies using *Aspergillus niger* for the mineral dissolution of three phosphate rocks. *Journal of Applied Microbiology*, v.108, p.366-374, 2010.

SIERRA-GARCÍA, I.N.; ALVAREZ, J.C.; DE VASCONCELLOS, S.P.; DE SOUZA, A.P.; DOS SANTOS NETO, E.V.; DE OLIVEIRA, V.M. New Hydrocarbon Degradation Pathways in the Microbial Metagenome from Brazilian Petroleum Reservoirs. *PloS one*, v. 9, n.2, e90087, 2014.

SOUZA, R. M.; SOBRAL, L. F.; VIÉGAS, P. R. A.; OLIVEIRA JÚNIOR, A. D.; CARVALHO, M. D. Eficiência agronômica de fosfatos de rocha em solo com elevado teor de cálcio trocável. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, MG, v. 38, n. 6, p. 1816-1825, 2014.

TRINGE, S.G.; VON MERING, C.; KOBAYASHI, A.; SALAMOV, A.A.; CHEN, K.; CHANG, H.W.; BORK, P. Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, v. 308, n.5721, p. 554-557, 2005.

WU, J.; JIAO, Z.; ZHOU, J.; GUO, F.; DING, Z.; QIU, Z. Analysis of bacterial communities in rhizosphere soil of continuously cropped healthy and diseased konjac. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.33, n.7, p.134, 2017.

YILMAZ, P.; PARFREY, L.W.; YARZA, P.; GERKEN, J.; PRUESSE, E.; QUAST, C.; SCHWEER, T.; PEPLIES, J.; LUDWIG, W.; GLÖCKNER, F.O. The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research*, v.42, D643–D648, 2013.

ZAHAR HAICHAR, F.; MAROL, C.; BERGE, O.; RANGEL-CASTRO, J. I.; PROSSER, J. I.; BALESSENT, J.; ZAMIOUDIS, C.; PIETERSE, C. M. Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.25, n.2, p.139-150, 2012.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA E PARTICIPAÇÃO DE EVENTOS

✓BONIEK, DOUGLAS; DAMACENO, QUÉSIA SOUZA ; **DE ABREU, CRÍSIA SANTOS** ; DE CASTRO MENDES, ISOLDA ; DOS SANTOS, ANTÔNIO FERNANDO BATISTA ; DE RESENDE STOIANOFF, MARIA APARECIDA . Filamentous fungi associated with Brazilian stone samples: structure of the fungal community, diversity indexes, and ecological analysis. MYCOLOGICAL PROGRESS, v. 18, p. 565-576, 2019.

✓BONIEK, DOUGLAS; DAMACENO, QUÉSIA SOUZA ; **DE ABREU, CRÍSIA SANTOS** ; DE CASTRO MENDES, ISOLDA ; DOS SANTOS, ANTÔNIO FERNANDO BATISTA ; DE RESENDE STOIANOFF, MARIA APARECIDA. Correction to: Filamentous fungi associated with Brazilian stone samples: structure of the fungal community, diversity indexes, and ecological analysis. Mycological Progress, v. 18, p. 769-769, 2019.

✓BONIEK, DOUGLAS ; BONADIO, LUCIANA ; **DE ABREU, CRÍSIA SANTOS** ; SANTOS, ANTÔNIO FERNANDO BATISTA DOS ; DE RESENDE STOIANOFF, MARIA APARECIDA . Fungal bioprospecting and antifungal treatment on a deteriorated Brazilian contemporary painting. LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY, v. 1, p. 1-2, 2018.

✓**ABREU, C.S.**; BATISTA, F.C.; BONIEK, D.; OLIVEIRA, J.C.M.D.; OLIVEIRA, C.A.; GOMES, E.A.; LANA, U.G.P.; SANTOS, V.L.; RESENDE-STOIANOFF, M.A. Efeito da inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato sobre a atividade enzimática de fosfatases no cultivo de milho (*Zea mays*). In: IV Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2018, Belo Horizonte. Desafios atuais no Enfrentamento de Doenças Microbianas, 2018.

✓**ABREU, C.S.**; CONCEIÇÃO, R.R.P.; BONIEK, D.; OLIVEIRA, J.C.M.D.; OLIVEIRA, C.A.; GOMES, E.A.; LANA, U.G.P.; SANTOS, V.L.; RESENDE-STOIANOFF, M.A. Isolamento e seleção de micro-organismos rizosféricos de milho (*Zea mays*) eficientes na biossolubilização de fósforo. In: IV Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2018, Belo Horizonte. Desafios atuais no Enfrentamento de Doenças Microbianas, 2018.

✓**ABREU, C.S.**; BATISTA, F.C.; J.C.M.D.; Boniek, D.; Oliveira, C.A.; Gomes, E.A.; Lana, U.G.P.; Santos, V.L.; Stoianoff, M.A.R. Seleção de bactérias rizosféricas de milho eficientes

na biossolubilização de fosfato natural de Araxá. In: IV Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2017, Belo Horizonte. Metabolismo microbiano: saúde, ambiente e biotecnologia, 2017.

✓**ABREU, C.S.**; GOMES, E.A.; OLIVEIRA, J.C.M. LANA, U.G.P.; SANTOS, V.L.; GÓES-NETO, A.; STOIANOFF, M.A.R. Efeito da adubação fosfatada sobre a diversidade da comunidade bacteriana de milho. In: IV Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2017, Belo Horizonte. Metabolismo microbiano: saúde, ambiente e biotecnologia, 2017.

✓OLIVEIRA, J.C.M.D.; **ABREU, C.S.**; LANA, U.G.P.; FIGUEIREDO, J.E.F.; OLIVEIRA, C.A.; GOMES, E.A. ; RESENDE-STOIANOFF, M.A.; MARRIEL, I.E. Caracterização e identificação de actinobactérias de interesse biotecnológico isoladas de solo do Cerrado. In: IV Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2017, Belo Horizonte. Metabolismo microbiano: saúde, ambiente e biotecnologia, 2017.

✓BATISTA, F. C.; **ABREU, C. S.**; RIBEIRO, V. P.; FERNANDES, T.A.; OLIVEIRA, M.C.; OLIVEIRA, C.A. Iron phosphate solubilization and siderophore production by microorganisms isolated from maize. In: 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2017, Foz do Iguaçu. 60 anos da Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2017.

✓OLIVEIRA, J.C.M.D.; LANA, U.G.P.; FIGUEIREDO, J.E.F.; **ABREU, C.S.**; OLIVEIRA, C.A.; COTA, L.C.; GOMES, E. A.; RESENDE-STOIANOFF, M.A.; MARRIEL, I.E. Identification and *in vitro* antagonistic activity of actinobacteria against *Pantoea ananatis*, the causal agent of maize white spot disease. In: 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2017, Foz do Iguaçu. 60 anos as Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2017.

✓OLIVEIRA, J.C.M.D.; **ABREU, C.S.**; FIGUEIREDO, J.E.F.; LANA, U.G.P.; OLIVEIRA, C.A.; GOMES, E. A.; RESENDE-STOIANOFF, M.A.; MARRIEL, I.E. Characterization and phylogenetic affiliation of actinobacteria of biotechnological interest isolated from tropical soils. In: 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2017, Foz do Iguaçu. 60 anos as Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2017.

✓**ABREU, C.S.**; Gomes, E.A.; Oliveira, J.C.M.D.; Oliveira, C.A.; Morais, D.K.; Silva, U.C.; Santos, V.L.; Góes-Neto, A.; Figueiredo, J.E.F.; Resende-Stoianoff, M. A. Study on the

effects of mineral phosphate fertilizers on soil bacterial communities of tropical agroecosystems. In: 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2017, Foz do Iguaçu. 60 anos as Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2017.

✓**DE ABREU, C.S.**; FIGUEIREDO, J.E.F. ; OLIVEIRA, C.A. ; DOS SANTOS, V.L. ; GOMES, E.A. ; RIBEIRO, V.P. ; Barros, B.A. ; LANA, U.G.P. ; MARRIEL, I.E. . Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH, v. 16, p. 01-13, 2017.

✓**DORNELAS, J.C.M.** ; FIGUEIREDO, J.E.F. ; **DE ABREU, C.S.** ; LANA, U.G.P. ; OLIVEIRA, C.A. ; MARRIEL, I.E. Characterization and phylogenetic affiliation of Actinobacteria from tropical soils with potential uses for agro-industrial processes. GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH, v. 16, p. 1-16, 2017.

✓**ABREU, C. S.**; CAMPOS, M. S. ; OLIVEIRA, R. S. ; MARINS, M. S. ; GOMES, E.A. ; STOIANOFF, M. A. R. ; OLIVEIRA, C. A. . Efeito da adubação fosfatada sobre a população de micro-organismos solubilizadores e mineralizadores de fósforo isolados em rizosfera de milho. In: XXXI Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2016, Bento Gonçalves. Milho e Sorgo: inovações, mercados e segurança alimentar, 2016.

✓**ABREU, C. S.**; GOMES, E.A. ; OLIVEIRA, C. A. ; FIGUEIREDO, J.E.F. ; SANTOS, V. L. ; MARRIEL, I.E. Produção de ácidos orgânicos por bactérias endofíticas de milho solubilizadoras de fosfato. In: XXXI Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2016, Bento Gonçalves. Milho e Sorgo: inovações, mercados e segurança alimentar, 2016.

✓**ABREU, C. S.**; MARRIEL, I.E. ; OLIVEIRA, C.A. ; RIBEIRO, V. P. ; Barros, B.A. ; Santos, V.L. . Biossolubilização de fósforo por bactérias endofíticas de milho. In: XXX Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2014, Salvador. Eficiência nas cadeias produtivas e abastecimento global, 2014.

✓**RIBEIRO, V. P.** ; MATTOS, B.B. ; **ABREU, C. S.** ; Almeida, C.N.S. ; OLIVEIRA, C.A. ; MARRIEL, I.E. Seleção de microrganismos endofíticos de milho (*Zea mays* L.) produtores de fitohormônios. In: XXX Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2014, Salvador. Eficiência nas cadeias produtivas e abastecimento global, 2014.

✓BATISTA, A.M. ; Guieiro, C.S.M. ; MATTOS, B.B. ; **ABREU, C. S.** ; Gontijo Neto, Miguel Marques ; MARRIEL, I.E. Rotações culturais influenciam a qualidade biológica do solo sob o sistema de integração lavoura-pecuária. In: XXX Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2014, Salvador. Eficiência nas cadeias produtivas e abastecimento global, 2014.

✓**ABREU, C. S.**; OLIVEIRA, C. A. ; FIGUEIREDO, J.E.F. ; TAVARES, A. N. G. ; GOMES, E.A. ; Santos, V.L. ; MARRIEL, I.E. ; STOIANOFF, M. A. R. Seleção e caracterização de bactérias endofíticas de milho com potencial para biossolubilização de fosfato. In: FertBio 2016, 2016, Goiânia. Rumo aos novos desafios, 2016.

✓**ABREU, C. S.**; MARINS, M. S. ; OLIVEIRA, R. S. ; CAMPOS, M. S. ; OLIVEIRA, C. A.; GOMES, E.A. ; Santos, V.L. ; MARRIEL, I.E. ; STOIANOFF, M. A. R. Atividade enzimática de fosfatases em solo cultivado com milho inoculado com micro-organismos solubilizadores de fosfato e adubado com fontes de fósforo de diferente solubilidade. In: FertBio 2016, 2016, Goiânia. Rumo a novos desafios, 2016.

✓**ABREU, C. S.**; OLIVEIRA, R. S. ; MARINS, M. S. ; GOMES, E.A. ; VERDOLIN, A. L. G. ; OLIVEIRA, C.A. ; FIGUEIREDO, J.E.F. ; Santos, V.L. ; LANA, U. G. P. ; MARRIEL, I.E. . Bactérias endofíticas de milho: diversidade e potencial para solubilização de fosfato. In: FertBio 2016, 2016, Goiânia. Rumo a novos desafios, 2016.

✓MARINS, M. S. ; OLIVEIRA, R. S. ; **ABREU, C. S.** ; OLIVEIRA, C. A. ; SOUZA, F. A. ; MARRIEL, I.E. ; MOREIRA, F. A. ; LAGO, R. M. . Atividade de micro-organismos solubilizadores de fosfato de ferro em resíduo industrial. In: FertBio 2016, 2016, Goiânia. Rumo aos novos desafios, 2016.

✓OLIVEIRA, R. S. ; MARINS, M. S. ; **ABREU, C. S.** ; OLIVEIRA, C. A. ; LANA, U.G.P. ; GOMES, E.A. Eficiência de assimilação de fosfatos orgânico e inorgânico por bactérias isoladas de milho. In: FertBio 2016, 2016, Goiânia. Rumo aos novos desafios, 2016.

✓GOMES, E.A. ; RIBEIRO, V.P. ; MARRIEL, I.E. ; **ABREU, C. S.** ; LANA, U.G.P. ; OLIVEIRA, C. A. Potencial biotecnológico de bactérias endofíticas de milho. In: FertBio 2016, 2016, Goiânia. Rumo aos novos desafios, 2016.