Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Influência da diversidade microbiana presente na rizosfera do milho na
disponibilização de fósforo

Yasmin Florentino Rodrigues

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2018

Yasmin Florentino Rodrigues
Engenheira Agrônoma

Influência da diversidade microbiana presente na rizosfera do milho na disponibilização
de fósforo

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:

Profa. Dra. **SIMONE RAPOSO COTTA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Rodrigues, Yasmin Florentino

Influência da diversidade microbiana presente na rizosfera do milho na disponibilização de fósforo / Yasmin Florentino Rodrigues. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011 - - Piracicaba, 2018.

75 p.

Dissertação (Mestrado)- - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Diversidade microbiana 2. Solubilização de fósforo 3. Mineralização de fósforo 4. Rizosfera I. Título

*A minha avó, **Avani Florentino**, pelo grande exemplo de ser humano que levo a cada momento de minha vida, em memória.*

DEDICO

*A algumas mulheres que me ensinaram, influenciaram e incentivaram a ser cada dia melhor, minha mãe guerreira **Marilú Florentino**, a minha querida professora **Júlia Kuklinsky** e a atenciosa professora **Simone Cotta**.*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, presente em minha vida e por ter escolhido tantas pessoas especiais para caminhar comigo.

A minha família, minha mãe Marilú Florentino, meu exemplo de garra e superação, meu irmão Moaby, minhas pequenas princesas Melissa e Melina, vocês são o motivo de cada conquista minha! Ao meu pai, Alípio Soares, por sempre estar me acompanhando e zelando quando preciso. A minha querida e linda avó, Avani Florentino, tudo que sou e quero ser me espelho em seus ensinamentos de bondade, humildade e caridade!

A professora Simone Raposo Cotta por toda paciência, parceria e dedicação, assim como ao Armando Dias que sempre me incentivaram e ensinaram conhecimentos valiosos durante esses 2 anos de mestrado. Aos dois, não tenho palavras para expressar minha gratidão!

Ao professor Fernando Andreote por toda ajuda e confiança na realização desse trabalho!

A professora Júlia Kuklinsky pelos inúmeros conselhos e cuidados, por ser a pessoa que me instigou à vida acadêmica e me proporcionou a vivência em uma grande família formada pelo Pet-Biotecnologia e LGBM.

A todos que fazem parte do Laboratório de Microbiologia do Solo ESALQ/USP, principalmente aos técnicos Sônia, Denise e Fernandinho que sempre me ensinaram com muito carinho. Aos amigos: Cátia, Julia, Alessandra, Victor, Tiago, Juliana, Doroteia, Kelly, Dani, Luana, Lucas, Michele, Caio, Felipe, Ana, Taketani, Polé, Maiele, Carol, Bruna e German.

A Bruninha, Thais e Will por toda contribuição na realização do fracionamento químico do fósforo.

Ao pessoal de Pernambuco que esteve ou ainda está na ESALQ, que me ajudam a lembrar de momentos tão sinceros e saudosos sejam eles do laboratório da professora Júlia ou do PET: Shilton, Pedro, Diogo, Arthur, Adjailton, Marquinhos, Caio, Lucianne, Melquiades, Everthon, Bruno e Isaneli.

Aos amigos que mesmo distante ainda me oferecem total apoio, força e companheirismo: Leandro, Alberto, Ruiva, Thuanny, Janaina, Jacy, Gessyka, Jesimiel, Claryssa, Clara, Jonathas e Rayana.

Aos amigos conquistados em Piracicaba sejam eles da ESALQ, Vila Estudantil, Gou, Rafá ou irmãos de ideal, meu muito obrigada, pelos momentos compartilhados e risadas garantidas. Em especial a Melina, Rony e Dani.

Ao amigo Antonio “Tony”, por toda e incansável ajuda durante o meu mestrado, na estatística, construção de gráficos e nos ensinamentos diversos, além da linda amizade. Assim como a Aline por todos os dias de irmandade e presença constante, vocês são presentinhos de Piracicaba.

Ao DVATCOM pela oportunidade de moradia na Vila Estudantil e por todo apoio prestado.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa.

Aos que fazem a Escola de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao curso de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade na realização desse trabalho.

A todos os meus sinceros agradecimentos!

"Meu Deus, que maravilhas existem em uma criatura tão pequena!"

Leeuwenhoek, 1693.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS	11
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 SERVIÇOS ECOSISTÊMICOS ASSOCIADOS À DIVERSIDADE MICROBIANA (<i>DIVERSITY-MEDIATED ECOSYSTEM FUNCTIONING</i>)	15
2.2 A IMPORTÂNCIA DO FÓSFORO	16
2.3 DISPONIBILIDADE DO FÓSFORO PELOS MICRORGANISMOS.....	17
3. OBJETIVO	21
3.1 OBJETIVO GERAL:	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	21
4 HIPÓTESES	23
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO SOLO UTILIZADO NO EXPERIMENTO	25
5.2 ALTERAÇÃO DOS NÍVEIS DA DIVERSIDADE MICROBIANA	25
5.3 INOCULAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA EM SOLO	25
5.4 ADUBAÇÃO FOSFATADA	25
5.5 MATERIAL VEGETAL (MILHO).....	26
5.6 DESENHO EXPERIMENTAL	26
5.7 ANÁLISES LABORATORIAIS – SOLO	27
5.7.1 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DO SOLO	27
5.7.2 ESTRUTURA DA COMUNIDADE DE BACTÉRIAS POR PCR-DGGE.....	27
5.7.3 QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS POR PCR EM TEMPO REAL	28
5.7.4 DETECÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO SOLO: FOSFATASE NOS PH 6,5 E 11,0	29
5.7.5 DETECÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA FITASE	29
5.7.6 DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO	30
5.7.7 FRACIONAMENTO QUÍMICO DO FÓSFORO	30
5.8 ANÁLISES LABORATORIAIS – MATERIAL VEGETAL.....	31
5.8.1 MEDIDAS DE CRESCIMENTO DAS PLANTAS	31
5.8.2 COMPRIMENTO ESPECÍFICO RADICULAR	31
5.8.3 MEDIDAS DO TEOR DE FÓSFORO NOS TECIDOS VEGETAIS (PARTE AÉREA E RAIZ).....	31
5.9 ANÁLISES DOS DADOS OBTIDOS.....	31
6 RESULTADOS.....	33
6.1 SOLO	33
6.1.1 ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA E SOLUBILIZADORA DE FÓSFORO	33
6.1.2 ABUNDÂNCIA DA COMUNIDADE BACTERIANA TOTAL E SOLUBILIZADORA DE FÓSFORO	35
6.1.3 MEDIDA DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	37
6.1.4 AMPLITUDE E ESTRUTURA DOS NICHOS OCUPADOS.....	41
6.1.5 FRACIONAMENTO QUÍMICO DO P NO SOLO	46
6.2 MATERIAL VEGETAL	50
6.2.1 OBSERVAÇÕES VISUAIS DAS PLANTAS	50
6.2.2 COMPRIMENTO DA PARTE AÉREA E RADICULAR	51
6.2.3 MATÉRIA SECA DA PARTE AÉREA E RADICULAR	52
6.2.4 COMPRIMENTO ESPECÍFICO RADICULAR.....	53
6.2.5 TEOR DE FÓSFORO NA PLANTA	54
7 DISCUSSÃO.....	57
8 CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS.....	63
APÊNDICES	73
ANEXO.....	75

RESUMO

Influência da diversidade microbiana da rizosfera de milho na disponibilização de fósforo

O uso de microrganismos como promotores de crescimento vegetal tem se apresentado como uma alternativa promissora, sobretudo para a ciclagem de nutrientes, especialmente o fósforo. Dessa forma, objetivou-se avaliar o papel da diversidade microbiana na disponibilização do fósforo, oriundo de fontes de diferente solubilidade, para as plantas de milho no ambiente rizosférico. A hipótese é que quanto mais diverso for o microbioma da rizosfera e do solo, maior será a disponibilidade de fósforo para as plantas e por conseguinte melhor o seu desenvolvimento. O experimento foi instalado em casa de vegetação utilizando a metodologia de diluição para extinção. Foram estabelecidos três fontes de fósforo (superfosfato triplo, fitato de cálcio e fosfato de Araxá) em um gradiente de diversidade microbiana, correspondentes às diluições 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-6} e 10^{-9} . Adicionalmente foi mantido um tratamento controle sem adição de fósforo (P) e todas as análises compreendiam o ambiente solo e rizosfera. O papel da diversidade microbiana frente a disponibilidade de P foi acessado por meio de metodologias dependentes de cultivo (BIOLOG) e metodologias independente de cultivo (qPCR e PCR-DGGE). As plantas adubadas com fosfato de Araxá apresentaram menor teor de P foliar e os sintomas mais severos de deficiência de P (raquitismo e arroxamento), sobretudo nas maiores diluições (menor diversidade). O percentual de P-lábil em relação ao P-total foi bastante variável entre as diluições dentro de cada fonte e ambiente avaliado. Entretanto, o tratamento adubado com fosfato de Araxá apresentou menor proporção de P-lábil (18-55%). Em relação ao gene *phoD*, no ambiente rizosfera as comunidades menos diversas apresentaram maiores números de cópia nos tratamentos, indicando que a abundância deste gene pode ter sido enriquecida nos tratamentos menos diversos. A atividade enzimática (principalmente para a fosfatase em pH 6,5) diminuiu frente a redução da diversidade da comunidade microbiana. A abundância do gene *phoD* e a atividade da fosfatase em pH 6,5 se relacionaram apenas no ambiente rizosférico. A estrutura e organização da comunidade bacteriana (gene *rrs*) e solubilizadora de fósforo (*phoD*) diferiram entre as diluições ($R > 0,75$; $p < 0,05$). Em relação ao perfil de consumo de fontes de carbono, as fontes avaliadas apresentaram perfis distintos entre si. Foi possível observar que as fontes de fósforo foram mais atuantes do que o gradiente de diversidade no processo de disponibilidade de P para as plantas. Isso pode estar relacionado à redundância funcional da microbiota.

Palavras-chave: Diversidade microbiana; Solubilização de fósforo; Mineralização de fósforo; Rizosfera

ABSTRACT

Influence of microbial diversity of maize rhizosphere in the availability of phosphorus

The use of microorganisms as promoters of plant growth has been presented as a promising alternative, especially for the cycling of nutrients, especially phosphorus. The objective of this study was to evaluate the role of microbial diversity in the availability of phosphorus from sources of different solubility for maize plants in the rhizospheric environment. The hypothesis is that as more diverse the rhizosphere and soil microbiome, the greater will be the availability of phosphorus to the plants and therefore better their development. The experiment was installed in a greenhouse using the dilution methodology for extinction. Three sources of phosphorus (triple superphosphate, calcium phytate and Araxá phosphate) were established in a microbial diversity gradient, corresponding to the dilutions 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-6} and 10^{-9} . In addition, a control treatment was maintained without addition of P and all analyzes comprised the soil and rhizosphere environment. The role of microbial diversity against P availability was accessed through culture - dependent methodologies (BIOLOG) and independent culture methodologies (qPCR and DGGE). Araxá phosphate fertilized plants had lower leaf P content and P deficiency symptoms (rickets and purplishness), especially in the higher dilutions (lower diversity). The percentage of P-labile in relation to the P-total was quite variable between the dilutions within each source and evaluated environment. However, the Araxá phosphate fertilizer treatment had a lower proportion of P-labile (18-55%). In relation to the *pboD* gene, in the environment rhizosphere in the less diverse communities presented higher copy numbers in the treatments, indicating that the abundance of the gene may have been enriched in the less diverse treatments. Enzymatic activity (mainly for phosphatase at pH 6.5) decreased as the diversity of microbial community decreased. The abundance of the *pboD* gene and phosphatase activity at pH 6.5 were related only in the rhizosphere environment. The structure and organization of the bacterial community (16S rRNA) and phosphorus solubilizer (*pboD*) differed at the dilutions ($R > 0.75$; $p < 0.05$). The consumption of carbon source was variable in relation to evaluated treatments. It was possible to observe that the phosphorus sources were more active than the diversity gradient in the P availability process for the plants. This may be related to the functional redundancy of the microbiota.

Keywords: Microbial diversity; Phosphorus solubilization; Phosphorus mineralization; Rhizosphere

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Croqui do desenho experimental. Imagem do milho colorido representa vasos com planta de milho. Imagem do milho cinza representa vasos sem a planta de milho. 27
- Figura 2. Análise de coordenadas principais (PCoA) dos perfis de bandas do gene *rrs* do rRNA 16S referente aos diferentes tratamentos: A, tempo zero (início). B, Fosfato de Araxá. C, Fitato de cálcio e D, Superfosfato triplo..... 34
- Figura 3. Análise de coordenadas principais (pcoa) dos perfis de bandas do gene *phoD* referente aos diferentes tratamentos: A, tempo zero (início). B, Fosfato de Araxá. C, Fitato de cálcio e D, Superfosfato triplo. 35
- Figura 4. Abundância do gene *rrs* do rRNA 16S. Letras maiúsculas comparam as diluições dentro do mesmo ambiente (solo e rizosfera) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam as diluições dentro dos diferentes ambientes (solo x rizosfera) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%..... 36
- Figura 5. Abundância do gene *phoD*. Letras maiúsculas comparam as diluições dentro do mesmo ambiente (solo e rizosfera) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam as diluições dentro dos diferentes ambientes (solo x rizosfera) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%..... 37
- Figura 6. Atividade da fosfatase em pH 6,5, segundo Tabatabai e Bremner (1969). Letras maiúsculas comparam as diluições dentro do mesmo ambiente (solo e rizosfera) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam as diluições dentro dos diferentes ambientes (solo x rizosfera) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%. 38
- Figura 7. Atividade da fosfatase em pH 11,0, segundo Tabatabai e Bremner (1969). Letras maiúsculas comparam as diluições dentro do mesmo ambiente (solo e rizosfera) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam as diluições dentro dos diferentes ambientes (solo x rizosfera) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%. 39
- Figura 8. Atividade da fitase, segundo Ames (1966) e Chen et al. (2006). Letras maiúsculas comparam as diluições dentro do mesmo ambiente (solo e rizosfera) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam as diluições dentro dos diferentes ambientes (solo x rizosfera) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%. 40
- Figura 9. Regressão linear entre o número de cópias do gene *phoD* com: a atividade da fosfatase em pH 6,5 no tratamento adubado com Fosfato de Araxá (A), no tratamento adubado com Fitato de cálcio (B) e no tratamento adubado com Superfosfato triplo (C). Regressão linear entre o número de cópias do gene *phoD* com: a atividade da fosfatase em pH 11,0 no tratamento adubado com Fosfato de Araxá (D), no tratamento adubado com Fitato de cálcio (E) e no tratamento adubado com Superfosfato triplo (F)..... 41
- Figura 10. Número de fontes de carbono. Letras maiúsculas comparam as diluições dentro do mesmo ambiente (solo e rizosfera) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam as diluições dentro dos diferentes ambientes (solo x rizosfera) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%..... 42
- Figura 11. Distribuição espacial dos dados do BIOLOG por meio de análise de componentes principais (PCA). A) Rizosfera do tratamento Fosfato de Araxá; B) Solo do tratamento Fosfato de Araxá; C) Rizosfera do tratamento de Fitato de cálcio; D) Solo do tratamento de Fitato de cálcio..... 43
- Figura 12. Gráfico de calor (*Heatmap*) do consumo de fontes de carbono dos tratamentos adubados com Fitato de cálcio e Fosfato de Araxá. As fontes que apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% foram destacadas com um asterisco. 45
- Figura 13. Porcentagem do fósforo lábil e total presente no solo e rizosfera para o tratamento adubado com Fosfato de Araxá..... 46

Figura 14. Porcentagem do fósforo lábil e total presente no solo e rizosfera para o tratamento adubado com Fitato de cálcio.....	47
Figura 15. Porcentagem do fósforo lábil e total presente no solo e rizosfera para o tratamento adubado com Superfosfato triplo.	47
Figura 16. Fósforo lábil presente no solo e rizosfera. Letras maiúsculas comparam as diluições dentro do mesmo ambiente (solo e rizosfera) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam as diluições dentro dos diferentes ambientes (solo x rizosfera) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%.....	48
Figura 17. Regressão linear entre a atividade da fosfatase em pH 6,5 e o p-lábil para os diferentes tratamentos.....	49
Figura 18. Regressão linear entre o P-lábil com o número de cópias do gene <i>pboD</i> nos diferentes tratamentos.....	49
Figura 19. Regressão linear entre o número de fontes de carbono consumidas e o P-lábil nos tratamentos adubados com Fosfato de Araxá (A) e com Fitato de cálcio (B).....	50
Figura 20. Comprimento Figura 20. Desenvolvimento das plantas aos 30 dias após a germinação e sintomas visuais da deficiência de fósforo. Fitato de cálcio (A), superfosfato triplo (B) e fosfato de Araxá (C).....	52
Figura 21. Comprimento da parte aérea e radicular aos 30 DAG das plantas de milho. Letras maiúsculas comparam as diluições dentro do mesmo ambiente (parte aérea e radicular) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam as diluições dentro dos diferentes ambientes (parte aérea x radicular) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%.	52
Figura 22. Matéria seca da parte aérea e radicular aos 30 DAG das plantas de milho. Letras maiúsculas comparam as diluições dentro do mesmo ambiente (parte aérea e radicular) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam as diluições dentro dos diferentes ambientes (parte aérea x radicular) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%.	53
Figura 23. Comprimento específico radicular aos 30 DAG das plantas de milho. Letras maiúsculas comparam as diluições dentro do mesmo ambiente nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%.	54
Figura 24. Fósforo da planta (parte aérea e radicular) aos 30 DAG. Letras maiúsculas comparam as diluições dentro do mesmo ambiente (parte aérea e radicular) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam as diluições dentro dos diferentes ambientes (parte aérea x radicular) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Consumo de fontes de carbono a partir do BIOLOG para o tratamento adubado com Fosfato de Araxá.	73
Tabela 2. Consumo de fontes de carbono a partir do BIOLOG para o tratamento adubado com Fitato de Cálcio.	74
Tabela 3. Análise química do solo	75

1. INTRODUÇÃO

A demanda pela implementação de um sistema produtivo e mais sustentável tem aumentado nos últimos anos devido à necessidade de aumentar a produção sem expandir a área produzida. A prestação de serviços ecossistêmicos pelos microrganismos do solo é peça-chave na promoção do crescimento das plantas.

O fósforo, junto com o nitrogênio, é um dos elementos que mais limitam o crescimento vegetal devido a sua alta adsorção nas partículas do solo, apresentando-se em baixas concentrações no solo para a absorção pelas plantas. Alguns grupos microbianos, como as bactérias, possuem a capacidade de disponibilizar esse elemento para as plantas por diferentes mecanismos (produção e secreção de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, sideróforos e enzimas extracelular) que melhoram a nutrição e o desenvolvimento de diversas culturas. Entretanto, quando isolados microbianos são inoculados em diferentes culturas em experimentos de campo, os efeitos observados em laboratório não são repetidos. Desta forma, os mecanismos que realmente promovem a melhora na captação de fósforo pela planta ainda não são totalmente conhecidos.

Uma possibilidade é que a disponibilização do fósforo seja resultado da diversidade do microbioma solo e das interações estabelecidas entre esses microrganismos (*diversity-mediated ecosystem functioning*) do que uma atividade restrita a apenas a ação de um único táxon microbiano. Estabelecendo essa correlação entre diversidade microbiana e disponibilização de fósforo, torna-se possível a utilização de metodologias que visam a manipulação de microbiomas, como por exemplo a diluição para extinção, que possibilita a observação da dinâmica destas relações, melhorando o desenvolvimento de plantas sem a adição de fertilizantes químicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Serviços ecossistêmicos associados à diversidade microbiana (*Diversity-mediated ecosystem functioning*)

A diversidade biológica é a base para a manutenção da funcionalidade dos ecossistemas, sendo esse assunto um tópico recorrente na literatura científica nos últimos anos, principalmente devido à intensificação da atividade antropogênica que promove a perda de várias espécies, levando a homogeneização dos grandes ecossistemas (WAGG et al., 2014). A diversidade de plantas de um sistema já foi descrita como essencial para a manutenção da funcionalidade do sistema. O impacto dessa diversidade não ficou restrito apenas a localidade avaliada (em uma pequena área amostral correspondente a 1 m² de solo) como também na área ao entorno (maior que 320 m² de solo) (HAUTIER et al., 2018), demonstrando a importância da manutenção da diversidade vegetal. Além disso, essa diversidade das plantas encontra-se positivamente correlacionada com os processos associados à produtividade primária, base para toda a cadeia trófica de um ecossistema (WARDLE, 2016). Apesar da importância inestimável da diversidade vegetal para o funcionamento dos ecossistemas, a maior parte da diversidade biológica encontra-se concentrada abaixo da superfície terrestre, nos solos (WAGG et al., 2014).

A diversidade microbiana possui papel fundamental no ambiente solo, pois é um fator considerado determinante para a produtividade e estabilidade do sistema, estando associada com processos de degradação de matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, controle de patógenos, produtividade primária, entre outros (DARDANELLI et al., 2010; TILMAN et al., 2014; FIERER, 2017; HU et al., 2018). Estima-se que em um grama de solo possam conter aproximadamente mil táxons microbianos distintos, sendo essa ampla diversidade representada por integrantes pertencentes aos três domínios da vida (Bacteria, Archaea e Eukarya) e também aos vírus (FIERER, 2017). Dentre os vários serviços ecossistêmicos microbianos, ressalta-se a ciclagem de nutrientes e consequentemente incremento na produtividade dos cultivos agrícolas, estes por sua vez capazes de possibilitar o nosso bem estar. Compreender os fatores que estão associados à produtividade da planta e a ciclagem de nutrientes nas mudanças do meio ambiente é crucial na tomada de decisão do manejo a ser utilizado (DELGADO-BAQUERIZO et al., 2016).

O conceito de funções ecossistêmicas e biodiversidade (*Biodiversity and Ecosystem Function*) explora a correlação entre a diversidade biológica nos diferentes níveis tróficos e o impacto dessa diversidade no funcionamento dos ecossistemas. Em relação aos solos, essa correlação entre os altos níveis de diversidade microbiana com a melhora na funcionalidade do sistema pode ser explicada por meio da complementariedade comportamental entre os organismos presentes nesse habitat, resultando no aproveitamento pleno dos recursos nutricionais disponíveis, acarretando numa melhora na ciclagem de nutrientes e no funcionamento do solo (GRIFFITHS et al., 2000; TILMAN et al., 2014; FOO et al., 2017).

A redução na presença e na abundância dos organismos do solo resulta no declínio de múltiplas funções dos ecossistemas principalmente devido à alteração no padrão de interações biológicas previamente estabelecidos, visto que a ocorrência de algumas funções é resultado do estabelecimento de complexas interações entre os diferentes organismos que são mantidas pelo alto índice de diversidade (GRIFFITHS et al., 2000; WAGG et al., 2014). Salles et al. (2009) encontrou uma correlação direta entre a diversidade de comunidades microbianas com o processo de desnitrificação. Quanto menor a riqueza/diversidade, menor era a eficiência na realização desse processo. O mesmo já foi observado em relação à invasão de patógenos no solo. Quanto maior a diversidade da comunidade do solo, menor a taxa de invasão do patógeno (VAN ELSAS et al., 2012). Porém, cabe ressaltar que alguns processos podem ser enriquecidos em ambientes com baixa diversidade (SALLES et al., 2009). Em relação a processos menos explorados, como a dinâmica de fósforo (P) no solo, são poucas as informações disponíveis a respeito do impacto da diversidade microbiana nos processos associados à disponibilização de P para as plantas.

2.2 A importância do fósforo

O fósforo (P) é um componente integrante de todas as células, sendo encontrado na composição da membrana celular, intermediários da respiração e também como componente de nucleotídeos utilizados no metabolismo energético, como ATP e no DNA/RNA (TAIZ; ZEIGER, 2013). Junto com o nitrogênio, é um dos principais elementos que limitam o desenvolvimento das plantas e, apesar de ser encontrado em grandes quantidades nos solos, a maior parte encontra-se indisponível para as plantas, sendo considerado o elemento menos prontamente disponível na rizosfera (PAVINATO et al., 2017).

O P pode ser encontrado no solo sob duas formas principais: forma orgânica (Po) e inorgânica (Pi). O Po pode representar de 20 a 80% do P total do solo, enquanto que o Pi está presente em baixa concentração na solução do solo. Para que o P seja absorvido pelas plantas é fundamental que ocorra a dessorção do P-lábil pelos processos de mineralização do P (relativo à fração orgânica) ou a solubilização do P (relativo à fração inorgânica) da fração não disponível (BRADY; WEIL, 2013).

A baixa disponibilidade do fósforo está associada à alta capacidade de adsorção da sua forma inorgânica (Pi) (forma mais absorvida pelas plantas) nos colóides do solo e sua retenção na fração orgânica, encontrando-se normalmente retido na biomassa (RICHARDSON; SIMPSON, 2011; DeLUCA et al., 2015). Como a maioria dos solos brasileiros são altamente intemperizados, ricos em óxidos de ferro (Fe) e alumínio (Al), grandes quantidades de insumos são amplamente aplicados para superar a rápida imobilização do P inorgânico e garantir que a planta receba as doses necessárias de P para o seu desenvolvimento (ROY et al., 2016).

Cerca de 60% do fertilizante inorgânico de fósforo usado na agricultura brasileira é importado, muito embora existam reservas de rocha fosfática no Brasil. Questões associadas à logística, danos ambientais e tributárias inviabilizam a exploração destas reservas em curto prazo de tempo (ANDA, 2017;

OGASAWARA et al., 2010). Diversas fontes de fertilização podem ser utilizadas, sendo essas fontes de solubilidade variada devido a sua composição química. A principal variação na composição química dos fertilizantes utilizados diz respeito ao íon acompanhante e os seus diferentes níveis de solubilidade (ROTILI et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2017).

Estima-se que 95% do P utilizado no Brasil derivam de fontes industrializadas solúveis em água, o que apresenta elevada eficiência em diversas condições de solo e cultura (SOUSA et al., 2010; CRUZ, 2015). Um dos principais fertilizantes utilizados atualmente é o superfosfato triplo (41% P_2O_5), que é obtido a partir do tratamento de rochas apatitas com ácido fosfórico (H_3PO_4), onde o composto solúvel P_2O_5 é prontamente disponível para as plantas. Outras rochas fosfáticas podem ser tratadas, por exemplo, com ácido sulfúrico, dando origem a outras fontes inorgânicas de fósforo (NOVAIS et al., 2007; SOUSA et al., 2010; CHIEN et al., 2011; CRUZ, 2015).

Dentre as fontes de solubilidade média e lenta, citam-se o fitato de cálcio e o fosfato de Araxá, respectivamente. O fitato de cálcio (19,5% P_2O_5) é considerado uma fonte de fósforo orgânico, encontrando-se sob a forma de fosfatos de inositol nos solos. Essa fração orgânica do solo representa de 15% a 80% do fósforo total no solo, possuindo grande importância em solos de regiões tropicais (ROSSI, 2013). A disponibilização de fósforo oriundo do fitato de cálcio para as plantas pode chegar até a 43% em solos sem adição de fertilizantes fosfatados (GATIBONI et al., 2007; ROSSI, 2013). O fitato de cálcio pode ser considerado, através da decomposição microbiana, uma excelente fonte de P para as plantas (CARDOSO et al., 2003; ZAIA et al., 2008; ROSSI, 2013).

O fosfato de Araxá (24% P_2O_5 e 4% solúvel em ácido cítrico 2%) é uma fonte inorgânica de fósforo, de origem ígnea, e baixa solubilidade devido a pouca capacidade de substituição isomórfica (HAMMOND et al., 1986). O fosfato de Araxá está incluso entre os fosfatos naturais aos quais se subdividem em reativos e pouco reativos e podem ou não exibir efeito residual em solos tropicais brasileiros (CAIONE et al., 2015; TELES et al., 2017). O fósforo presente no fosfato de Araxá está quimicamente complexado e para ser disponibilizado para a solução do solo é necessário a ação de metabólitos de baixo peso molecular (normalmente ácidos orgânicos), sobretudo de origem microbiana, processo conhecido como solubilização (REZA et al., 2016).

O fósforo é um elemento bastante interessante, pois existe um aporte constante e intenso de fósforo no solo por meio do uso de fertilizantes, tornando-se um problema ambiental e econômico, pois é oriundo de fontes finitas com elevado custo de obtenção (ROY et al., 2016). Portanto, estratégias para a utilização do fósforo de maneira mais eficiente e sustentável se tornarão cada vez mais importantes aos sistemas agrícolas no futuro (WITHERS et al., 2018).

2.3 Disponibilidade do Fósforo pelos microrganismos

Os microrganismos são componentes integrantes no ciclo do fósforo, por meio de mecanismos de solubilização e mineralização são capazes de converter o P inorgânico e orgânico, respectivamente, na

forma biodisponível, facilitando a absorção pelas raízes das plantas (KHAN et al., 2009). Algumas bactérias, como as do gênero *Burkholderia*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pantoea* e *Pseudomonas* são onipresentes, mas variam em densidade e potencial de solubilização do fósforo (SHARMA et al., 2013). Estas já foram descritas por apresentar a capacidade de se associar as plantas e estimular o seu desenvolvimento, atuando com eficiência na solubilização de fosfato (MARRA et al., 2012).

Entre os microrganismos solubilizadores, as bactérias são encontradas em maior número e, entre elas, as gram-negativas são mais eficientes em solubilizar fosfatos por meio da oxidação extracelular de glicose a ácido glucônico pela quinoproteína glicose desidrogenase (MASSENSINI et al., 2015). No solo, as bactérias solubilizadoras de P constituem 1-50% da população total, são geralmente isoladas de solos rizosféricos, filosfera e solo de área de depósito de rocha fosfática, até mesmo de solos sob condições de estresse, utilizando o método de diluição seriada ou por técnica de cultura de enriquecimento; a diversidade de bactérias é altamente variada em diferentes nichos ecológicos (ZAIDI et al., 2009; SHARMA et al., 2013).

Os principais mecanismos de solubilização de P exercidos pelos microrganismos do solo incluem: liberação de complexos ou compostos de dissolução mineral, por exemplo, ácidos orgânicos, sideróforos; liberação de enzimas extracelulares e a liberação de P durante a degradação do substrato. Portanto, microrganismos desempenham um papel importante em todos os três principais componentes do ciclo P do solo, isto é, dissolução - precipitação, sorção - dessorção e mineralização - imobilização (SHARMA et al., 2013).

A solubilização inorgânica realizada por microrganismos solubilizadores de P ocorre principalmente pela produção de ácidos orgânicos, quando o fósforo encontra-se complexado, por exemplo, ao íon fosfato (principal forma assimilável) e apresenta-se sob a forma de fosfato de cálcio, fosfato de ferro, fosfato de alumínio, rochas fosfáticas entre outros. A produção e liberação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular e compostos quelantes (como por exemplo, os sideróforos) solubilizam essas formas precipitadas de fósforo. Os principais ácidos orgânicos de baixo peso molecular secretados são o ácido glucônico, lático, oxálico, succínico, tartárico, acético, fumárico e ácido cítrico, entre outros. O ácido glucônico é o metabólito mais amplamente associado ao processo de solubilização do fósforo (LI et al., 2017; SHARMA et al., 2013).

A solubilização orgânica de P é também chamada de mineralização de fósforo orgânico (Po) (SHARMA et al., 2013). Os íons fosfatos encontram-se complexados a fração orgânica do solo, principalmente na matéria orgânica e na biomassa, sendo que o mecanismo de mineralização mais utilizado é a produção e secreção de enzimas, como as nucleases, fosfolipases, fosfatases e fitases. Dentre a variedade de classes de enzimas fosfatase, as fosfomonoesterases (chamadas frequentemente de fosfatases) são as mais abundantes e melhor estudadas (NANNIPIERI et al., 2011). Dependendo de seu pH ótimo, essas enzimas são divididas em fosfomonoesterases ácidas e alcalinas e ambas podem ser produzidas pelos microrganismos (JORQUERA et al., 2008).

Tipicamente, as fosfatases ácidas predominam em solos ácidos, enquanto as fosfatases alcalinas são mais abundantes em solos neutros e alcalinos (RENELLA et al., 2006). Embora as raízes das plantas

possam produzir fosfatases ácidas, elas raramente produzem grandes quantidades de fosfatases alcalinas, sugerindo que esse é um potencial nicho de estudo aos microrganismos que secretam essas enzimas (CRIQUET et al., 2004). Também é difícil diferenciar entre as fosfatases produzidas por raízes e microrganismos (RICHARDSON et al., 2009), mas algumas evidências sugerem que as fosfatases de origem microbiana possuem uma maior afinidade pelos compostos de Po do que as derivadas das raízes das plantas (SHARMA et al., 2013).

As fitases promovem a liberação de P a partir da degradação do fitato, principal fonte de inositol e a principal forma armazenada de P em sementes de plantas e pólen, sendo um componente importante do P orgânico no solo (SHARMA et al., 2013). Embora a capacidade das plantas para obter P diretamente do fitato é muito limitada, os microrganismos são um fator chave na regulação da mineralização do fitato no solo e sua presença dentro da rizosfera pode compensar a incapacidade de uma planta de adquirir P diretamente do fitato (RICHARDSON; SIMPSON, 2011; SHARMA et al., 2013).

Essas enzimas são classificadas com base em seu mecanismo catalítico como fitases ácido histidina (HAP), β -preguiada (BPP), fitases de cisteína (CP) ou fitases de ácido “purple” (PAP) (MULLANEY; ULLAH, 2003). Independente do mecanismo adotado, todas as estratégias descritas acima promovem o aumento do conteúdo de fósforo solúvel na solução do solo (CARDOSO et al., 1992; HAMDALI et al., 2008; MARRA et al., 2012).

Vários estudos tem revelado o funcionamento a nível celular que regula a síntese de enzimas envolvidas na mineralização de fósforo (SANTOS-BENEIT, 2015). Essas enzimas são geralmente excretadas em resposta à deficiência de P e os genes responsáveis pela sua codificação fazem parte do Pho Regulon (responsável pela síntese de fosfatases e fitases)(SANTOS-BENEIT, 2015). O gene *phoC* tem sido relatado como importante na codificação da fosfatase ácida (FRASER et al., 2017), o gene *phoD* para a fosfatase alcalina (SAKURAI et al., 2008) e o gene *BPP* (β -hélice-fitase) para a fitase (COTTA et al., 2016).

Grande parte dos trabalhos concentra-se em isolar os microrganismos solubilizadores de fosfato e caracterizá-los, no entanto, mais de 99% dos microrganismos do solo não são cultivados com sucesso (SHARMA et al., 2013). Portanto, métodos independentes de cultivo são necessários para estudar a função e a ecologia dos microrganismos envolvidos na ciclagem do fósforo nos solos. As técnicas moleculares baseadas em PCR são excelentes ferramentas para essa finalidade, pois são precisas, reproduzíveis e não dependem da composição do meio de cultura ou da fase de crescimento dos microrganismos (PEIX et al., 2007; SHARMA et al., 2013).

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral:

Estabelecer correlações entre a diversidade bacteriana do solo e a disponibilidade de fósforo oriundo de diferentes fontes de P com variável nível de solubilidade, sendo elas o fosfato de Araxá, fitato de Cálcio e superfosfato Triplo, utilizando o milho como planta modelo.

3.2 Objetivos específicos:

- a) Modular os níveis de diversidade bacteriana por meio da utilização da técnica de diluição por extinção;
- b) Avaliar a estrutura das comunidades bacterianas nos diferentes níveis de diversidade por meio de PCR-DGGE;
- c) Quantificar a abundância dos genes associados com o processo de disponibilização do fósforo (*phoD*) por meio do PCR quantitativo (qPCR);
- d) Avaliar a atividade microbiana por meio enzimático (fosfatases e fitase);
- e) Avaliar a estrutura de nichos ocupados e das fontes de carbono utilizadas pelas comunidades bacterianas por meio da metodologia do BIOLOG;
- f) Determinar o desenvolvimento da planta, assim como o teor de fósforo, por meio de medidas de comprimento da parte aérea e raiz, peso da matéria seca e teor de fósforo na planta;
- g) Avaliar a dinâmica de fósforo no solo por meio do fracionamento químico dos diferentes tratamentos.

4 HIPÓTESES

1. Quanto maior a diversidade microbiana, maior será a disponibilização de fósforo para a planta.
2. As distintas fontes de fósforo irão estimular de maneira diferenciada a comunidade microbiana no solo.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Caracterização do solo utilizado no experimento

Foram coletados solos da área chamada Paredão Vermelho localizado no município de Piracicaba – SP (Latitude: 22° 43' 31" S, longitude: 47° 38' 57" W), altitude de 585m. A precipitação média anual é de 1255 mm. As propriedades químicas do solo estão descritas em tabela (ANEXO).

A esterilização do solo foi realizada em autoclave com elevada temperatura e pressão (120°C e 1atm acima da pressão atmosférica) por uma hora, seguida de repouso do solo em temperatura ambiente durante a noite. Este processo foi repetido por dois dias consecutivos. Amostras do solo esterilizado foram acondicionadas em recipientes com capacidade para 1 quilo e 100 gramas de solo para implantação do experimento.

5.2 Alteração dos níveis da diversidade microbiana

O solo coletado e sua comunidade microbiana associada (sem autoclavagem) foram submetidos a diluições seriadas, utilizando-se o método de diluição para extinção (WERTZ et al., 2006; VAN ELSAS et al., 2012; MALLON et al., 2015). As diluições da comunidade microbiana do solo foram obtidas nas suspensões de células em diluições 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-6} e 10^{-9} , com posterior inoculação em solo anteriormente esterilizado.

5.3 Inoculação da Comunidade Bacteriana em solo

As diferentes diluições (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-6} e 10^{-9}) das comunidades foram inoculadas no solo (50 ml) e foi esperado um período de 15 dias para que todas as comunidades inoculadas atingissem a mesma abundância ($\approx 10^9$ células), mensurado por meio da contagem de colônias, para garantir que a variação entre as comunidades fossem apenas em relação à diversidade. Após a equiparação em termos de abundância da comunidade bacteriana nas diferentes diluições, as diferentes comunidades geradas receberam então a adubação fosfatada.

5.4 Adubação fosfatada

Foram utilizadas três fontes distintas de fósforo: superfosfato triplo prontamente disponível para as plantas com (41% P_2O_5), fitato de cálcio moderadamente disponível (19,5% P_2O_5) e fosfato de Araxá com baixa disponibilidade de fósforo (24% P_2O_5). A adubação foi realizada para atender a demanda de 0,06g de P_2O_5 por vaso (1,1 kg de solo), dose recomendada para a cultura do milho de acordo com o

Boletim 100 IAC. As quantidades aplicadas por vaso de superfosfato triplo, fitato de cálcio e fosfato de Araxá foram de 0,15g, 0,30g e 0,25g respectivamente, as quais correspondem às seguintes doses: 273 kg ha⁻¹ de superfosfato triplo, 545 kg ha⁻¹ de fitato de cálcio e 454 kg ha⁻¹ de fosfato de Araxá.

5.5 Material vegetal (milho)

No mesmo dia da realização da adubação fosfatada, as sementes de milho foram submetidas ao processo de desinfecção superficial e em seguida semeadas nos vasos contendo os diversos tratamentos. O processo de desinfecção superficial consistiu em uma lavagem das mesmas com solução de hipoclorito de sódio a 2% durante 1 minuto, seguido de enxágue em água destilada previamente esterilizada.

Foram colocadas duas sementes por vaso e sete dias após a germinação foi feito desbaste permanecendo apenas uma planta por vaso. A irrigação foi feita diariamente com água destilada de acordo com a capacidade de campo e semanalmente foi realizado o controle manual das plantas invasoras no solo. Também foi necessário o controle da lagarta do milho, realizado com uma solução de detergente a 1% (MARQUES; QUINTELA, 2011).

O milho foi escolhido como *planta modelo* por apresentar rápido crescimento, resposta quanto a deficiência de fósforo e por ser considerada uma das principais culturas de grãos do mundo devido a sua enorme aplicabilidade. Além disso, esta espécie vegetal teve seu genoma já sequenciado, sua história evolutiva já é muito bem descrita, além do conhecimento acerca do seu microbioma associado já estar bastante avançado (NIU et al., 2017; BUSBY et al., 2017).

5.6 Desenho experimental

O experimento foi conduzido em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições, em arranjo fatorial 3 x 4: Três fontes de fósforo (fitato de cálcio, superfosfato triplo e fosfato de Araxá) e quatro diluições (10⁻¹, 10⁻³, 10⁻⁶ e 10⁻⁹) (Figura 1). O experimento foi conduzido por um período de 30 dias, ao final do experimento foram coletadas amostras do material vegetal e do solo. Foi considerado solo rizosférico todo o solo com a influência do sistema radicular da planta e o solo não rizosférico aqueles oriundos dos vasos que não possuíam a planta.

Figura 1. Croqui do desenho experimental. Imagem do milho colorido representa vasos com planta de milho. Imagem do milho cinza representa vasos sem a planta de milho.

5.7 ANÁLISES LABORATORIAIS – SOLO

5.7.1 Extração de DNA total do solo

O DNA total das amostras coletadas foi extraído com auxílio do kit comercial *Power Soil DNA Isolation* (MoBio, EUA) seguindo as instruções do fabricante. O produto extraído (~100µL) foi avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,2%. Posteriormente, as amostras foram coradas com gel red e visualizadas em luz ultravioleta. Foi extraído o DNA das amostras de solo e rizosfera quando atingido a estabilização da abundância da comunidade microbiana ($\approx 10^9$ células, após o período de 15 dias, que foi considerado o tempo zero) e ao final do experimento com 30 dias.

5.7.2 Estrutura da comunidade de bactérias por PCR-DGGE

A análise da comunidade bacteriana total e da comunidade que disponibiliza fósforo para a planta dos diferentes tratamentos foram realizadas por meio da metodologia de PCR-DGGE [*Polymerase Chain Reaction* (PCR) – *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE)].

O DNA total extraído das amostras foi utilizado para a amplificação parcial do gene *rrs* que codifica a subunidade 16S do rRNA e do gene *phoD*. A amplificação do gene *rrs* foi realizada como descrito por Heuer et al. (1997). Os iniciadores utilizados foram os 968F (5' "GC-Clamp" - AACGCGAAGACCTTAC- 3') e 1378R (5' -CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG- 3'). A reação de PCR – DGGE foi realizada com 1 µL de DNA total, 5,0 µL de PCR tampão 1X, 5,0µL de MgCl₂ (50mM), 4,0 µL de dNTP(2,5 mM), 0,5µL de Formamida, 0,2µL de cada iniciador e 0,5µL da Taq DNA polimerase (5 U µL⁻¹); o volume final foi ajustado com água deionizada esterilizada para 50µL. As condições de

termociclagem foram: Desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos, seguidos por 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 56 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos, com uma extensão final de 72 °C por 10 minutos.

A amplificação do gene *phoD* foi realizada como descrito por Sakurai et al. (2008). Os iniciadores utilizados foram o ALPS-F730 (5' CAG TGG GAC GAC CAC GA GGT 3') e o ALPS-R1101 (5' GAG GCC GAT CGG CAT GTC G 3'). O grampo de G+C foi adicionado no iniciador ALPS-R1101. A reação de PCR – DGGE foi realizada com 2 µL de DNA total, 6,0 µL de PCR tampão 1X, 6,0µL de MgCl₂ (50mM), 4,0 de dNTP (2,5 mM), 0,4µL de cada iniciador e 1,0µL de Taq DNA polimerase (5 U µL⁻¹); o volume final foi ajustado com água deionizada esterilizada para 40µL. As condições de termociclagem foram: Desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguidos por 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 57 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos, com uma extensão final de 72 °C por 7 minutos.

Os produtos da amplificação de ambos os genes foram visualizados com o auxílio do gel de agarose (1,2%) corado com Gel Red e observados em foto documentador em luz ultravioleta.

A análise em DGGE para ambos os genes foi realizada em aparelho IngenyPhorU2 System (Ingeny, Goes, Holanda), com gradiente desnaturante de 45 a 65%, onde 100% de desnaturação corresponde a concentração de 7M de uréia e 32% formamida. A eletroforese foi realizada a 90V e 60°C constantes por 16h, e após este período o gel foi corado com SYBr GREEN I SYBR-green® (Invitrogen, Breda, The Netherlands), por 30 minutos na ausência de luz e foto-documentado em Storm 845: New Phosphorimager/Gel Scanner.

O perfil de bandas gerados pelo DGGE foi analisado pelo BioNumerics 5.10 (AppliedMaths NV), o qual gera uma matriz com valores de intensidade, ausência e presença de bandas. Essa matriz foi submetida a um *software* de análise multivariada o R® (R CORE TEAM, 2017) utilizando o pacote *Vegan*, para a realização da análise de coordenadas principais (PCoA). As distâncias entre as amostras foi calculada por meio do método de Bray-Curtis, foi realizada uma análise de similaridade (ANOSIM), gerando um valor de R que varia de 0 a 1, onde valores acima de 0,75 indicam forte separação entre as amostras.

5.7.3 Quantificação de bactérias por PCR em tempo real

A PCR quantitativa (qPCR) foi realizada nas amostras de DNA obtidas previamente, utilizando o aparelho StepOne™ Real-Time PCR System (AppliedBiosystems®). Nas reações de amplificação foram utilizadas o marcador fluorescente Syber® Green PCR Master Mix 2x (AppliedBiosystems®). Foram realizadas a quantificação de bactérias totais e das comunidades solubilizadoras de fósforo.

Para a avaliação de grupos de bactéria totais por meio do gene *rrs* foram utilizados os iniciadores P1 e P2 (P1 – CCTACGGGAGGCAGCAG; P2 – ATTACCGCGGCTGCTGG)(MUYZER et al., 1993), gerando um fragmento de 193 pares de bases (pb). A eficiência (E) da curva obtida foi de 92,60% com diluições de 10¹ a 10⁸. O valor de regressão logarítmica (R²) obtido na curva foi de 0,99. A reação de PCR

foi realizada com 1 µL de DNA total, 10,0 µL de PCR tampão 2X (SYBR Green PCR Kit), 0,5µL de cada iniciador(100 mM) e 0,3µL de albumina de soro bovino (BSA) (10 mg/ml), o volume final foi ajustado com água deionizada esterilizada para 20µL. As condições de amplificação foram uma desnaturação inicial a 95 °C durante 10 minutos, seguidos de 35 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 30 segundos e uma extensão final a 72 °C durante 7 minutos.

Para a comunidade solubilizadora de fósforo foi utilizado o iniciador específico para o gene *phoD* (ALPS-F730 CAGTGGGACGACCACGAGGT; ALPS-R1101 GAGGCCGATCGGCATGTCG) (SAKURAI et al., 2008), gerando um fragmento de 370 pares de bases (pb), com o valor médio de eficiência (E) de 88%, os valores de regressão logarítmica (R^2) obtidos na curva foi de 1,00. A reação de PCR foi realizada com 2 µL de DNA total, 12,5 µL de PCR tampão 2X (SYBR Green PCR Kit), 0,5 µL de albumina de soro bovino (BSA) e 0,2 µL de cada iniciador, o volume final foi ajustado com água deionizada esterilizada para 25 µL. As condições de amplificação foram uma desnaturação inicial a 94°C durante 3 minutos, seguidos de 35 ciclos a 94 °C durante 1 minuto, 57°C durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos e extensão final a 72°C durante 7 minutos.

As reações foram feitas em triplicata, sendo que para cada réplica, foram realizadas duas reações de qPCR. O DNA extraído foi usado em cada reação de amplificação e as mesmas foram realizadas em placas MicroAmpOptical 48-Well. Em todas as análises, dois controles negativos (ausência de DNA) foram submetidos às mesmas condições que as amostras alvo, excluindo uma possível contaminação externa. Além disso, as curvas de *melting* também foram adicionadas em cada corrida para monitorar a especificidade dos produtos amplificados.

5.7.4 Detecção da atividade das enzimas do solo: Fosfatase nos pH 6,5 e 11,0

As enzimas fosfatases foram testadas em dois pH distintos de atividade (pH 6,5 e 11,0) como descrito por Tabatabai e Bremner (1969). Foi pesado 1 g de solo e colocado em tubos de vidro de 50 mL, onde foi adicionado 4 mL do tampão MUB (pH 6,5 ou pH 11) e 1 mL da solução p-nitrofenilfosfato de sódio (0,05 M). Os frascos foram incubados a 37°C por 30 minutos e após a incubação foram adicionados 1 mL de CaCl₂ 0,5 M e 4 mL de NaOH 0,5 M e misturando vigorosamente. A suspensão foi filtrada em papel filtro Whatman nº 2 com posterior leitura da absorbância a 420 nm em espectrofotômetro. O conteúdo de p-nitrofenol foi calculado por uma curva padrão previamente estabelecida com valor de R^2 de 0,995.

5.7.5 Detecção da atividade da enzima Fitase

A atividade da fitase foi determinada por meio do método descrito por Ames (1966) e Chen et al. (2006). Pesou-se 1 g de solo em frascos de 50 mL e foram adicionados 5 mL solução de acetato de sódio (0,2 M) contendo fitato de sódio (1 M). No solo controle foi adicionado 5 mL da solução de acetato

de sódio (0,2 M) sem a adição do fitato de cálcio. As amostras foram incubadas por 1h a 37 °C. Após esse período, 0,5 mL de ácido tricloroacético (10%) foram adicionados para parar a reação. Foi deixado em repouso por 20 minutos e após esse período o material foi filtrado. Pegou-se 1 µl do filtrado e 1,200 µl da solução de molibdato de amônio + metavanadato de amônia. As amostras ficaram em repouso em temperatura ambiente por 10 minutos, para a leitura em espectrofotômetro a 420 nm. A curva padrão foi calculada a partir de 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 mg/mL de fosfato de potássio, obtendo um valor de R² de 0,998.

5.7.6 Determinação do consumo de diferentes fontes de carbono

Foram utilizadas placas de BIOLOG TM EcoPlates (BIOLOG Inc., Hayward CA., EUA) para a avaliação de consumo das diferentes fontes de carbono pelas comunidades microbianas. Essas placas consistem em 96 poços, com 31 diferentes fontes de carbono e um branco, em triplicata. São apropriadas para estudos de ecologia microbiana, pois contém fontes de carbono normalmente encontradas no solo.

Para a realização do teste foram pesados 5 gramas de solo que foram previamente diluídas a 10⁻² em solução salina (NaCl 0,85%). Foram adicionado 150 µl dessa diluição em cada poço da placa de BIOLOG TM EcoPlates, seguida de incubação a 25 °C. As leituras de absorvância foram realizadas a 590 nm com um leitor de placas (ELISA) por seis vezes até chegar a 70 horas de incubação com os seguintes períodos: 1ª leitura (15 horas), 2ª leitura (24 horas), 3ª leitura (39 horas), 4ª leitura (48 horas), 5ª leitura (63 horas) e 6ª leitura (70 horas); gerando uma cinética de consumo para cada fonte de carbono (MALLON et al., 2015).

Os valores obtidos das leituras foram normalizados e utilizados para calcular o consumo total de cada uma das fontes de carbono para as comunidades microbianas, denominado de *community niche* (SALLES et al., 2009). Os valores de *community niche* foram utilizados para determinar a amplitude do nicho (*niche breadth*) e a estrutura do nicho (*niche structure*) das comunidades microbianas avaliadas (MALLON et al., 2018).

5.7.7 Fracionamento químico do fósforo

No fracionamento químico do P no solo, foi determinada a fração lábil e o teor de fósforo total, realizado conforme proposto por Hedley, Stewart e Chauhan (1982) e adaptado por Condon, Goh e Newman (1985). Para isso, em 0,5 g de cada amostra de solo coletado (seca em estufa a 65 °C) submetida a diferentes extratores em ordem sequencial (relação solo: solução de 1:20), sendo eles:

- I. Resina de troca aniônica – RTA (lâmina de RTA de dimensões de 1,0 x 2,0 cm imersa em 10 mL de H₂O em contato direto com o solo);
- II. 10 mL de NaHCO₃ 0,5 mol L⁻¹ (pH = 8,5), extraíndo fósforo inorgânico e orgânico;

Em cada etapa foi realizada agitação por 16 h, à temperatura constante de 25°C, sendo as amostras posteriormente centrifugadas e o sobrenadante armazenado, para posterior determinação de P em cada uma das frações.

A determinação do P extraído por H₂O (Extrato I) foi realizada segundo o método descrito por Murphy e Riley (1962); já o Pi dos extratores alcalinos de NaHCO₃ e NaOH (0,5 mol L⁻¹), (Extratos II, respectivamente), foi determinado pelo método de Dick e Tabatabai (1977).

5.8 ANÁLISES LABORATORIAIS – MATERIAL VEGETAL

5.8.1 Medidas de crescimento das plantas

As análises da medida de crescimento das plantas foram realizadas ao final do experimento (30 dias após a germinação- DAG). As plantas foram levadas ao laboratório para análise de massa seca de raiz e parte aérea. Inicialmente foi determinado o peso constante (acondicionamento em estufa de secagem sob temperatura de 65 °C). Após esse período as amostras foram pesadas e seus valores anotados e analisados.

5.8.2 Comprimento específico radicular

Com as medidas de comprimento da raiz e peso seco radicular foi possível obter o comprimento específico da raiz (CER) que é o produto do comprimento da raiz dividido pelo peso da matéria seca da raiz [comprimento de raiz (metros) /peso seco radicular (gramas)], essa relação é importante por que a massa seca da raiz pode mascarar mudanças na morfologia e arquitetura da raiz, permanecendo constante, enquanto o comprimento total e a área de contato do sistema radicular aumentam ou diminuem drasticamente com pequenas mudanças (PÉREZ-JARAMILLO et al., 2017).

5.8.3 Medidas do teor de fósforo nos tecidos vegetais (Parte aérea e raiz)

A medida do teor de fósforo nos tecidos vegetais (parte aérea e raiz) foi realizada como determinado por Bataglia et al. (1983).

5.9 ANÁLISES DOS DADOS OBTIDOS

Todos os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), as médias dos tratamentos foram comparadas com seus respectivos controles pelo teste de Tukey a 5% de significância,

utilizando software R® (R CORE TEAM, 2017). Utilizando este mesmo software, a estrutura da comunidade microbiana foi explorada por meio da análise de coordenadas principais (PCoA) e a similaridade entre os agrupamentos testados pela análise de ANOSIM. Através do Canoco for Windows 4.51 (TER BRAAK; SMILAUER, 2002) foi realizada uma análise de componentes principais (PCA), para se avaliar as distribuições espaciais dos dados com as variáveis analisadas.

6 RESULTADOS

6.1 SOLO

6.1.1 Estrutura e organização da comunidade bacteriana e solubilizadora de fósforo

Analisando a comunidade bacteriana total, foi possível observar que a técnica de diluição para extinção foi eficiente na geração de comunidades distintas. Houve separação das diluições ($R=0,76$; $p<0,05$) para a estrutura da comunidade bacteriana total (gene *rss*) no tempo zero (início) (Figura 2A). Essa diferenciação entre as diluições da comunidade microbiana também foi observada nos tratamentos experimentais (diferentes fontes). No tratamento adubado com fosfato de Araxá houve separação total do gradiente de diversidade ($R=1$; $p<0,05$), com uma aproximação maior entre as amostras mais diluídas da rizosfera com as amostras mais diluídas do solo (Figura 2B). Para o tratamento adubado com fitato de cálcio, houve sobreposição entre as amostras de solo e rizosfera, no entanto as amostras novamente se apresentaram distintas entre si ($R=0,98$; $p<0,05$) (Figura 2C). Para o tratamento adubado com superfosfato triplo houve sobreposição entre rizosfera e solo ($R=0,95$; $p<0,05$) (Figura 2D).

Figura 2. Análise de coordenadas principais (PCoA) dos perfis de bandas do gene *rrs* do rRNA 16S referente aos diferentes tratamentos: A, tempo zero (início). B, fósforo de Araxá. C, fitato de Cálcio e D, superfósforo triplo.

Em relação à estrutura das comunidades solubilizadora de fósforo (gene *phoD*), houve separação das amostras em relação às diluições da comunidade microbiana se manteve (Figura 3). Assim como para a comunidade bacteriana, a comunidade solubilizadora de fósforo respondeu ao gradiente de diversidade, onde no tempo zero (início) as comunidades solubilizadoras se diferenciaram ($R=0,91$; $p<0,05$) (Figura 3A). No tratamento adubado com fósforo de Araxá houve uma maior separação entre as amostras da rizosfera e do solo, com uma separação nítida entre as diferentes diluições para ambos os ambientes ($R=0,98$; $p<0,05$) (Figura 3B). Para os tratamentos adubados com fitato de cálcio e superfósforo triplo, observou-se sobreposição entre as amostras do ambiente rizosfera com as do ambiente solo, mas as diluições se diferenciaram ($R=0,96$; $R=0,92$, respectivamente, $p<0,05$ para ambos) (Figura 3C e D).

Figura 3. Análise de coordenadas principais (PCoA) dos perfis de bandas do gene *phoD* referente aos diferentes tratamentos: A, tempo zero (início). B, fosfato de Araxá. C, fitato de Cálcio e D, superfosfato triplo.

6.1.2 Abundância da comunidade bacteriana total e solubilizadora de fósforo

No período de montagem do experimento (15 dias, tempo zero), a abundância da comunidade bacteriana total não apresentou diferença ($p < 0,05$) (Figura 4A). No tratamento adubado com fosfato de Araxá, no ambiente rizosfera, a comunidade mais diversa (diluição 10^{-1}) apresentou menores valores médios de abundância (9,25 rizosfera) do que as comunidades menos diversas (9,47 rizosfera) (Figura 4B). O tratamento adubado com fitato de cálcio apresentou os maiores valores médios de abundância (9,27 a 10,06) do que os tratamentos adubados com fosfato de Araxá (9,25 a 9,56) e adubados com superfosfato triplo (9,27 a 9,66) (Figura 4C). No tratamento adubado com fitato de cálcio não foram observadas diferenças ($p < 0,05$) entre os níveis de diversidade da comunidade bacteriana total, tanto na rizosfera como

no solo (Figura 4C). O tratamento com superfosfato triplo não apresentou diferenças ($p < 0,05$) independente dos níveis de diversidade bacteriana e do ambiente avaliado (Figura 4D).

Figura 4. Abundância do gene *rrs* do rRNA 16S. Letras maiúsculas comparam as diluições dentro do mesmo ambiente (solo e rizosfera) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam as diluições dentro dos diferentes ambientes (solo x rizosfera) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%.

A abundância da comunidade solubilizadora de fósforo apresentou uma dinâmica diferente em relação à comunidade bacteriana total. Já no tempo inicial, a comunidade solubilizadora apresentou-se mais abundante (6,23 a 6,87) nas comunidades menos diversas (10⁻⁹) (6,87) (Figura 5A). Essa tendência também foi observada nos diferentes tratamentos, principalmente no tratamento adubado com fosfato de Araxá (Figura 5B). Nesse tratamento, os maiores valores de abundância (6,97) foram observados nas comunidades menos diversas, independente do ambiente avaliado (rizosfera ou solo) (Figura 5B). Essa tendência de maior abundância da comunidade solubilizadora de fosfato nas comunidades menos diversas também foi observada no tratamento adubado com fitato de cálcio. Entretanto, nesse tratamento, esse padrão foi encontrado apenas no ambiente solo, sendo que na rizosfera, a abundância nos níveis diferenciados de diversidade foi constante (Figura 5C). No tratamento adubado com superfosfato triplo, não foram observadas variações em termos de abundância (Figura 5D).

Figura 5. Abundância do gene *phoD*. Letras maiúsculas comparam as diluições dentro do mesmo ambiente (solo e rizosfera) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam as diluições dentro dos diferentes ambientes (solo x rizosfera) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%.

6.1.3 Medida de atividade enzimática

A atividade da fosfatase em pH 6,5 (ácida) foi reduzida nos tratamentos onde os níveis de diversidade foram reduzidos, tanto no ambiente rizosfera como no solo (Figura 6). Essa tendência foi mais pronunciada nos tratamentos adubados com fitato de cálcio e fosfato de Araxá (Figura 6).

Figura 6. Atividade da fosfatase em pH 6,5, segundo Tabatabai e Bremner (1969). Letras maiúsculas comparam as diluições dentro do mesmo ambiente (solo e rizosfera) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam as diluições dentro dos diferentes ambientes (solo x rizosfera) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%.

Para a fosfatase em pH 11,0 (alcalina) os tratamentos apresentaram comportamentos distintos. No tratamento adubado com fosfato de Araxá, os ambientes avaliados (solo e rizosfera) apresentaram comportamentos diferenciados; enquanto na rizosfera foi observada uma tendência de maior atividade enzimática conforme os índices de diversidade dos solos foram reduzidos, no solo foi observado o oposto; a atividade enzimática diminui conforme a diversidade microbiana foi reduzida (Figura 7A). No tratamento adubado com fitato de cálcio (Figura 7B), a atividade da fosfatase seguiu o mesmo padrão, independente do seu pH de atividade (pH 6,5 ou 11,0); a atividade enzimática foi reduzida nos ambientes onde a diversidade microbiana também foi reduzida. Para o tratamento adubado com superfosfato triplo, na rizosfera foi observado uma tendência na redução da atividade enzimática nos tratamentos menos diversos enquanto que no solo essa atividade não apresentou variações significativas em relação à variação nos índices de diversidade da comunidade microbiana (Figura 7C).

Figura 7. Atividade da fosfatase em pH 11,0, segundo Tabatabai e Bremner (1969). Letras maiúsculas comparam as diluições dentro do mesmo ambiente (solo e rizosfera) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam as diluições dentro dos diferentes ambientes (solo x rizosfera) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%.

Para a atividade da fitase, o tratamento adubado com fitato de cálcio no ambiente solo, apresentou a comunidade mais diversa (10-1) diferindo da comunidade menos diversa (10-9)(Figura 8B), no tratamento adubado com superfosfato triplo não apresentaram diferença ($p < 0,05$) (Figura 8). Para o tratamento adubado com fosfato de Araxá, no ambiente solo observou-se uma tendência de aumento da atividade enzimática nas menores diversidades (Figura 8A).

Figura 8. Atividade da fitase, segundo Ames (1966) e Chen et al. (2006). Letras maiúsculas comparam as diluições dentro do mesmo ambiente (solo e rizosfera) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam as diluições dentro dos diferentes ambientes (solo x rizosfera) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%.

Relacionando os dados da atividade enzimática (fosfatase em pH 6,5 e pH 11,0) com a abundância do gene *phoD* nos diferentes tratamentos, observou-se que a atividade enzimática da fosfatase em pH 6,5 encontra-se relacionada com a abundância do gene *phoD* em todos os tratamentos apenas no ambiente rizosfera. Somente no tratamento adubado com fosfato de Araxá a relação é inversa (Figura 9A). Os valores que explicam essa relação na rizosfera são relativamente baixos ($R^2=0,264$ para o tratamento de fosfato de Araxá; $R^2=0,274$ para o tratamento do fitato de cálcio e $R^2=0,370$ para o tratamento do superfosfato triplo), porém significativos ($p<0,05$). Não foram observadas relações significativas entre a atividade da fosfatase em pH 11,0 exceto para o tratamento adubado com superfosfato triplo no ambiente solo, apresentando um valor baixo de $R^2=0,069$, mas significativos ($p<0,05$) (Figura 9F).

Figura 9. Regressão linear entre o número de cópias do gene *phoD* com: a atividade da fosfatase em pH 6,5 no tratamento adubado com fosfato de Araxá (A), no tratamento adubado com fitato de cálcio (B) e no tratamento adubado com superfosfato triplo (C). Regressão linear entre o número de cópias do gene *phoD* com: a atividade da fosfatase em pH 11,0 no tratamento adubado com fosfato de Araxá (D), no tratamento adubado com fitato de cálcio (E) e no tratamento adubado com superfosfato triplo (F).

6.1.4 Amplitude e estrutura dos nichos ocupados

Foram utilizados os tratamentos adubados com fitato de cálcio e com fosfato de Araxá, por apresentarem resultados interessantes na atividade da fosfatase ácida e na abundância do gene *phoD*.

Uma das justificativas para a melhora na funcionalidade do sistema solo em ambientes com altos níveis de diversidade microbiana encontram-se associados à maior complementariedade metabólica entre os organismos que compõe essa comunidade, refletindo no melhor aproveitamento do nutriente. Por isso, utilizando os dados do Biolog foi determinado o valor do *community niche* dos diferentes tratamentos e com base nesses valores foi determinada a amplitude de ocupação do nicho (*niche breadth*) e a estrutura do nicho (*niche structure*).

Foram observados perfis diferenciados entre os tratamentos, no qual o tratamento adubado com fosfato de Araxá, no ambiente rizosfera, apresentou redução do número de fontes de carbono consumidas na comunidade mais diversa (10^{-1}) para uma intermediária (10^{-3}). Porém, da comunidade diluída 10^{-3} para as seguintes (10^{-6} e 10^{-9}) foi observado aumento das fontes consumidas, indicando que outros nichos poderiam estar sendo ocupados. Em relação ao ambiente solo, observou-se uma tendência de aumento do número de fontes consumidas conforme a diversidade da comunidade foi reduzida, indicando que mais nichos estariam ocupados (Figura 10). No tratamento adubado com fitato de cálcio, no ambiente

rizosférico, observa-se que os valores médios de fontes de carbono consumidas foram próximos entre os diferentes níveis da diversidade microbiana. Porém, em relação ao solo, observou-se o oposto ao observado no tratamento de fosfato de Araxá; as comunidades mais diversas (10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-6}) apresentaram mais fontes de carbono consumidas do que na comunidade menos diversa (10^{-9}), indicando que menos nichos estariam ocupados (Figura 10).

Figura 10. Número de fontes de carbono. Letras maiúsculas comparam as diluições dentro do mesmo ambiente (solo e rizosfera) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam as diluições dentro dos diferentes ambientes (solo x rizosfera) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%.

Para a estrutura dos nichos, observou-se que, no geral, mais de 42% da variação dos dados foi explicada pelo eixo 1 para todos os tratamentos avaliados (Figura 11). Na rizosfera do tratamento adubado com fosfato de Araxá foi observado que a comunidade da diluição 10^{-1} estava estruturada de maneira diferenciada da comunidade das diluições 10^{-3} e 10^{-6} e ligeiramente mais próxima da diluição 10^{-9} (Figura 11A). Em relação ao solo, observa-se uma diferenciação do controle para as diferentes comunidades com os diferentes níveis de diversidade (Figura 11B). No tratamento adubado com fitato de cálcio, no ambiente rizosférico, não foi possível observar diferença da estrutura das comunidades microbianas em relação às fontes de carbono consumidas (Figura 11C). Em relação ao solo, a diluição 10^{-9} se assemelhou mais com o tratamento controle do que com as outras diluições e a 10^{-1} mais próxima a 10^{-6} (Figura 11D).

Figura 11. Distribuição espacial dos dados do BIOLOG por meio de análise de componentes principais (PCA). A) Rizosfera do tratamento fosfato de Araxá; B) Solo do tratamento fosfato de Araxá; C) Rizosfera do tratamento de fitato de cálcio; D) Solo do tratamento de fitato de cálcio.

As fontes de carbono mais consumidas também foram variáveis entre os tratamentos e entre os ambientes avaliados (rizosfera e solo). Enquanto no tratamento adubado com fosfato de Araxá, no ambiente rizosférico, as fontes diferentemente consumidas foram ácido pirúvico, β -metil-D-glucosídeo, N-acetil-D-glucosamina, ácido D-glucosamínico, ácido lactônico e feniletilamina, no solo foram glicogênio, ácido 4-hidroxi-benzoico, L-arginina, L-serina e putrescina (Figura 12; Tabela 1 em apêndice).

Estatisticamente a diluição 10^{-9} se sobressaiu das demais diluições, na rizosfera, do tratamento adubado com fosfato de Araxá, recebendo destaque o ácido pirúvico, β -metil-D-glucosídeo, N-acetil-D-glucosamina e ácido D-glucosamínico. Para o ácido lactônico a comunidade associada ao controle apresentou um maior consumo desta fonte, seguindo da diluição 10^{-9} , 10^{-1} e 10^{-6} . No solo a comunidade associada à diluição 10^{-9} também apresentou resultados significativos sob a fonte glicogênio, a L-arginina e putrescina foram preferencialmente consumidas pela comunidade associada à diluição 10^{-3} . Com relação à L-serina, as diluições 10^{-1} e 10^{-6} foram as que utilizaram preferencialmente essa fonte de carbono (Tabela 1 em apêndice).

No tratamento adubado com fitato de cálcio no ambiente rizosférico, as fontes mais consumidas foram ácido γ -hidroxibutírico, L-asparagina e L-fenilalanina, sendo o consumo de ácido γ -hidroxibutírico mais associado à comunidade microbiana da diluição 10^{-6} . A L-asparagina foi preferencialmente consumida pela comunidade associada à diluição 10^{-9} e a L-fenilalanina consumida preferencialmente no tratamento controle. No solo, as fontes diferencialmente consumidas foram ácido pirúvico, D-L, fosfato de α -glicerol, L-arginina, L-asparagina e L-treonina (Figura 12; Tabela 2 em apêndice). A comunidade microbiana associada à diluição 10^{-3} consumiu preferencialmente as fontes: ácido pirúvico, L-arginina, L-

asparagina e L-treonina, enquanto que o D-L, fosfato de α -glicerol foi consumido preferencialmente pelas comunidades microbianas associadas com as diluições 10^{-1} e 10^{-6} (Tabela 2 em apêndice).

Figura 12. Gráfico de calor (*Heatmap*) do consumo de fontes de carbono dos tratamentos adubados com fosfato de Araxá e fitato de cálcio. As fontes que apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% foram destacadas com um asterisco.

6.1.5 Fracionamento químico do P no solo

O percentual de P-lábil em relação o P-total foi bastante variável entre as diluições dentro de cada tratamento (fonte de P) e ambiente avaliado (solo e rizosfera). Entretanto, como já esperado pela sua baixa solubilidade, o tratamento adubado com fosfato de Araxá apresentou menor proporção de P-lábil (18-55%) entre todos os tratamentos (Figura 13). Os outros dois tratamentos apresentaram valores próximos de P-lábil entre (21-76% para o tratamento adubado com fitato de cálcio e 23-66% para o tratamento adubado com superfosfato triplo) (Figura 14 e Figura 15).

No tratamento adubado com fosfato de Araxá foi observado que a comunidade microbiana melhorou a disponibilização de fósforo, visto que as proporções de P-lábil obtidas na rizosfera (18-55%) foram maiores do que a proporção controle desse mesmo ambiente (23%), com exceção para a diluição 10^{-3} que obteve uma proporção de P-lábil bem abaixo (18%) (Figura 13). O maior teor de P-lábil no ambiente rizosfera foi obtido na diluição 10^{-6} . No ambiente solo, as proporções entre as diluições ficaram parecidas, com exceção da diluição 10^{-3} que apresentou as maiores proporções de P-lábil (44%) (Figura 13).

Figura 13. Porcentagem do fósforo lábil e total presente no solo e rizosfera para o tratamento adubado com fosfato de Araxá.

No tratamento adubado com fitato de cálcio, observou-se que na rizosfera a presença da comunidade microbiana influenciou positivamente o aumento da fração de P-lábil, visto que as proporções (21-76%) foram maiores do que as observadas no controle desse ambiente (23%). Na rizosfera, as maiores proporções de P-lábil foram na diluição 10^{-6} (76%), e as menores proporções foram encontradas na diluição 10^{-9} (21%) (Figura 14). No solo, observa-se uma crescente na disponibilização de P, onde a diluição 10^{-1} apresentou uma proporção de 35%, a 10^{-3} apresentou 38% e a 10^{-6} apresentou 52% (maior proporção de P-lábil desse ambiente). Entretanto essa crescente é interrompida na diluição 10^{-9} (47%) (Figura 14).

Figura 14. Porcentagem do fósforo lábil e total presente no solo e rizosfera para o tratamento adubado com fitato de cálcio.

No tratamento adubado com superfosfato triplo foi observado que na comunidade mais diluída (10^{-9}) houve as maiores proporções de P-lábil (37%). No ambiente solo não foi observado um padrão em relação à disponibilização de P, no entanto as maiores proporções de P-lábil (66 e 60%) foram obtidas nas diluições 10^{-3} e 10^{-9} , respectivamente (Figura 15).

Figura 15. Porcentagem do fósforo lábil e total presente no solo e rizosfera para o tratamento adubado com superfosfato triplo.

De acordo com os valores absolutos de P-lábil, podemos confirmar as tendências observadas nos valores proporcionais de P-lábil em relação a P-total (Figura 16). No tratamento adubado com fosfato de Araxá não houve diferença ($p < 0,05$) entre as diluições no ambiente rizosférico (Figura 16A). Porém foi possível observar que em média, as comunidades mais diluídas (10^{-6} e 10^{-9}) apresentaram os maiores teores de P-lábil. No solo, o maior valor, em média, foi obtido na diluição 10^{-3} (Figura 16A).

No tratamento adubado com fitato de cálcio os valores médios de fósforo disponível foram constantes na rizosfera enquanto que no solo, os valores foram aumentando conforme a diversidade foi sendo reduzida ($p < 0,05$) (Figura 16B). No tratamento adubado com superfosfato triplo, no ambiente rizosférico, a comunidade mais diversa apresentou maiores teores de fósforo disponível do que nas comunidades menos diversas ($p < 0,05$). No ambiente do solo não houve nenhum padrão significativo (Figura 16).

Figura 16. Fósforo lábil presente no solo e rizosfera. Letras maiúsculas comparam as diluições dentro do mesmo ambiente (solo e rizosfera) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam as diluições dentro dos diferentes ambientes (solo x rizosfera) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%.

Os dados obtidos com o fracionamento do P foram relacionados com os dados da atividade da fosfatase em pH 6,5 (ácida), com os dados do PCR quantitativo do gene *phoD* e com os valores de *community niche* na tentativa de explicar a disponibilidade de fósforo em função da atividade microbiana.

A atividade da fosfatase em pH 6,5 apresentou diferentes padrões de relação, no entanto nenhum deles foi significativo com os valores de P-lábil (Figura 17). No tratamento adubado com fosfato de Araxá, os valores de explicação encontrados foram extremamente baixos ($R^2 = 0,002$ para a rizosfera e $R^2 = 0,03$ para o solo), indicando que os valores obtidos de P-lábil não puderam ser explicados pela atividade enzimática neste estudo (Figura 17A). Para o tratamento adubado com fitato de cálcio, o ambiente rizosférico apresentou a mesma tendência observada no tratamento adubado com fosfato de Araxá, onde os teores de P-lábil não se relacionaram com a atividade enzimática ($R^2 = 0,001$). No ambiente solo, os dados se relacionaram positivamente, entretanto, o valor de explicação foi baixo ($R^2 = 0,1354$) (Figura 17B). No tratamento adubado com superfosfato triplo foi observado que para os ambientes estudados (rizosfera e solo), existe uma tendência de relação positiva, entretanto os valores de explicação são baixos ($R^2 = 0,02$ para a rizosfera e $R^2 = 0,04$ para o solo) (Figura 17C).

Figura 17. Regressão linear entre a atividade da fosfatase em pH 6,5 e o P-lábil para os diferentes tratamentos.

Assim como observado para os dados da atividade da fosfatase em pH 6,5, os dados de P-lábil obtidos não puderam ser explicados pela regressão dos seus valores com os dados da abundância do gene *phoD*. As regressões foram distintas para os diferentes tratamentos, entretanto nenhuma foi significativa ($p < 0,05$) (Figura 18). No tratamento adubado com fósforo de Araxá o ambiente solo apresenta uma relação negativa entre a abundância do gene *phoD* e os teores de P-lábil, entretanto os valores de explicação foram baixos e inconclusivos ($R^2 = 0,003$ para a rizosfera e $R^2 = 0,08$ para o solo) (Figura 18A). No tratamento adubado com fitato de cálcio, em ambos os ambientes avaliados (rizosfera e solo) foi observado uma tendência de relação positiva entre a abundância do gene *phoD* com o P-lábil, porém os valores de explicação foram baixos ($R^2 = 0,116$ para a rizosfera e $R^2 = 0,237$ para o solo) (Figura 18B). No tratamento adubado com superfósforo triplo, no ambiente rizosférico, houve uma tendência de relação positiva; conforme a abundância do gene *phoD* aumenta, maior seriam os teores de P-lábil no ambiente solo, mas novamente, o valor de explicação foi baixo ($R^2 = 0,02$) (Figura 18C).

Figura 18. Regressão linear entre o P-lábil com o número de cópias do gene *phoD* nos diferentes tratamentos.

Assim como observado para os resultados acima descritos, ao relacionar as fontes utilizadas pela comunidade microbiana (*community niche*) em cada diluição nos tratamentos adubados com fósforo de Araxá e com fitato de cálcio, não foi encontrada relação ($p < 0,05$) ente os respectivos parâmetros avaliados (Figura 19). Entretanto, é interessante observar que no tratamento adubado com fósforo de Araxá os

ambientes (solo e rizosfera) apresentam tendências opostas; enquanto o ambiente rizosférico apresenta uma relação positiva ($R^2=0,12$), no ambiente solo houve uma relação negativa ($R^2=0,15$) (Figura 19A). No tratamento adubado com fitato de cálcio, ambos os ambientes apresentaram uma tendência de relação positiva entre os dados ($R^2=0,09$ para a rizosfera; $R^2=0,04$ para o solo) (Figura 19B).

Figura 19. Regressão linear entre o número de fontes de carbono consumidas e o P-lábil nos tratamentos adubados com fosfato de Araxá (A) e com fitato de cálcio (B).

6.2 MATERIAL VEGETAL

6.2.1 Observações visuais das plantas

Ao final do experimento (30 dias após a germinação – 30DAG) foi realizada a observação visual dos sintomas de deficiência de fósforo, caracterizado por folhas raquíticas e de coloração arroxeada, esses sintomas foram mais severos no tratamento adubado com fosfato de Araxá (Figura 20). Foi possível observar uma escala de desenvolvimento da parte aérea, maior no tratamento adubado com fitato de Cálcio, intermediária no tratamento adubado com superfosfato triplo e menor no tratamento adubado com fosfato de Araxá. No entanto, o tratamento com fosfato de Araxá apresentou uma maior incidência de raízes do que os demais tratamentos.

Figura 20. Desenvolvimento das plantas aos 30 dias após a germinação e sintomas visuais da deficiência de fósforo. Fitato de cálcio (A), superfosfato triplo (B) e fosfato de Araxá (C).

6.2.2 Comprimento da parte aérea e radicular

Exceto o tratamento adubado com fosfato de Araxá, os demais tratamentos (fitato de cálcio e superfosfato triplo) apresentaram redução do comprimento da parte aérea conforme a diluição da comunidade foi aumentando ($p < 0,05$). No tratamento adubado com fosfato de Araxá, a parte aérea com maior valor médio de comprimento foi na diluição 10^{-9} ($p < 0,05$) (Figura 21A). A diluição 10^{-1} do tratamento adubado com o fitato de cálcio apresentou maior comprimento (≈ 80 cm) ($p < 0,05$) da parte aérea em relação às demais diluições.

Em relação ao comprimento da raiz das plantas de milho, no tratamento adubado com fosfato de Araxá foi possível observar uma tendência de maior comprimento de raiz nas maiores diluições da comunidade microbiana (Figura 21A). No tratamento adubado com fitato de cálcio, o comprimento radicular foi diminuindo conforme as diluições da comunidade foram aumentando, com exceção da diluição 10^{-9} que apresentou um comprimento radicular maior que as outras diluições (≈ 60 cm) (Figura 21B). No tratamento adubado com superfosfato triplo foi observada uma tendência de aumento do comprimento radicular conforme a diluição da comunidade foi aumentando (Figura 21C).

Figura 21. Comprimento da parte aérea e radicular aos 30 DAG das plantas de milho. Letras maiúsculas comparam as diluições dentro do mesmo ambiente (parte aérea e radicular) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam as diluições dentro dos diferentes ambientes (parte aérea x radicular) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%.

6.2.3 Matéria seca da parte aérea e radicular

No tratamento adubado com fosfato de Araxá, não foi possível observar variações em relação à matéria seca da parte aérea entre as diluições (Figura 22A). Em relação ao tratamento adubado com fitato de cálcio foi observado que conforme a diluição foi aumentando, o peso da massa seca da parte aérea foi reduzindo (Figura 22B). No tratamento adubado com superfosfato triplo não foi possível observar variações entre o peso da massa seca em relação à diluição aplicada à comunidade microbiana (Figura 22C).

Com relação à matéria seca da parte radicular, apesar de não ser observada uma diferença ($p < 0,05$) em relação às variações nos níveis de diversidade associada à fonte fosfatada, foi possível observar que para os tratamentos adubados com fitato de cálcio e com superfosfato triplo houve tendência de aumento dos valores médios de matéria seca conforme a diversidade foi reduzida (Figura 22). O tratamento adubado fosfato de Araxá não apresentou variações.

Figura 22. Matéria seca da parte aérea e radicular aos 30 DAG das plantas de milho. Letras maiúsculas comparam as diluições dentro do mesmo ambiente (parte aérea e radicular) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam as diluições dentro dos diferentes ambientes (parte aérea x radicular) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%.

6.2.4 Comprimento específico radicular

Com essa relação foi possível constatar que o tratamento suplementado com o fosfato de Araxá e o tratamento controle apresentaram maiores relações quando comparadas aos outros tratamentos. No tratamento adubado com fosfato de Araxá houve aumento no comprimento específico radicular com a diminuição da diversidade microbiana, comportamento este não evidenciado para os demais tratamentos. Apesar de não existir diferença significativa no mesmo tratamento ($p < 0,05$), os valores médios do tratamento de fosfato de Araxá foram superiores aos demais tratamentos (Figura 23).

Figura 23. Comprimento específico radicular aos 30 DAG das plantas de milho. Letras maiúsculas comparam as diluições dentro do mesmo ambiente nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%.

6.2.5 Teor de fósforo na planta

Em relação ao tratamento adubado com fosfato de Araxá, não houve diferença ($p < 0,05$) relacionada aos níveis de diversidade da comunidade microbiana nos teores de fósforo na parte aérea e na raiz (Figura 24A). No tratamento adubado com fitato de cálcio, o teor de fósforo na parte aérea foi maior na diluição 10⁻⁶ (Figura 24B). Os maiores teores de fósforo radicular foram encontrados na comunidade menos diversa (10⁻⁹) (Figura 24B). No tratamento adubado com superfosfato triplo, na parte aérea, observou-se o maior valor médio de P bastante inconstante, onde o maior valor médio obtido foi na diluição 10⁻³ (Figura 24C). Para a raiz, observou-se a mesma tendência observada no tratamento adubado com fitato de cálcio; os maiores valores de P na raiz foram encontrados na maior diluição (10⁻⁹) (Figura 24C).

Figura 24. Fósforo da planta (parte aérea e radicular) aos 30 DAG. Letras maiúsculas comparam as diluições dentro do mesmo ambiente (parte aérea e radicular) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam as diluições dentro dos diferentes ambientes (parte aérea x radicular) nas diferentes fontes de fósforo pelo teste de Tukey a 5%.

7 DISCUSSÃO

Atualmente, diversos trabalhos na literatura descrevem a correlação direta entre a diversidade microbiana e a ocorrência de diversas funções associadas à estabilidade, resiliência e funcionalidade dos ecossistemas, como produção de biomassa e ciclagem de nutrientes (WAGG et al., 2014; SCHNYDER et al., 2018). A ciclagem de nutrientes é uma etapa fundamental, visto que, encontra-se diretamente associada com os níveis de fertilidade dos solos, que estão diretamente relacionados com a produtividade vegetal (DELGADO-BAQUERIZO et al., 2016). Funções como desnitrificação, nitrificação, degradação de matéria orgânica em anaerobiose, oxidação do metano, entre outros, foram comprometidas quando a diversidade microbiana foi reduzida (GRIFFITHS et al., 2000; SALLES et al., 2009; PANKE-BUISSE et al., 2015; SCHNYDER et al., 2018). Um fato interessante é que todos os processos citados anteriormente estão associados com a ciclagem de nitrogênio e carbono, que possuem um “comportamento” similar na natureza. Ambos os nutrientes são renovados em forma de ciclos, sendo todas as suas etapas bem descritas, incluindo os microrganismos que as executam (HAUTIER et al., 2018).

O fósforo é um elemento que se comporta de forma completamente diferenciada do nitrogênio e do carbono na natureza, sendo que a sua renovação na natureza não é cíclica e ela ocorre em duas etapas bastante distintas entre si; uma etapa corresponde ao “ciclo” geológico, que ocorre ao longo das eras geológicas com a ação do intemperismo nas rochas. A outra etapa é conhecida como “ciclo” local, onde o fósforo presente no solo pode ser mineralizado/solubilizado por atividades dependentes/independentes da atividade microbiana (TURNER et al., 2012; YANG et al., 2013; FRASER et al., 2015). Dessa forma, a maneira que o fósforo é encontrado no solo influencia diretamente os processos de disponibilização associados. Esse efeito da solubilidade das fontes de P ficou bastante claro nos dados avaliados, visto que as fontes utilizadas apresentavam diferentes níveis de solubilidade e se correlacionaram de maneira diferenciada nos diferentes ambientes avaliados (rizosfera e solo) e com os diferentes níveis da diversidade microbiana. Dependendo do nível de disponibilidade da fonte de P, o efeito da redução da diversidade microbiana foi diferente.

No tratamento adubado com fosfato de Araxá foi observado que as plantas apresentavam os sintomas de deficiência de fósforo (raquíticas e arroxeadas) e foram comprovadas a partir dos menores teores de P observados tanto na parte aérea quanto na parte radicular. Isso pode estar relacionado à baixa solubilidade do fosfato de Araxá, pois este é obtido a partir da moagem de uma rocha ígnea (rocha dura) com baixo grau de substituição isomórfica (geração de cargas) (NAHAS, 1996). Para este tratamento a deficiência de P pode ter contribuído para o maior CER (comprimento específico radicular), em média, se comparado com os demais tratamentos (fitato de cálcio e superfosfato triplo). Isso por que as plantas de metabolismo C4 (alta taxa fotossintética, milho e cana-de-açúcar, por exemplo) quando são submetidas a um ambiente de escassez de P elas investem em crescimento radicular (ARRUDA et al., 2016) ou até mesmo na excreção de fosfatases capazes de disponibilizar o P para seu metabolismo (NANNIPIERI et al., 2011). Isso poderia justificar a presença de maior atividade na rizosfera das plantas cultivadas neste

tratamento (fosfato de Araxá). Associado a isso está à baixa mobilidade do P no solo, uma vez que ele se transloca por difusão (lento ou quase nulo movimento no solo) (NOVAIS et al., 2007).

A atividade da fosfatase em pH 6,5 foi maior na rizosfera do que no solo (*bulk soil*), como já observado na literatura (FRASER et al., 2015; 2017). Nesse tratamento, foi observado que a abundância do gene *phoD* correlacionou-se negativamente com a atividade da fosfatase em pH 6,5 no ambiente rizosfera, resultado oposto ao que vem sendo encontrado na literatura (FRASER et al., 2015). Esse aumento na abundância do gene *phoD* tanto no ambiente rizosfera quanto no ambiente no solo, pode indicar um enriquecimento desses grupos microbianos, indicando que os organismos podem estar sendo recrutados para esses ambientes com o intuito de promover a disponibilização de P. Outros trabalhos já observaram o enriquecimento de grupos microbianos específicos em situações de redução da diversidade para a realização de funções específicas (PANKE-BUISSE et al., 2015).

Esse possível enriquecimento pode ser confirmado com os dados de amplitude de nicho (*niche breadth*). Conforme a comunidade microbiana foi sendo diluída (os níveis de diversidade foram sendo reduzidos), mais fontes de carbono foram sendo consumidas (mais nichos sendo ocupados). Além disso, no ambiente rizosfera na comunidade mais diluída (10^{-9}), as fontes de carbono mais consumidas foram o ácido pirúvico, β -metil-D-glucosídeo e ácido D-glucosamínico, fontes de carbono que produzem ao final da sua metabolização, ácidos orgânicos de baixo peso molecular, mecanismo reconhecidamente descrito como responsável pela solubilização de fósforo inorgânico (LI et al., 2017). Provavelmente, o tempo de experimento (30 dias) não foi suficiente para detectar mudanças expressivas nos teores de fósforo na planta e no P-lábil nos solos, haja vista que a movimentação do P é muito lenta e grande parte acaba sendo adsorvida aos colóides do solo. Entretanto, o teor de P-lábil na rizosfera na comunidade mais diluída foi maior em relação ao solo e se correlacionou positivamente com os valores de *niche breadth*.

Entre as fontes de P utilizadas no experimento, o fitato de cálcio é tão solúvel quanto o superfosfato triplo, no entanto diferem quanto à composição de P, sendo maior no superfosfato triplo (41% de P_2O_5). No tratamento, a atividade da fosfatase pH 6,5 foi maior na rizosfera do que no *bulk soil*. Entretanto, a atividade da fosfatase em pH 6,5 foi relacionada positivamente com a abundância do gene *phoD* apenas para o ambiente rizosférico ($p < 0,05$). Esse mesmo padrão de relação já foi observado em outros trabalhos e indicam que as espécies microbianas que hospedam o gene *phoD* parecem ser importantes para a produção de fosfatases nesse ambiente (FRASER et al., 2015; 2017). Nesse caso, no ambiente rizosfera, tanto a abundância dos genes *phoD* como o teor de P-lábil se mantiveram constantes, enquanto que no solo, a abundância do gene *phoD* foi aumentando conforme as comunidades microbianas foram diluindo. Esta mesma tendência foi observada no teor do fósforo lábil. O valor de P-lábil constante na rizosfera pode ser justificado por uma limitação associada à técnica do fracionamento do fósforo. DeLuca et al. (2015) decreveram que os processos utilizados durante o fracionamento do fósforo não refletem adequadamente os múltiplos processos (secreção de ácidos orgânicos e prótons, excreção de enzimas extracelulares, entre outros) que ocorrem na rizosfera para a obtenção de fósforo.

Entretanto, no ambiente solo, a atividade da fosfatase no pH 6,5 apresentou tendência reversa; conforme a comunidade microbiana era mais diluída (reduzindo os níveis de diversidade), a atividade da

enzima também foi sendo reduzida. Como a disponibilidade do fósforo é resultado de ações químicas e biológicas, fazer a ligação da atividade de fosfatase diretamente com os teores de fósforo e com as respectivas mudanças de disponibilidade de P é um grande desafio (FRASER et al., 2015).

O fitato de cálcio é de origem orgânica de fósforo com posterior processamento químico, e a sua origem pode estar relacionada com as mudanças na dinâmica do consumo de fontes de carbono. No ambiente rizosférico, as comunidades apresentam perfis metabólicos similares, com preferência no consumo de aminoácidos. Esse padrão de consumo de aminoácidos já foi descrito no ambiente rizosférico. Chaparro et al. (2014) descreveram o consumo de aminoácidos na rizosfera como um mecanismo de sinalização e recrutamento microbiano; as plantas secretam esses componentes para recrutar os organismos que irão colonizar a rizosfera. Já no ambiente solo, a tendência observada refere-se a menos fontes de carbono sendo consumidas na maior diluição da comunidade (10^{-9}), indicando uma maior sobreposição de nichos ocupados, sugerindo um aumento na competição pelos organismos presentes nesse ambiente (LINDOW et al., 1994).

O comprimento e a massa seca da parte aérea foram sendo reduzido conforme a diluição da comunidade microbiana foi aumentando. Entretanto, o teor de fósforo nos tecidos vegetais (tanto parte aérea quanto raiz) apresentou uma tendência, mesmo que não significativa, de ir aumentando conforme a comunidade microbiana foi reduzida. Quando a planta está em um ambiente com baixa disponibilidade de fósforo há uma maior concentração de P nas raízes do que na parte aérea (NOVAIS et al., 2007), fato esse não observado nesse experimento, visto que o teor de P na parte aérea foi maior do que na raiz. Desta forma, sugere-se que assim como observado no tratamento com o fosfato de Araxá, há um enriquecimento dessa comunidade que disponibiliza fósforo nas maiores diluições e que os efeitos na planta podem não ter sido detectados devido ao tempo de duração do experimento (PANKE-BUISSE et al., 2015).

O superfosfato triplo foi a fonte de P utilizada que apresentava os maiores níveis de P disponível, sendo considerada uma fonte prontamente disponível e provavelmente por essa razão a atividade microbiana para a disponibilização do P não seja tão requisitada quando comparada as outras fontes adicionadas. A grande maioria das análises realizadas para a avaliação da comunidade microbiana não foram significativas e nem apresentaram um padrão de comportamento característico.

Com os resultados encontrados nesse trabalho, o efeito da planta é bem marcado, visto que as amostras do solo rizosférico apresentaram sempre um comportamento bastante distinto das amostras do ambiente solo. As plantas apresentam a habilidade de selecionar e recrutar organismos para ocupar a sua rizosfera que possibilitem a ela um ambiente mais estável e rico nutricionalmente, que propicia o seu melhor crescimento e rendimento (ANDREOTE; PEREIRA E SILVA, 2017). Esse efeito de seleção de organismos que auxiliem na absorção de fósforo pela planta já foi descrito na literatura, sendo o seu exemplo mais característico a colonização por fungos micorrízicos (WAGG et al., 2014). A planta, por questões de adaptações e economia energética, estabelece a relação de simbiose com fungos micorrízicos principalmente quando ela se encontra em um ambiente deficiente em fósforo ou sob condições de estresse hídrico (BHANDARI; GARG, 2017). Apesar de apresentar diversos mecanismos que

possibilitem a planta a captar o fósforo da solução do solo, sua aquisição é bastante ampliada com a atividade microbiana. Neste contexto, evidencia-se a grande importância das associações entre bactérias solubilizadoras de P com fungo micorrízico arbúscular, possibilitando assim uma melhoria na aquisição de P pela planta a partir desta associação (ZHANG et al., 2014). Esse fato é mais evidente quando observamos os sintomas mais severos de deficiência de fósforo nas folhas do tratamento de fosfato de Araxá do que nos outros tratamentos. Como essa fonte é basicamente utilizada por atividade microbiana, a planta não consegue sozinha disponibilizar esse fósforo para a sua utilização.

A redução da diversidade microbiana impacta diretamente na realização de uma série de funções-chaves para a realização dos serviços ecossistêmicos (HAUTIER et al., 2018; DELGADO-BAQUERIZO et al., 2016; WAGG et al., 2014). Entretanto, pela dinâmica diferenciada do elemento fósforo na natureza e pela possível redundância funcional desse processo, a redução da diversidade microbiana aparentemente não comprometeu o processo de disponibilização de fósforo para a planta. Nesse trabalho não podemos afirmar que a diversidade microbiana de fato foi reduzida pela técnica da diluição para extinção, pois não podemos falar em diversidade utilizando apenas metodologias de *fingerprinting* (ex. PCR-DGGE). Mas podemos afirmar que essa técnica nos permitiu construir comunidades bastante dissimilares. Para comprovar a redução da diversidade, o sequenciamento em larga escala está sendo analisado.

8 CONCLUSÕES

- ✓ As diferentes fontes de fósforo assim como a possível redução da diversidade microbiana obtida pela metodologia de diluição para extinção levou a seleção de grupos microbianos que se comportaram de modo diferente conforme a fonte de fósforo utilizada.

REFERÊNCIAS

- AMES, B.N. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. In: NEUFELD, E.; GINSBURG, V. ed., **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, p. 115-118, 1966.
- ANDA - Associação Nacional para a Difusão de Adubos. **Estatísticas Indicadores: Principais Indicadores do Sector de Fertilizantes**. Disponível em: <http://anda.org.br/index.php?mpg=03.00.00>. Acesso em 23/11/2017.
- ANDREOTE, F.D.; PEREIRA E SILVA, M.C. Microbial communities associated with plants: learning from nature to apply it in agriculture. **Current Opinion in Microbiology**, v. 37, p. 29-34, 2017.
- ARRUDA, B.; RODRIGUES, M.; SOLTANGHEISI, A.; RICHARDSON, A.E.; ANDREOTE, F.D.; PAVINATO, P.S. Biological and morphological traits of sugarcane roots in relation to phosphorus uptake. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 16, p. 901-915, 2016.
- BATAGLIA, O.C.; FURLANI, A.M.C.; TEIXEIRA, J.P.F.; FURLANI, P.R.; GALLO, J.R. **Métodos de análises químicas de plantas**. Campinas, Instituto Agronômico de Campinas, 1983. 48 p.
- BHANDARI, P.; GARG, N. Arbuscular mycorrhizal symbiosis: A promising approach for imparting abiotic stress tolerance in crop plants. In: SINGH, D.P.; SINGH, H.B.; PRABHA, R., eds. **Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives**. Springer, Singapore, p. 377-401, 2017.
- BRADY, N.C.; WEIL, R.R. **Elementos da natureza e propriedades dos solos**. 3.ed. Porto Alegre: Bookman, 2013.
- BUSBY, P.E., SOMAN, C., WAGNER, M.R., FRIESEN, M.L., KREMER, J., BENNETT, A., MORSY, M., EISEN, J.A., LEACH, J.E., DANGL, J.L. Research priorities for harnessing plant microbiomes in sustainable agriculture. **PlosBiology**, doi.org/10.1371/journal.pbio.2001793. 2017.
- CAIONE, G.; MELLO PRADO, R. de; CAMPOS, C.N.S.; RODRIGUES, M.; PAVINATO, P.S.; AGOSTINHO, F.B. Phosphorus fractionation in soil cultivated with sugarcane fertilized by filter cake and phosphate sources. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 46, p. 2449-2459, 2015.
- CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Sociedade Brasileira de Ciências do solo, Campinas, p. 231-255, 1992.

- CARDOSO, I.M.; VAN DER MEER, P.; OENEMA, O.; JANSSEN, B.H.; KUYPER, T.W. Analysis of phosphorus by ^{31}P NMR in Oxisols under agroforestry and conventional coffee systems in Brazil. **Geoderma**, v. 112, p. 51-70, 2003.
- CHAPARRO, J.M.; BADRI, D.V.; VIVANCO, J.M. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. **The ISME Journal**, v. 8, p. 790-803, 2014.
- CHEN, Y.P.; REKHA, P.D.; ARUN, A.B.; SHEN, F.T.; LAI, W.-A.; YOUNG, C.C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied Soil Ecology**, v. 34, p. 33-41, 2006.
- CHIEN S.H.; PROCHNOW, L.I.; TU, S.; SNYDER, C.S. Agronomic and environmental aspects of phosphate fertilizers varying in source and solubility: An update review. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 89, p. 229-255, 2011.
- CONDON, L.M.; GOH, K.M.; NEWMAN, R.H. Nature and distribution of soil phosphorus as revealed by a sequential extraction method followed by ^{31}P nuclear magnetic resonance analysis. **Journal of Soil Science**, v. 36, p. 199-207, 1985.
- COTTA, S. R.; CAVALCANTE FRANCO DIAS, A.; SELDIN, L.; ANDREOTE, F. D.; VAN ELSAS, J. D. The diversity and abundance of phytase genes (β -propeller phytases) in bacterial communities of the maize rhizosphere. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, p. 264-268, 2016.
- CRICQUET, S.; FERRE, E.; FARNER, E.M.; LE PETIT, J. Annual dynamics of phosphatase activities in an evergreen oak litter: Influence of biotic and abiotic factors. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 1111-1118, 2004.
- CRUZ, C.V. **Efeito residual de fontes de fósforo e adubação fosfatada no crescimento do milho**. 2015. Dissertação (Mestrado em Agricultura) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 2015.
- DARDANELLI, M.S.; MANYANI, H.; GONZALEZ-BARROSO, S.; RODRIGUEZ-CARVAJAL, M.A.; GIL-SERRANO, A.M.; ESPUNY, M.R.; LÓPEZ-BAENA, F.J.; BELLOGÍN, R.A.; MEGÍAS, M.; OLLERO, F.J. Effect of the presence of the plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) *Chryseobacterium balustinum* Aur9 and salt stress in the pattern of flavonoids exuded by soybean roots. **Plant Soil**, v. 328, p. 483-493, 2010.
- DELGADO-BAQUERIZO, M.; MAESTRE, F.T.; REICH, P.B.; JEFFRIES, T.C.; GAITAN, J.J.; ENCINAR, D.; BERDUGOL, M.; CAMPBELL, C.D.; SINGH, B.K. Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. **Nature Communications**, v.7, p. 1-8, 2016.

- DELUCA, T.H.; GLANVILLE, H.C.; HARRIS, M.; EMMETT, B.A.; PINGREE, M.R.A.; SOSA, L.L.; CERDÁ-MORENO, C.; JONES, D.L. A novel biologically-based approach to evaluating soil phosphorus availability across complex landscapes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 88, p. 110-119, 2015.
- DICK, W.A.; TABATABAI, M.A. Determination of orthophosphate in aqueous solutions containing labile organic and inorganic phosphorus compounds. **Journal of Environmental Quality**, v. 6, p. 82-85, 1977.
- FIERER, N. Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, p. 579-590, 2017.
- FOO, J.L.; LING, H.; LEE, Y.S.; CHANG, M.W. Microbiome engineering: Current applications and its future. **Biotechnology journal**, v. 12, p. 1-11, 2017.
- FRASER, T.D.; LYNCH, D.H.; BENT, E.; ENTZ, M.H.; DUNFIELD, K.E. Soil bacterial *phoD* gene abundance and expression in response to applied phosphorus and long-term management. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 88, p. 137-147, 2015.
- FRASER, T.D.; LYNCH, D.H.; GAIERO, J.; KHOSLA, K.; DUNFIELD, K.E. Quantification of bacterial non-specific acid (*phoC*) and alkaline (*phoD*) phosphatase genes in bulk and rhizosphere soil from organically managed soybean fields. **Applied Soil Ecology**, v. 111, p. 48-56, 2017.
- GATIBONI, L.C.; KAMINSKI, J.; RHEINHEIMER, D.S.; FLORES, J.P.C. Bioavailability of soil phosphorus forms in no-tillage system. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 691-699, 2007.
- GRIFFITHS, B.S.; RITZ, K.; BARDGETT, R.D.; COOK, R.; CHRISTENSEN, S.; EKELOUND, F.; SORENSEN, S.J.; BAATH, E.; BLOEM, J.; DE RUITER, P.C.; DOLFING, J.; NICOLARDOT, B. Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity–ecosystem function relationship. **Oikos**, v. 90, p. 279-294, 2000.
- HAMDALI, H.; BOUIZGARNE, B.; HAFIDI, M.; LEBRIHI, A.; VIROLLE, M.J.; OUHDOUCH, Y. Screening for rock phosphate solubilizing actinomycetes from Moroccan phosphate mines. **Applied Soil Ecology**, v.38, p. 12-19, 2008.
- HAMMOND, L.L.; CHIEN, S.H.; EASTERWOOD, G.W. Agronomic effectiveness of bayovar phosphate rock in soil with induced phosphorus retention. **Soil Science Society of America Journal**, v. 50, p. 1601-1606, 1986.
- HAUTIER, A.; ISBELL, F.; BORER, E.T.; SEABLOOM, E.W.; HARPOLE, W.S.; LIND, E.M.; MACDOUGALL, A.S.; STEVENS, C.J.; ADLER, P.B.; ALBERTI, J.; BAKKER, J.D.;

- BRUDVIG, L.A.; BUCKLEY, W.M.; CADOTTE, M.; CALDEIRA, M.C.; CHANETON, E.J.; CHU, C.; DALEO, P.; DICKMAN, C.R.; DWYER, J.M.; ESKELINEN, A.; FAY, P.A.; FIRN, J.; HAGENAH, N.; HILLEBRAND, H.; IRIBARNE, O.; KIRKMAN, K.P.; KNOPS, J.M.H.; LA PIERRE, K.J.; MCCULLEY, R.L.; MORGAN, J.W.; PÄRTEL, M.; PASCUAL, J.; PRICE, J.N.; PROBER, S.M.; RISCH, A.C.; SANKARAN, M.; SCHUETZ, M.; STANDISH, R.J.; VIRTANEN, R.; WARDLE, G.M.; YAHDJIAN, L.; HECTOR, A. Local loss and spatial homogenization of plant diversity reduce ecosystem multifunctionality. **Nature Ecology and Evolution**, v. 2, p. 50-56, 2018.
- HEDLEY, M.J.; STEWART, J.W.B.; CHAUHAN, B.S. Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. **Soil Science Society of America Journal**, v. 46, p. 970-976, 1982.
- HEUER H.; KRSEK M.; BAKER P.; SMALLA K.; WELLINGTON E.M. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3233-3241, 1997.
- HU, Y.; DOU, X.; LI, J.; LI, F. Impervious surfaces alter soil bacterial communities in urban areas: A case study in Beijing, China. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-9, 2018.
- JORQUERA, M.A.; HERNANDEZ, M.T.; RENGEL, Z.; MARSCHNER, P.; MORA, M.D. Isolation of culturable phosphor bacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 44, p. 1025-1034, 2008.
- KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; WANI, P.A. Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - A review. In: LICHTFOUSE, E.; NAVARRETE, M.; DEBAEKE, P.; VÉRONIQUE, S.; ALBEROLA, C. eds., **Sustainable Agriculture**. Dordrecht: Springer Netherlands, p. 551-570, 2009.
- LI, Y.; LIU, X.; HAO, T.; CHEN, S. Colonization and maize growth promotion induced by phosphate solubilizing bacterial isolates. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 1-16, 2017.
- MALLON, C.A.; POLY, F.; LE ROUX, X.; MARRING, I.; VAN ELSAS, J.D.; SALLES, J.F. Resource pulses can alleviate the biodiversity-invasion relationship in soil microbial communities. **Ecology**, v. 96, p. 915-926, 2015.
- MALLON, C.A.; LE ROUX, X.; VAN DOORN, G.S.; DINI-ANDREOTE, F.; POLY, F.; SALLES, J.F. The impact of failure: Unsuccessful bacterial invasions steer the soil microbial community away from the invader's niche. **The ISME Journal**, v. 12, p. 728-741, 2018.

- MARQUES, M.A.; QUINTELA, E.D. Efeito do detergente neutro na mortalidade de ninfas da *Bemisia tabaci* biótipo B no feijoeiro comum. In: **CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO**, 10., 2011, Goiânia. Anais... Goiânia: Embrapa Arroz e Feijão, 2011. CD-ROM.
- MARRA, L.M.; SOARES, C.R.F.S.; OLIVEIRA, S.M.; FERREIRA, P.A.A.; SOARES, B.L.; CARVALHO, R.F.; LIMA, J.M.; MOREIRA, F.M.S. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, v. 357, p. 289-307, 2012.
- MASSENSINI, A.M.; TÓTOLA, M.R.; BORGES, A.C.; COSTA, M.D. Solubilização potencial de fosfatos mediada pela microbiota rizosférica de eucalipto cultivado em topossequência típica da Zona da Mata Mineira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, p. 692-700, 2015.
- MULLANEY, E.J.; ULLAH, A.H.J. The term phytase comprises several different classes of enzymes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 312, p. 179-184, 2003.
- 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.
- MUYZER, G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 695-700, 1993.
- NAHAS, E. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 567-572, 1996.
- NANNIPIERI, P.; GIAGNONI, L.; LANDI, L.; RENELLA, G. Role of Phosphatase Enzymes in Soil. In: BÜNEMANN, E.; OBERSON, A.; FROSSARD, E., eds. **Phosphorus in action: Biological processes in soil phosphorus cycling**. Springer, Berlin, p. 215-243, 2011.
- NIU, B.; PAULSON, J.N.; ZHENG, X.; KOLTER, R. Simplified and representative bacterial community of maize roots. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 114: 2450-2459, 2017.
- NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J.; NUNES, F.N. Fósforo. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. **Fertilidade do solo**. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p. 471-537, 2007.

- NUCCIO, E.E.; HODGE, A.; PETT-RIDGE, J.; HERMAN, D.J.; WEBER, P.K.; FIRESTONE, M.K. An arbuscular mycorrhizal fungus significantly modifies the soil bacterial community and nitrogen cycling during litter decomposition. **Environmental Microbiology**, v. 15, p. 1870-1881, 2013.
- OLIVEIRA, J.P.M.; OLIVEIRA FILHO, L.C.L.; POCOJESKI, E. A aplicação localizada de monoamônio fosfato favorece a disponibilidade de p no solo e sua absorção. **Revista Scientia Agraria**, v. 18, p. 12-19, 2017.
- OGASAWARA, E.; KULAIF, Y.; FERNANDES, F.R.C. A Indústria Brasileira de Fertilizantes (Cadeia NPK, Enxofre, Rocha Fosfática e Potássio) Projeções de 2010 a 2030. In: FERNANDES, F.R.C.; LUZ, A.B.; CASTILHOS, Z.C. eds. **Agrominerais para o Brasil**, Rio de Janeiro: CETEM/MCT, p. 125-144, 2010.
- PANKE-BUISSE, K.; POOLE, A.C.; GOODRICH, J.K.; LEY, R.; KAO-KNIFFIN, J. Selection on soil microbiomes reveals reproducible impacts on plant function. **The ISME Journal**, v. 9, p. 980-989, 2015.
- PAVINATO, P.S.; RODRIGUES, M.; SOLTANGHEISI, A.; SARTOR, L.R.; WITHERS, P.J.A. Effects of cover crops and phosphorus sources on maize yield, phosphorus uptake, and phosphorus use efficiency. **Agronomy Journal**, v. 109, p. 1039-1047, 2017.
- PEIX, A.; VELAZQUEZ, E.; MARTÍNEZ-MOLINA, E. Molecular methods for biodiversity analysis of phosphate solubilizing microorganisms (PSM) In: VELAZQUEZ, E.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C. eds., **First international meeting on microbial phosphate solubilization**. Berlin: Springer, p. 97-100, 2007.
- PÉREZ-JARAMILLO, J.E.; CARRIÓN, V.J.; BOSSE, M.; FERRÃO, L.F.V.; DE HOLLANDER, M.; GARCIA, A.A.F.; RAMÍREZ, C.A; MENDES, R.; RAAIJMAKERS, J.M. Linking rhizosphere microbiome composition of wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* to genotypic and root phenotypic traits. **The ISME Journal**, v.11, p. 2244-2257, 2017.
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2017.
- RENELLA, G.; EGAMBERDIYEVA, D.; LANDI, L.; MENCH, M.; NANNIPIERI, P. Microbial activity and hydrolase activities during decomposition of root exudates released by an artificial root surface in Cd-contaminated soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 702-708, 2006.
- RICHARDSON, A.E.; BAREA, J.M.; MCNEILL, A.M.; PRIGENT-COMBARET, C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and Soil**, v. 321, p. 305-339, 2009.

- RICHARDSON, A.E.; SIMPSON, R.J. Soil microorganisms mediating phosphorus availability. **Plant Physiology**, v. 156, p. 989-996, 2011.
- ROSSI, C.Q. **Matéria orgânica do solo e fósforo orgânico em cronossequencia de cana-de-açúcar cultivada no cerrado**. 2013. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2013.
- ROTILI, E.A.; FIDELIS, R.R.; SANTOS, M.S.; BARROS, H.B.; PINTO, L.C. Eficiência do uso e resposta à aplicação de fósforo de cultivares de arroz em solos de terras altas. **Bragantia**, v. 69, p. 705-710, 2010.
- ROY, E.D.; RICHARDS, P. D.; MARTINELLI, L. A.; COLETTA, L. Della; LINS, S. R. M.; VAZQUEZ, F. F.; WILLIG, E.; SPERA, S. A.; VANWEY, L. K.; PORDER, S. The phosphorus cost of agricultural intensification in the tropics. *Nature Plants*, v. 2, p. 2–7, 2016.
- SALLES, J. F.; POLY, F.; SCHMID, B.; ROUX, X. L. Community niche predicts the functioning of denitrifying bacterial assemblages. *Ecology*, v. 90, p. 3324-3332, 2009.
- SANTOS-BENEIT, F. The Pho regulon : a huge regulatory network in bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–13, 2015.
- SAKURAI, M.; WASAKI, J.; TOMIZAWA, Y.; SHINANO, T.; OSAKI, M. Analysis of bacterial communities on Alkaline phosphatase in soil supplied with organic matter. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 54, p. 62-71, 2008.
- REZA, S.K.; SINGH, S.; DATTA, S.C.; PURAKAYASTHA, T.J.; SINGH, S.K. Phosphorus solubilization through organic acids production in pressmud composted with rock phosphate. **National Academy Science Letters**, v. 40, p. 1-4, 2016.
- SHARMA, S.B.; SAYYED, R.Z.; TRIVEDI, M.H.; GOBI, T.A. Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **Springer Plus**, v. 2, p. 1-14, 2013.
- SCHNYDER, E.; BODELIER, P.L.E.; HARTMANN, M.; HENNEBERGER, R.; NIKLAUS, P.A. Positive diversity-functioning relationships in model communities of methanotrophic bacteria. **Ecological Society of America**, v. 99, p. 714-723, 2018.
- SOUSA, D.M.G.; REIN, T.A.; GOEDERT, W.J.; LOBATO, E.; NUNES, R.S. Fósforo. In: PROCHNOW, L.I.; CASARIN, V.; STIPP, S.R. **Boas práticas para uso eficiente de fertilizantes: Nutrientes**. Piracicaba: IPNI - Brasil, v. 2, p. 71-126, 2010.
- TABATABAI, M.A.; BREMNER, J.M. Use of p-nitrofenol phosphate for assay of soil phosphatase activity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 1, p. 301-307, 1969.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª ed. Editora Guanabara Koogan. Porto Alegre. p. 454-460. 2013.

- TELES, A.P.B.; RODRIGUES, M.; HERRERA, W.F.B.; SOLTANGHEISI, A.; SARTOR, L.R.; WITHERS, P.J.A.; PAVINATO, P.S. Do cover crops change the lability of phosphorus in a clayey subtropical soil under different phosphate fertilizers? **Soil Use and Management**, v. 33, p. 34-44, 2017.
- TER BRAAK, C.J.F.; SMILAUER, P. **CANOCO Reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5)**. Ithaca, Microcomputer Power, 2002.
- TILMAN, D.; ISBELL, F.; COWLES, J.M. Biodiversity and Ecosystem Functioning. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 45, p. 471-493, 2014.
- TORSVIK, V.; DAAE, F.L.; SANDAA, R.A.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 240-245, 2002.
- TURNER, B.L.; CHEESMAN, A.W.; GODAGE, H.Y.; RILEY, A.M.; POTTER, B.V.L. Determination of *neo*- and *D-chiro*-inositol hexakisphosphate in soils by solution ³¹P NMR spectroscopy. **Environmental Science & Technology**, v. 46, p. 4994-5002, 2012.
- VAN ELSAS, J.D.; CHIURAZZI, M.; MALLON, C.A.; ELHOTTOVĀ, D.; KRIŠTŮFEK, V.; SALLES, J.F. Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, p. 1159-1164, 2012.
- WAGG, C.; BENDER, S.F.; WIDMER, F.; VAN DER HEIJDEN, M.G.A. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, p. 5266-5270, 2014.
- WARDLE, D.A. Do experiments exploring plant diversity-ecosystem functioning relationships inform how biodiversity loss impacts natural ecosystems? **Journal of Vegetation Science**, v. 27, p. 646-653, 2016.
- WERTZ S.; DEGRANGE V.; PROSSER J.I.; POLY F.; COMMEAUX C.; FREITAG T.; GUILLAUMAUD N.; ROUX X.L. Maintenance of soil functioning following erosion of microbial diversity. **Environmental Microbiology**, v. 8, p. 2162-2169, 2006.
- WITHERS, P.J.A.; RODRIGUES, M.; SOLTANGHEISI, A.; DE CARVALHO, T.S.; GUILHERME, L.R.G.; BENITES, V.D.M.; GATIBONI, L.C.; SOUSA, D.M.G. de; NUNES, R.D.S.; ROSOLEM, C.A.; ANDREOTE, F.D.; OLIVEIRA, A. de; COUTINHO, E.L.M.; PAVINATO, P.S. Transitions to sustainable management of phosphorus in Brazilian agriculture. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1-13, 2018.

- YANG, X.; POST, W.M.; THORNTON, P.E.; JAIN, A. The distribution of soil phosphorus for global biogeochemical modeling. **Biogeosciences**, v. 10, p. 2525-2537, 2013.
- ZAIA, F.C.; GAMA-RODRIGUES, A.C.; GAMA-RODRIGUES, E. F. da; MACHADO, R.C.R. Fósforo orgânico em solos sob agrossistemas de cacau. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p.1987-1995, 2008.
- ZAIDI, A.; KHAN, M.S.; AHMED, M.; OVES, M.; WANI, P.A. Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes. In: KHAN, M.S. ed., **Microbial strategies for crop improvement**. Berlin Heidelberg, p. 23-50, 2009.
- ZHANG, L.; FAN, J.; DING, X.; HE, X.; ZHANG, F.; FENG, G. Hyphosphere interactions between an arbuscular mycorrhizal fungus and a phosphate solubilizing bacterium promote phytate mineralization in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 74, p. 177-183, 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE A.

Tabela 1. Consumo de fontes de carbono a partir do BIOLOG para o tratamento adubado com fosfato de Araxá.

Fontes de carbono	Rizosfera					Solo				
	Controle	10-1	10-3	10-6	10-9	Controle	10-1	10-3	10-6	10-9
Ácido piruvico	0,23	0,33	0,11	0,23	0,55	0,27	0,38	0,56	0,42	0,04
Tween 40	0,28	0,12	0,02	0,31	0,47	0,04	0,40	0,48	0,63	0,01
Tween 80	0,66	0,64	0,33	0,48	0,53	0,18	0,53	0,58	0,48	0,53
α -Ciclodextrina	0,62	0,56	0,63	0,67	0,66	0,91	0,69	0,81	0,84	0,90
Glicogênio	0,15	0,12	0,11	0,06	0,14	0,15	0,08	0,16	0,10	0,09
D-Celobiose	0,54	0,77	0,30	0,35	0,56	0,29	0,62	0,60	0,64	0,26
α -D-lactose	0,94	0,92	0,77	0,84	0,94	0,93	0,91	0,92	0,90	0,90
β -metil-D-glucosídeo	0,54	0,52	0,44	0,56	0,66	0,57	0,56	0,74	0,47	0,63
D-Xilose	0,21	0,13	0,06	0,08	0,16	0,08	0,15	0,22	0,21	0,10
i-Eritritol	0,04	0,12	0,05	0,01	0,02	0,05	0,09	0,14	0,14	0,01
D-Manitol	0,37	0,15	0,09	0,26	0,29	0,30	0,25	0,35	0,34	0,27
N-acetil-D-glucosamina	0,50	0,38	0,36	0,39	0,55	0,34	0,48	0,46	0,36	0,55
Ácido D-glucosamínico	0,49	0,39	0,22	0,66	0,80	0,26	0,66	0,70	0,60	0,33
Glucose 1 - fosfato	0,59	0,89	0,34	0,66	0,95	0,42	0,88	0,55	0,69	0,45
D-L, fosfato de α -glicerol	0,45	0,90	0,35	0,60	0,91	0,08	0,69	0,38	0,62	0,02
Ácido lactônico	0,25	0,13	0,02	0,05	0,17	0,05	0,41	0,40	0,35	0,22
Ácido D-galacturônico	0,32	0,49	0,15	0,46	0,62	0,20	0,63	0,58	0,56	0,16
Ácido 2-hidroxi-benzoico	0,28	0,33	0,27	0,28	0,57	0,32	0,27	0,30	0,29	0,10
Ácido 4-hidroxi-benzoico	0,17	0,03	0,03	0,03	0,06	0,07	0,08	0,08	0,06	0,06
Ácido γ -hidroxibutírico	0,13	0,17	0,24	0,13	0,29	0,27	0,41	0,48	0,31	0,21
Ácido itacônico	0,11	0,09	0,04	0,09	0,09	0,08	0,15	0,04	0,08	0,03
Ácido α -cetobutírico	0,27	0,49	0,18	0,26	0,26	0,28	0,55	0,40	0,41	0,24
Ácido D-málico	0,05	0,05	0,03	0,05	0,09	0,09	0,10	0,13	0,14	0,16
L-Arginina	0,46	0,30	0,26	0,44	0,76	0,28	0,37	0,67	0,59	0,31
L-Asparagina	0,38	0,30	0,02	0,21	0,46	0,28	0,30	0,49	0,36	0,02
L-Fenilalanina	0,12	0,01	0,04	0,02	0,08	0,09	0,16	0,18	0,19	0,09
L-Serina	0,38	0,86	0,46	0,85	0,84	0,09	0,56	0,32	0,50	0,06
L-Treonina	0,09	0,15	0,08	0,35	0,08	0,19	0,32	0,36	0,15	0,07
Ácido glicílico-L-glutânico	0,12	0,02	0,02	0,13	0,10	0,04	0,03	0,08	0,06	0,01
Feniletilamina	0,20	0,59	0,07	0,18	0,16	0,32	0,52	0,38	0,27	0,24
Putrescina	0,50	0,73	0,28	0,70	0,79	0,06	0,71	0,72	0,52	0,26

APÊNDICE B.

Tabela 2. Consumo de fontes de carbono a partir do BIOLOG para o tratamento adubado com fitato de Cálcio.

Fontes de carbono	Rizosfera					Solo				
	Controle	10-1	10-3	10-6	10-9	Controle	10-1	10-3	10-6	10-9
Ácido piruvico	0,19	0,44	0,47	0,35	0,52	0,26	0,38	0,56	0,42	0,04
Tween 40	0,43	0,31	0,33	0,76	0,36	0,31	0,40	0,48	0,63	0,01
Tween 80	0,33	0,79	0,58	0,59	0,59	0,19	0,53	0,58	0,48	0,53
α -Ciclodextrina	0,90	0,69	0,55	0,78	0,75	0,95	0,69	0,81	0,84	0,90
Glicogênio	0,09	0,19	0,08	0,38	0,11	0,10	0,08	0,16	0,10	0,09
D-Celobiose	0,79	0,78	0,54	0,77	0,67	0,55	0,62	0,60	0,64	0,26
α -D-lactose	0,93	1,00	0,98	0,92	0,95	0,93	0,91	0,92	0,90	0,90
β -metil-D-glucosídeo	0,62	0,62	0,46	0,46	0,57	0,46	0,56	0,74	0,47	0,63
D-Xilose	0,16	0,26	0,20	0,27	0,26	0,14	0,15	0,22	0,21	0,10
i-Eritritol	0,17	0,28	0,06	0,07	0,02	0,02	0,09	0,14	0,14	0,01
D-Manitol	0,68	0,47	0,35	0,27	0,40	0,49	0,25	0,35	0,34	0,27
N-acetil-D-glucosamina	0,46	0,50	0,36	0,32	0,41	0,33	0,48	0,46	0,36	0,55
Ácido D-glucosamínico	0,78	0,64	0,76	0,57	0,76	0,43	0,66	0,70	0,60	0,33
Glucose 1 - fosfato	0,69	0,76	0,84	0,63	0,77	0,65	0,88	0,55	0,69	0,45
D-L, fosfato de α -glicerol	0,44	0,61	0,69	0,58	0,32	0,06	0,69	0,38	0,62	0,02
Ácido lactônico	0,33	0,35	0,18	0,26	0,36	0,23	0,41	0,40	0,35	0,22
Ácido D-galacturônico	0,65	0,66	0,49	0,73	0,67	0,25	0,63	0,58	0,56	0,16
Ácido 2-hidroxi-benzoico	0,47	0,48	0,21	0,26	0,33	0,46	0,27	0,30	0,29	0,10
Ácido 4-hidroxi-benzoico	0,25	0,19	0,11	0,12	0,11	0,19	0,08	0,08	0,06	0,06
Ácido γ -hidroxibutírico	0,39	0,33	0,20	0,49	0,28	0,28	0,41	0,48	0,31	0,21
Ácido itacônico	0,35	0,37	0,29	0,35	0,22	0,09	0,15	0,04	0,08	0,03
Ácido α -cetobutírico	0,49	0,37	0,34	0,49	0,40	0,52	0,55	0,40	0,41	0,24
Ácido D-málico	0,10	0,17	0,12	0,13	0,14	0,07	0,10	0,13	0,14	0,16
L-Arginina	0,48	0,62	0,67	0,78	0,66	0,25	0,37	0,67	0,59	0,31
L-Asparagina	0,18	0,54	0,55	0,51	0,63	0,19	0,30	0,49	0,36	0,02
L-Fenilalanina	0,31	0,15	0,16	0,07	0,21	0,36	0,16	0,18	0,19	0,09
L-Serina	0,27	0,79	0,66	0,55	0,46	0,16	0,56	0,32	0,50	0,06
L-Treonina	0,13	0,31	0,31	0,14	0,34	0,17	0,32	0,36	0,15	0,07
Ácido glicílico-L-glutânico	0,17	0,13	0,06	0,12	0,06	0,03	0,03	0,08	0,06	0,01
Feniletilamina	0,53	0,71	0,33	0,37	0,39	0,61	0,52	0,38	0,27	0,24
Putrescina	0,39	0,75	0,62	0,73	0,79	0,04	0,71	0,72	0,52	0,26

ANEXO

Tabela 3. Análise química do solo

	pH	M.O	H + Al	K	Ca	Mg	P	Al
		g kg ⁻¹	-----	mmol c kg ⁻¹	-----	-----	-----	mg kg ⁻¹ -----
Solo	4,5	20,0	20,0	1,3	4,0	3,0	6,0	2,0

pH: potencial hidrogeniônico; M.O: matéria orgânica; H+AL: acidez potencial; K: potássio; Ca: cálcio; Mg: magnésio; P: fósforo; Al: alumínio.