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

**Aumento da produtividade e mudanças na microbiota do solo
em cultivo de cana-de-açúcar com aplicação de composto e
inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato**

Antonio Marcos Miranda Silva

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Solos e
Nutrição de Plantas

**Piracicaba
2018**

Antonio Marcos Miranda Silva
Engenheiro Agrônomo

**Aumento da produtividade e mudanças na microbiota do solo em cultivo de
cana-de-açúcar com aplicação de composto orgânico e inoculação de
bactérias solubilizadoras de fosfato**

Orientador:
Profa. Dra. **ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Solos e
Nutrição de Plantas

Piracicaba
2018

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

Silva, Antonio Marcos Miranda

Aumento da produtividade e mudanças na microbiota do solo em cultivo de cana-de-açúcar com aplicação de composto e inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato / Antonio Marcos Miranda Silva. - - Piracicaba, 2018.

72p.

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

1. Consórcio microbiano 2. qPCR 3. Atividade enzimática 4. Fosfato de rocha I. Título

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me guiar e iluminar meus passos;

À minha rainha (Gilvanete) que cumpriu muito bem o papel de pai e mãe na ausência do meu pai Lourivaldo (*in memoriam*), ao meu irmão João e sobrinho Enzo;

À minha segunda mãe, Clarice e ao seu esposo Osvaldo (padrinho) e também às minhas irmãs (Marizélia e Mayse) e sobrinhos (Guilherme e Anthony);

À Marizélia e à tia Francisca por servirem como exemplo para estudar;

À minha orientadora Dra. Elke JBN Cardoso, pelos ensinamentos, paciência e por ser esse exemplo de profissional;

Ao Dr. Germán Estrada e à Dra. Cíntia Lopes que sempre me ajudaram na escrita da dissertação;

À ESALQ/USP, ao programa de Solos e Nutrição de Plantas e ao CNPq pela bolsa de estudo;

Aos amigos de orientação, Arthur, Maiele, Carol, Germán, Bruna, Henrique, Maurício e Ademir que compartilharam muitos momentos nestes dois anos;

Aos amigos que o laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo da ESALQ/USP me proporcionou, especialmente os técnicos, Denise, Fernandinho e Sônia que, sempre sorridentes, estavam dispostos a ajudar;

Ao professor Dr. Fernando Andreote e toda a sua equipe, especialmente à Dra. Simone Cotta que, sempre com simpatia e competência, se dispunha a ajudar;

Ao meu Pai Chico, o patriarca da família Miranda, à sua companheira Betinha e aos primos que são irmãos, Camila, Crislane, Kaka, Lara e Luanda;

À minha tia Ruth que ergueu a mão para que eu fosse morar em Brasília, lugar este onde fiz amigos durante a graduação e que irei levar para a vida (Ane, Amandinha, Andréia, André Ferreira, Bruno, Daniel, Eric, Leandro, Maurício, Michelle Mota, Michele, Patrício, Samara e Stefany);

À equipe do DVATCOM pela oportunidade de morar na Vila Estudantil, local este onde fiz amigos incríveis, especialmente as amigas Aline e Yasmin. Aos amigos, Cátia, Luciane, Rony, Octávio, Guilherme Nakata e Daniele;

Ao casal Carmen e Abel, que me contrataram para trabalhar na Mercearia Cavalcante, mesmo sem ter experiência, e sempre vibraram com minhas conquistas;

Aos professores que serviram como exemplo, especialmente a Dra. Maria Lucrécia, Dra. Robervone, Dra. Alessandra de Paula, Dr. Cícero Figueiredo e a todos os professores da UnB e da ESALQ/USP;

MUITO OBRIGADO!

“O papel dos infinitamente pequenos é infinitamente grande”

Louis Pasteur

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO.....	9
Hipóteses	11
Objetivo geral da pesquisa	11
Objetivos específicos	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Cana-de-açúcar.....	13
2.1.1 Origem e importância econômica.....	13
2.1.2 Produtos e subprodutos	14
2.2 Fósforo no solo.....	15
2.3 O papel da microbiota na disponibilidade de P	16
2.4 Mudanças na microbiota do solo em resposta ao manejo.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Área experimental	21
3.2 Tratamentos	22
3.3 Amostragem de solo e de planta	23
3.4 Atividade enzimática do solo	24
3.4.1 Fosfatase ácida e alcalina.....	24
3.4.2 Fitase	24
3.4.3 β -Glucosidase	24
3.5 Metodologias moleculares.....	25
3.5.1 Extração do DNA total.....	25
3.5.2 Abundância do gene 16S RNAr	25
3.5.3 Abundância do gene phoD.....	26
3.5.4 Abundância do gene ITS.....	26
3.5.5 Estrutura da comunidade bacteriana.....	27
3.5.6 Estrutura da comunidade fúngica.....	28
3.6 Análises química do solo e planta	29
3.7 Análise dos dados	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Fosfatase ácida	31

4.2	Fosfatase alcalina	36
4.3	Fitase	37
4.4	β -Glucosidase	38
4.5	Abundância do gene 16S RNAr	40
4.6	Abundância do gene phoD.....	41
4.7	Abundância do gene ITS.....	43
4.8	Estrutura da comunidade bacteriana	44
4.9	Estrutura da comunidade fúngica	48
5	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS	53
	ANEXOS.....	62
	APÊNDICES	63

RESUMO

Aumento da produtividade e mudanças na microbiota do solo em cultivo de cana-de-açúcar com aplicação de composto orgânico e inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato

O fósforo (P) é limitante tanto na produtividade da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) quanto na atividade da microbiota do solo. Em solos de regiões tropicais, devido à elevada saturação por óxidos de ferro e alumínio, o P se encontra normalmente indisponível às plantas. Portanto, o manejo da adubação de P, baseado no uso de microrganismos capazes de promover uma melhor ciclagem do P, se faz necessário. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar as mudanças na microbiota do solo e na produtividade da cana-de-açúcar, em condições de campo, em resposta ao manejo orgânico associado à inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato (BSF). Para tanto, foi utilizado um composto, obtido previamente por meio da compostagem de subprodutos da indústria sucroenergética (torta de filtro e cinzas), enriquecido com fosfatos de rocha (fosfato de Araxá-FA ou fosfato de Bayóvar-FB). No campo foram estabelecidos sete tratamentos, sendo um destes o tratamento controle, adubado com superfosfato triplo. Seis tratamentos compreendiam áreas adubadas com composto, sendo duas com composto que continha FA, duas com FB e duas somente com composto sem enriquecimento com P (C). A metade dessas áreas recebeu também inoculação com BSF, contendo os tratamentos FA+I, FB+I e C+I. A inoculação foi feita com *Bacillus simplex* BACBR04, *Bacillus* sp. BACBR06 e *Rhizobium* sp. RIZBR0. As avaliações foram realizadas durante o primeiro ano de cultivo (cana planta) em dois períodos (aos seis e 12 meses). As mudanças na microbiota foram acessadas por meio da atividade das enzimas fosfatases (ácida e alcalina), fitases e β -glucosidase. Mudanças na estrutura da comunidade bacteriana e fúngica foram acessadas por meio do T-RFLP. A abundância dos genes 16S RNAr, *phoD* (relacionado à solubilização de P) e ITS foram avaliadas por meio de PCR quantitativo. A atividade das fosfatases e β -glucosidase aumentaram com a inoculação na cana adubada com composto enriquecido com fosfato de Araxá (FA+I) e também no solo adubado com composto sem enriquecimento (C+I). Nos tratamentos FA+I e C+I houve incremento do fósforo disponível e aumento de 10% na produtividade, em relação ao tratamento controle (M). As comunidades bacteriana e fúngica do tratamento C+I se estruturaram de forma distinta em relação ao tratamento controle (M). Nos solos inoculados houve menor abundância do gene ITS aos seis meses, enquanto que, para o gene 16S RNAr, os solos inoculados apresentaram menor abundância no período de 12 meses. Verificou-se que o consórcio bacteriano inoculado, associado com a aplicação de composto, superou, no primeiro ano de cultivo, o manejo rotineiramente utilizado em cana-de-açúcar (adubação com superfosfato triplo). É possível que haja efeito residual no decorrer dos ciclos da cana-de-açúcar, o que ainda reforçaria a importância do manejo orgânico associado à inoculação com BSF.

Palavras-chave: Consórcio microbiano; qPCR; Atividade enzimática; Rocha fosfática

ABSTRACT

Increase in productivity and changes in the soil microbiota in sugarcane when applying organic compost and phosphate solubilizing bacteria

Phosphorus (P) is limiting both the yield of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) and the activity of the soil microbiota. In tropical soils, due to the high saturation of iron and aluminum oxides, P is normally unavailable to plants. Therefore, the management of P fertilization, based on the use of microorganisms that promote better P cycling is necessary. Thus, the objective of this study was to evaluate changes in the soil microbiota and in sugarcane yield under field conditions, in response to the organic management associated with the inoculation of phosphate solubilizing bacteria (PSB). In our field experiment, our fertilizer was an organic compost, previously obtained by the composting process of by-products of the sugarcane industry (filter cake and ashes), enriched with rock phosphates (Araxá phosphate-AP or Bayóvar phosphate-BP). Seven treatments were established in the field, one of which was the control treatment, fertilized with triple superphosphate. Six treatments comprised compost fertilized areas, two with compost containing AP, two with BP, and two only with compost, and without any enrichment with P (C). Half of these areas were also inoculated with PSB, containing the treatments AP+I, BP+I and C+I. Field inoculation was done with *Bacillus simplex* BACBR04, *Bacillus* sp. BACBR06 and *Rhizobium* sp. RIZBR0. We performed evaluations during the first year of cultivation at two periods (at six and twelve months after planting). We accessed the changes in the microbiota through the activity of acid and alkaline phosphatases, phytases and β -glucosidase. Changes in bacterial and fungal community structure were accessed through T-RFLP. We evaluated the abundance of the 16S RNAr, *phoD* (related to P solubilization) and ITS genes by quantitative PCR. The phosphatases and β -glucosidase activity increased with the inoculation in sugarcane fertilized with compost and enriched with Araxá phosphate (AP+I) and in the soil fertilized with compost, but without any enrichment (C+I). In these treatments (AP+I and C+I), we found an increase in available phosphorus and a 10% increase in productivity, in relation to the control treatment (M). The bacterial and fungal communities of the treatments C+I presented a different structure in relation to the control treatment (M). In the soils that received bacterial inoculations, there was a lower abundance of the ITS gene at six months, whereas for the 16S RNAr gene the inoculated soils presented lower abundance at 12 months. We verified that the inoculated bacterial consortium, associated with the application of compost, overcame the conventional management in sugarcane (triple superphosphate fertilizer) in the first year of cultivation. In addition, it is possible residual effect during the sugarcane cycles, which would further reinforce the importance of organic management associated with BSF inoculation.

Keywords: Microbial consortium; qPCR; Enzyme activity; Rock phosphate

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) e esta é a matéria-prima do setor sucroenergético para geração de produtos (açúcar e etanol) e subprodutos (torta de filtro, cinzas e vinhaça) (OECD/FAO, 2015). Para atender às demandas nacionais e internacionais, especialmente por etanol, houve expansão dos cultivos de cana-de-açúcar no Brasil, mas que trouxeram preocupações quanto aos impactos ambientais causados (CHERUBIN et al., 2015). Um destes impactos está relacionado ao aporte intensivo de fertilizantes fosfatados ao solo, uma vez que a deficiência de fósforo (P) limita a produtividade da cana-de-açúcar (SILVA et al., 2018). Os solos do Brasil são altamente intemperizados (apresentam elevada saturação por óxidos de Fe e Al) e o P aplicado é rapidamente adsorvido pelos colóides do solo, tornando-os indisponíveis às plantas (FINK et al., 2016). Logo, evidencia-se um gasto econômico e ambiental, pois o custo de obtenção de fertilizantes fosfatados é elevado e as fontes fosfáticas (apatitas) podem ser exauridas (ROY et al., 2016).

Diante deste cenário, torna-se necessária a transição do manejo convencional para manejos mais sustentáveis, especialmente aqueles que promovam melhor reaproveitamento do P presente no solo (WITHERS et al., 2018). Um manejo alternativo que se mostra promissor é a adubação fosfatada por meio da aplicação de pó de rocha associada com torta de filtro (TELES et al., 2017). Outra prática promissora é a obtenção de composto por meio do processo de compostagem de subprodutos sólidos (torta de filtro e cinzas) das Usinas, enriquecidos com rocha fosfática (ESTRADA-BONILLA et al., 2017). A efetividade destas práticas de manejo pode ser monitorada por indicadores sensíveis, tais como a atividade enzimática no solo e as mudanças na estrutura da comunidade microbiana (ANDREOTE; PEREIRA e SILVA, 2017).

O uso de microrganismos capazes de disponibilizar o P é peça-chave no uso sustentável do P na agricultura (ZHU; LI; WHELAN, 2018). A disponibilidade de P no solo está diretamente relacionada com os processos de mineralização e solubilização, sendo a mineralização atribuída à atividade enzimática (geralmente

fosfatases) e à solubilização de fosfatos por ácidos orgânicos, excretados por outros microrganismos (NANNIPIERI et al., 2011). Estes microrganismos compartilham estruturas ribossomais em comum (marcadores filogenéticos). Para os procarióticos, a estrutura mais estudada é o gene 16S RNAr (SCHUTTE et al., 2009) e, para os eucarióticos, é o espaço entre os genes 18S e 28S, chamado de espaço intergênico (ITS) (GARDES; BRUNS, 1993). Além disso, a identificação de genes como o *phoD* e *BPP*, que codificam para a síntese de fosfatases e fitases, respectivamente, podem ser essenciais na compreensão das mudanças na microbiota do solos sob diferentes sistemas de manejo (COTTA et al., 2016; FRASER et al., 2017). As técnicas independentes de cultivo possibilitam um melhor entendimento das possíveis relações ecológicas que ocorrem e que são responsáveis pelo funcionamento de todo o sistema (ANDREOTE; GUMIERE; DURRER, 2014). Dentre essas técnicas tem-se o T-RFLP, que é baseado no polimorfismo do fragmento final de restrição e capaz de detectar diferenças na estruturação da comunidade microbiana (MARSH, 1999).

Diante disso, foi realizado um experimento prévio em casa de vegetação (duração de 60 dias) com aplicação de composto e inoculação de bactérias solubilizadoras de P. As plantas de cana-de-açúcar cultivadas sob esse manejo apresentaram aumento no teor foliar de P, N e K (ESTRADA-BONILLA, 2015). Esse bom resultado encorajou-nos a montar um experimento em condições de campo com o objetivo de comprovar os resultados obtidos em casa de vegetação.

Hipóteses

i) O manejo da adubação baseada na aplicação de composto e de fontes alternativas de P, associado à inoculação em campo com bactéria solubilizadoras de P (BSF) altera a atividade enzimática no solo (fosfatases, fitases e β -glucosidase) e a disponibilidade de P, o que resulta em maior produtividade de cana-de-açúcar.

ii) A abundância de genes (16S RNAr, *phoD* e ITS), bem como a estrutura da comunidade bacteriana e fúngica, são alteradas com o manejo da adubação baseada na aplicação do composto associado à inoculação com BSF.

Objetivo geral da pesquisa

Avaliar mudanças na microbiota do solo após aplicação de composto enriquecido com fontes alternativas de P associadas à inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato.

Objetivos específicos

1. Avaliar a atividade das enzimas fosfatase ácida, fosfatase alcalina, fitase e β -glucosidase aos seis e 12 meses do cultivo da cana-de-açúcar e consequente mudança na disponibilidade de P e na produtividade.
2. Avaliar a abundância dos genes 16S RNAr, ITS e *phoD* aos seis e 12 meses no solo sob o cultivo da cana-de-açúcar.
3. Avaliar mudanças na estrutura da comunidade bacteriana e fúngica do solo após aplicação de composto e bactérias solubilizadoras de P.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cana-de-açúcar

2.1.1 Origem e importância econômica

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é uma planta poliploide (vários genomas no mesmo núcleo), de metabolismo C4 (elevada taxa fotossintética), do gênero *Saccharum* e pertencente à família Poaceae. Este gênero é composto por mais de 30 espécies com dois centros de origem distintos: o Velho Mundo (Ásia e África) e o Novo Mundo (América do Norte, Central e do Sul) (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). A espécie *S. officinarum* é originária do Velho Mundo (Polinésia) e foi levada para o Sudeste Asiático onde posteriormente foi disseminada para várias regiões do mundo (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

No Brasil, a cana-de-açúcar está presente desde o período colonial e as plantas se adaptaram muito bem às condições edafoclimáticas do país. A expansão do cultivo foi a partir da primeira crise do petróleo na década de 40, quando houve aumento exorbitante no preço do petróleo (VIAN; RODRIGUES; DA SILVA, 2018). Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de etanol como combustível de automóveis, seguido pela Índia, China, Tailândia e Paquistão (OECD/FAO, 2015). A estimativa de produção brasileira de cana-de-açúcar para a safra 2018/2019 é de 635,6 milhões de toneladas, havendo um decréscimo de 3,3% em relação à safra 2017/2018 que foi de 657,20 milhões de toneladas (CONAB/BRASIL, 2017). O estado de São Paulo é o maior produtor nacional (55% da produção) seguido pelo estado de Goiás (11%) e Minas Gerais (10%) (CONAB/BRASIL, 2017).

A indústria sucroenergética trouxe consigo incrementos na economia do país, sobretudo para a região centro-sul do Brasil, onde prevalece a maior produção nacional (MORAES et al., 2016). No que se refere aos consumidores externos dos produtos do setor sucroenergético brasileiro, sobressaem-se os Estados Unidos, Coreia do Sul, China, Argélia, Índia e Bangladesh (CONAB/BRASIL, 2017). Foi publicado recentemente uma compilação elaborada por Chandel e Silveira (2018) no qual são colocadas as principais informações a respeito do processamento da biomassa para obtenção de açúcar e etanol, bem como da utilização dos

subprodutos para incremento na economia da biorefinaria canavieira. O uso dos subprodutos é tido como uma das alternativas inovadoras com perspectivas de incremento, tanto no que se refere às melhorias econômicas (SALLES-FILHO et al., 2017), quanto nas melhorias ambientais, capazes de sustentar a saúde do solo (CARDOSO et al., 2013).

2.1.2 Produtos e subprodutos

A cana-de-açúcar é matéria-prima na geração de açúcar e etanol. O açúcar é obtido após a evaporação da água do caldo de moagem e posterior cristalização da sacarose (DOTANIYA et al., 2016) enquanto que o etanol pode ser obtido pelo processo de fermentação (HAHN-HÄGERDAL et al., 1991) ou pela hidratação do etileno (HIDZIR; SOM; ABDULLAH, 2014). A fermentação alcoólica é o mais utilizado industrialmente e consiste em um processo anaeróbio conduzido por bactérias ou leveduras no qual o acceptor final de elétrons é uma substância orgânica (alcetaldeído) que, ao receber elétrons do NADH_2 , é transformado em álcool (produto mais reduzido, ou seja, mais energético) (BINI; LOPEZ; CARDOSO, 2016). O etanol obtido a partir da fermentação do caldo composto por açúcares simples (glicose, frutose e sacarose) é chamado de etanol de primeira geração (1G), enquanto que o etanol obtido por meio da fermentação dos resíduos lignocelulósicos (mais complexos) é chamado de etanol de segunda geração (2G) (NAKANISHI et al., 2017). Neste caso, antes da fermentação, necessita-se de uma etapa de hidrólise da celulose com enzimas celulolíticas para a transformação em glicose. Algumas usinas também vêm investindo na geração de energia elétrica, a partir da queima da palha residual após a colheita da cana-de-açúcar, para diminuir seus custos com energia (SALLES-FILHO et al., 2017).

Durante o processo de obtenção do açúcar e etanol são gerados subprodutos (torta de filtro, cinza de caldeira, fuligem e vinhaça). Em média, para cada 100 toneladas de cana-de-açúcar moídas são geradas três toneladas de torta de filtro (GUPTA; TRIPATHI; BALOMAJUMDER, 2011). A composição química da torta de filtro é variável, mas no geral apresenta elevados teores de N, K e P (e é especialmente rica em P), enquanto o K se concentra principalmente na vinhaça.

Essas características tornam os resíduos em fonte potencial para melhorar a qualidade do solo (DOTANIYA et al., 2016). Os benefícios de aplicação de torta de filtro se intensificam quando esta é submetida ao processo de compostagem, associada aos microrganismos capazes de promover a disponibilização do P, essencial para manutenção do metabolismo microbiano (ESTRADA-BONILLA et al., 2017). Outros subprodutos de ampla aptidão também são gerados, tais como: bagaço, cinzas de caldeira, fuligem e vinhaça. Esta última é bastante utilizada para a fertirrigação dos campos de plantio (DOTANIYA et al., 2016).

2.2 Fósforo no solo

O fósforo (P) é o segundo macronutriente mais limitante no cultivo de cana-de-açúcar, ficando atrás apenas do nitrogênio (SILVA et al., 2018). O P é importante, pois participa na constituição de moléculas de DNA, na síntese de ATP, na respiração e em todo o funcionamento do metabolismo microbiano e vegetal (BINI; LOPEZ, 2016). No solo o P é translocado por difusão e se encontra em diversos compartimentos na forma inorgânica (Pi) e orgânica (Po) (Figura 1). As plantas e os microrganismos absorvem, predominantemente, o fósforo que está na solução do solo na forma inorgânica (HPO_4^{2-} ou H_2PO_4^-) (NOVAIS; SMYTH; NUNES, 2007). A solução do solo pode ser reabastecida por meio da mineralização de compostos orgânicos (processo catalisado por enzimas) ou pela solubilização de compostos inorgânicos (processo de reação da apatita com ácidos orgânicos). Em ambos os processos a presença da microbiota é imprescindível (Figura 1) (NANNIPIERI et al., 2011).

Em solos intemperizados, onde prevalece o predomínio de óxidos de ferro (Fe^{3+}) e alumínio (Al^{3+}), a maior parte do P se encontra fixado, ou seja, não disponível às plantas (FINK et al., 2016). Isso faz com que grande parte do P aplicado no solo seja imediatamente adsorvido pelos colóides do solo e apenas uma pequena parte seja aproveitado pela comunidade microbiana e vegetal. Diante disso, observa-se aumento no estoque de P (indisponível) no solo, à custa de um aumento na aplicação de fertilizantes fosfatados sintéticos que são de alto custo econômico e ambiental (ROY et al., 2016). O P fortemente retido na matriz do solo

(P não lábil) compõe a fração chamada de legado do P (do inglês *legacy phosphorus*) e o uso de microrganismos para a seu reaproveitamento é uma alternativa para o uso sustentável de P na agricultura (OWEN et al., 2015). O reaproveitamento do *legacy phosphorus* vem sendo amplamente discutido no mundo e ênfase no seu estudo tem sido dada pelo Brasil, por ser o país responsável por grande parte da produção agrícola no mundo, com destaque para o cultivo de cana-de-açúcar (WITHERS et al., 2018).

Figura 1. Compartimentos do fósforo no sistema solo-planta e suas interdependências. Fonte: Adaptado de Novais; Smyth; Nunes (2007).

2.3 O papel da microbiota na disponibilidade de P

Os microrganismos são peças-chave para disponibilizar o P no solo por meio de mecanismo direto (solubilização) (SHARMA et al., 2013) e/ou indireto (mineralização) (NANNIPIERI et al., 2011).

As bactérias e os fungos são capazes de solubilizar o P por meio de vários mecanismos, um deles é a excreção de ácidos orgânicos (ácido glucônico, málico, oxálico, por exemplo) que complexam o Al^{3+} (íon acompanhante) do fosfato de alumínio (AlPO_4), disponibilizando o fosfato (PO_4^{-3}) no solo. Outro mecanismo de solubilização é a produção de sideróforos, agentes complexantes, que possuem alta afinidade por metais trivalentes (Al^{3+} e Fe^{3+}) (SHARMA et al., 2013). Em algumas estirpes de *Burkholderia* sp. e *Bacillus* sp., a síntese de exopolissacarídeos (EPS) tem sido reportada como o mecanismo mais efetivo em solubilizar o P presente no fosfato tricálcico (OLIVEIRA et al., 2009).

A mineralização do P é catalisada predominantemente por meio de enzimas microbianas chamadas de fosfatases, no entanto as plantas também são capazes de secretar algumas fosfatases (NANNIPIERI et al., 2011). As fosfatases são um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres e anidridos de H_3PO_4 . As fosfatases são classificadas em fosfomonoesterase (*Enzyme Commission*- EC 3.1.3), fosfodiesterase (EC 3.1.4) e fosfotriesterase (EC 3.1.5) (ACOSTA-MARTÍNEZ; TABATABAI, 2011). A classe da fosfomonoesterase é subdividida de acordo com o pH ótimo das enzimas que a compõe, sendo estas denominadas de fosfatase ácida (aquelas com pH ótimo de 6,5) ou fosfatase alcalina (aquelas com pH ótimo de 11). A fosfatase ácida é sintetizada por plantas e microrganismos e a fosfatase alcalina é, predominantemente, de origem microbiana (NANNIPIERI et al., 2011).

Estudos baseados em técnicas independentes de cultivo tem revelado o funcionamento a nível celular que regula a síntese de enzimas envolvidas na mineralização de P (SANTOS-BENEIT, 2015). Estas enzimas são geralmente excretadas em resposta à deficiência de P e os genes responsáveis pela sua codificação fazem parte do chamado *Pho Regulon* (SANTOS-BENEIT, 2015). Para a fosfatase ácida o gene *phoC* tem sido relatado como importante na codificação desta enzima (FRASER et al., 2017). Para a fosfatase alcalina tem sido relatado o gene *phoD* (SAKURAI et al., 2008). Para fitase tem sido relatado o gene *BPP* (β -hélice-fitase) (COTTA et al., 2016), sendo os genes *HAP* (fitase ácida de histidina),

CP (fitase de cisteína) e também o gene PAP (fitase ácida roxa) responsáveis pela mineralização do fitato (MULLANEY; ULLAH, 2007).

2.4 Mudanças na microbiota do solo em resposta ao manejo

A microbiota do solo é definida como sendo o conjunto de microrganismos que habitam o solo e é responsável pelos serviços ecossistêmicos (decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, biorremediação, etc) (ANDREOTE; CARDOSO, 2016). Por ser sensível às práticas de manejo, a microbiota é utilizada como um bom indicador de qualidade do solo (MENDES et al., 2015). Mudanças na diversidade microbiana são acessadas tanto por meio de metodologias dependentes de cultivo (isolamento em meio de cultura, perfil fisiológico e atividade enzimática) quanto por metodologias independentes de cultivo (T-RFLP, DGGE, sequenciamento, etc) (LAMBAIS et al., 2005).

Em solos do estado de São Paulo, tanto a prática de elevação da saturação por bases (calagem) quanto a quantidade de palha deixada pela colheita da cana alteram a estrutura da comunidade microbiana devido ao aumento da diversidade bacteriana (VAL-MORAES et al., 2016). Em cultivo de cana-de-açúcar é relatado que os grupos *Acidobacteria*, *Actinobacteria* e *Verrucomicrobia* são os indicadores mais sensíveis ao efeito da adubação orgânica, baseando-se na aplicação de vinhaça (NAVARRETE et al., 2015). A adição de material orgânico ao solo altera a atividade das enzimas que compõem a celulase (endoglucanase, exoglucanase e β -glucosidase). As β -glucosidases são as mais estudadas em ecologia microbiana e são as responsáveis pela hidrólise da celobiose (dímero de glicose) dando origem a dois monômeros de glicose (AHMED et al., 2017).

Sistemas de manejo baseados na inoculação de microrganismos podem estimular ou suprimir a comunidade microbiana indígena do solo a partir de diversas relações ecológicas (BRAHMAPRAKASH et al., 2017). Uma das interações microbianas de grande importância é entre as bactérias solubilizadoras de fosfato e os fungos micorrízicos arbusculares (ZHANG et al., 2014). Diante disso, o uso de consórcios microbianos tem se mostrado promissores. Um exemplo de consórcio microbiano eficiente, embora não envolvido com o P, é o uso de *Burkholderia*

vietnaminensis e *Herbaspirillum seropedicae* em arroz, que possibilitou o aumento médio de 40% na produtividade do arroz e na eficiência do uso do fertilizante nitrogenado empregado (ESTRADA et al., 2013).

Entretanto, desconhecemos outros estudos no campo que associem práticas de manejo baseados na aplicação de composto orgânico enriquecido com rochas fosfáticas e inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato, além da proposta de Estrada-Bonilla (2015) (trabalho sob orientação da Profa. Dra. Elke Cardoso, da ESALQ/USP), que apresenta resultados promissores a partir do uso de composto orgânico como adubo e da inoculação de um consórcio bacteriano em plantas de cana-de-açúcar. Este composto foi obtido a partir do processo de compostagem de torta de filtro e cinzas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área experimental

O experimento foi conduzido no município de Novo Horizonte no estado de São Paulo, Brasil (21°29'42"S - 49°11'23"W), com altitude de 462 metros. O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Aw, com período de maior precipitação ocorrendo entre os meses de novembro a abril (verão e outono no hemisfério sul) e menor precipitação entre maio e outubro (inverno e primavera no hemisfério sul). A temperatura e precipitação média anual são de 20,3°C e 1660mm, respectivamente. O solo foi classificado como Argissolo Vermelho amarelo de textura franco arenosa e caracterizado quimicamente (RAIJ et al., 2001) até um metro de profundidade (LOPES, 2017) (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização físico-química do solo da área experimental localizada no município Novo Horizonte – SP.

Profundidade	Areia	Silte	Argila	pH	P	S	K	Ca	Mg	H+Al	CTC	V
cm	-----g kg ⁻¹ -----				--mg kg ⁻¹ --			-----mmol _c kg ⁻¹ -----				%
0-20	797	28	175	6,2	19,1	84,9	5,5	17,6	8,2	16,0	47,3	66,0
20-40	758	16	226	6,1	14,6	23,7	5,1	19,8	9,8	15,0	45,7	76,0
40-60	-	-	-	5,6	7,6	39,1	1,5	12,1	5,1	18,0	56,7	33,0
60-80	-	-	-	5,3	5,7	10,7	0,5	10,1	2,7	18,0	31,3	42,0
80-100	-	-	-	5,3	5,7	10,2	0,6	8,9	1,6	16,0	27,1	41,0

pH: potencial hidrogeniônico; P: fósforo; S: enxofre; K: potássio; Ca: cálcio; Mg: magnésio; H+Al: acidez potencial; CTC: capacidade de troca catiônica; V: saturação por bases. Fonte: Adaptado de Lopes (2017).

O delineamento experimental foi de blocos aleatorizados com quatro repetições. Cada bloco continha sete parcelas (tratamentos) contendo sete linhas de cana-de-açúcar de 20m de comprimento e espaçadas a 1,5m. O plantio da cana-de-açúcar (variedade CTC 24, tardia, com produtividade média de 140Mg ha⁻¹ para o primeiro corte) e a aplicação do composto orgânico ocorreram em setembro de 2014. Este composto foi obtido previamente pelo processo de compostagem de resíduos (torta de filtro e cinzas) da indústria sucroenergética, inoculados com *Pseudomonas* e *Bacillus*, havendo ou não a adição de fontes alternativas de fósforo

(fosfato de Araxá ou fosfato de Bayóvar) (ESTRADA-BONILLA et al., 2017). Em média, este composto apresentava relação C:N = 13, relação C:P = 9 e 40% de umidade (400g kg^{-1}), no momento de aplicação no campo (APÊNDICE A).

3.2 Tratamentos

No campo, totalizaram-se sete tratamentos, sendo seis tratamentos com composto, dos quais dois deles com fosfato de Araxá, dois com fosfato de Bayóvar e dois sem fonte alternativa de fósforo (somente o composto). Nos três casos essas combinações podiam ser com ou sem inoculação a campo com *Bacillus simplex* BACBR04, *Bacillus* sp. BACBR06 e *Rhizobium* sp. RIZBR0 (1L ha^{-1} de cada estirpe). Adicionalmente, houve um controle positivo que recebeu somente fertilizantes sintéticos rotineiramente usados em cana-de-açúcar (superfosfato triplo: 440g kg^{-1} de P_2O_5 total e 41g kg^{-1} de P_2O_5 solúvel em ácido cítrico 2%). As fontes alternativas de P foram usadas por apresentarem diferentes solubilidades (fosfato de Araxá: 240g kg^{-1} de P_2O_5 total e 40g kg^{-1} de P_2O_5 solúvel em ácido cítrico 2%; fosfato de Bayóvar: 230g kg^{-1} de P_2O_5 total e 100g kg^{-1} de P_2O_5 solúvel em ácido cítrico 2%). Os microrganismos, isolados de rizosfera de cana-de-açúcar, foram utilizados para a inoculação a campo pois, em experimento prévio em casa de vegetação, com cana-de-açúcar (ESTRADA-BONILLA, 2015), houve maiores teores de nutrientes foliares nas plantas (P, N e K) quando adubadas com composto e com estes microrganismos (ESTRADA-BONILLA et al., 2017). A inoculação a campo foi realizada nas linhas do cultivo aos 18 dias após o plantio. Os tratamentos foram montados de forma a atender uma necessidade de 150kg ha^{-1} de P_2O_5 , 140kg ha^{-1} de N e 140kg ha^{-1} de K_2O .

O tratamento C (somente o composto) e o tratamento C+I (somente o composto e inoculação a campo) receberam 20Mg ha^{-1} de composto para atender a demanda de P. O tratamento FA (composto com adição de fosfato de Araxá) e o tratamento FA+I (composto com adição de fosfato de Araxá e inoculação a campo) receberam $9,75\text{Mg ha}^{-1}$ do composto preparado com o fosfato de Araxá. O tratamento FB (composto com adição de fosfato de Bayóvar) e o tratamento FB+I (composto com adição de fosfato de Bayóvar e inoculação a campo) receberam

9,75Mg ha⁻¹ do composto preparado com fosfato de Bayóvar. O tratamento M (mineral) não recebeu nenhuma adição de composto e de inoculação.

3.3 Amostragem de solo e de planta

O experimento foi avaliado durante o primeiro ciclo da cana-de-açúcar (cana planta) em dois períodos: aos seis meses e 12 meses de cultivo (Figura 2). Aos seis meses houve amostragem de solo e tecido foliar e aos 12 meses houve coleta de solo e colmos de cana-de-açúcar. Foram coletadas cinco subamostras de solo (0-20cm), próximas à linha de plantio da cana-de-açúcar, para compor uma amostra composta, totalizando 28 amostras compostas por coleta. Aos seis meses, foram coletadas, de 10 plantas, as amostras de folhas com a primeira lígula aberta, separando o terço médio e excluindo a nervura central. Aos 12 meses, foram colhidos 50m lineares de cana-de-açúcar por unidade experimental (cinco linhas centrais) para determinação da produtividade e açúcar total (CONSECANA, 2006).

Figura 2. Épocas de plantio e amostragem de acordo com os dados de precipitação e temperatura do município de Novo Horizonte e os estágios fenológicos da cana-de-açúcar. Fonte: Adaptado de Casagrande (1991). Dados obtidos para o ano de condução do experimento (CLIMATEMPO, 2017).

3.4 Atividade enzimática do solo

3.4.1 Fosfatase ácida e alcalina

1g de solo foi adicionado a 4mL de tampão universal modificado MUB pH =6,5, para determinação da fosfatase ácida ou MUB pH = 11, para determinação da fosfatase alcalina, mais 1mL do substrato PNF 0,05M (p-nitrofenil-fosfato), submetidos a breve agitação e posterior incubação a 37°C por uma hora. Nas amostras controle (brancos) o PNF 0,05M foi adicionado após o período de incubação. Transcorrido o período de 1h, adicionou-se 1mL de CaCl₂ 0,5M e 4mL de NaOH 0,5M, submeteu-se a breve agitação e posterior filtragem em papel filtro faixa azul (Ø 12,50 ± 0,10cm), e leitura em espectrofotômetro a 410nm (TABATABAI, 1994).

3.4.2 Fitase

1g de solo foi adicionado a 5mL de tampão de acetato de sódio 0,2M e submetido a breve agitação e posterior incubação a 37°C por uma hora. Nas amostras controle (brancos) o tampão acetado de sódio 0,2M continha 0,001M de fitato de cálcio. Transcorrido o período de 1h, adicionou-se 0,5mL de ácido tricloroacético 0,1M, submeteu-se a breve agitação, posterior repouso por 20min e filtragem em papel filtro faixa azul (Ø 12,50 ± 0,10cm). Uma alíquota de 0,3mL do filtrado foi adicionada a 1,2mL de solução contendo 0,02M de molibdato de amônio, 0,01M de metavanadato de amônio e 0,18M de ácido nítrico, posteriormente feita leitura em espectrofotômetro a 420nm (AMES, 1966).

3.4.3 β-Glucosidase

1g de solo foi adicionado a 4mL de tampão universal modificado MUB pH = 6, mais 1mL do substrato PNG 0,025M (p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo), submetidos a breve agitação e posterior incubação a 37°C por uma hora. Nas amostras controle (brancos) o PNG 0,025M foi adicionado após o período de incubação. Transcorrido o período de 1h, adicionou-se 1mL de CaCl₂ 0,5M e 4mL de THAM 0,1M (Tris-Hidroximetil-Amino-Metano) (pH=12), submeteu-se a breve agitação, posterior

filtragem em papel filtro faixa azul ($\varnothing$ 12,50 $\pm$ 0,10cm) e leitura em espectrofotômetro a 410nm (TABATABAI, 1994).

3.5 Metodologias moleculares

3.5.1 Extração do DNA total

O DNA total do solo foi extraído a partir de 0,4g de solo com o kit comercial *PowerSoil DNA Isolation* (MoBio, Carlsbad, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O DNA extraído foi verificado por meio de eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TAE 1x (400mM Tris + 20mM ácido acético + 1mM EDTA) utilizando 5 μ L de cada amostra de DNA corado com GelRed™ (0,5 μ g mL⁻¹), visualizado e fotodocumentado em transiluminador sob luz ultravioleta (DNR – Bio Imaging Systems/MiniBis Pro).

3.5.2 Abundância do gene 16S RNAr

A abundância de bactérias foi estimada por qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*) da região V3 do gene 16S RNAr. A quantificação do gene alvo foi realizada utilizando o aparelho StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies), com o corante SYBR® GreenER™. Foram utilizados os iniciadores Eub338 (5' - CCT ACG GGA GGC AGC AG - 3') (MUYZER, 1993) e Eub518 (5' - ATT ACC GCG GCT GCT GG - 3') (MUYZER, 1993), gerando um fragmento de 193 pares de bases (pb).

As condições dos ciclos de reações foram as seguintes: 95°C por 10min, 40 ciclos de 95°C por 27s, 62°C por 60s e 72°C por 30s. A curva de Melt (desnaturação) foi realizada no final de cada quantificação com o incremento gradual de temperatura, de 72°C para 96°C, para verificar a especificidade da amplificação. O volume final das reações foi de 20 μ L, contendo 10 μ L do SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies), 0,5 μ L de cada primer diluído 1:9 (0,2 μ M), 1 μ L (aproximadamente 50ng) de DNA molde e 8 μ L de água ultrapura autoclavada para completar o volume da reação. A estimativa do número de cópias do gene 16S RNAr por grama de solo foi calculada interpolando o valor de ciclos obtidos por amostra (CT = *threshold cycles*) na regressão linear gerada da curva padrão com

oito ordens de grandeza (10^1 a 10^8) de cópias do gene 16S RNAr. A eficiência (E) do qPCR foi de 93% e calculada com a fórmula $E = [10(-1/\text{slope}) - 1]$.

3.5.3 Abundância do gene *phoD*

A abundância do gene *phoD* foi estimada por qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*) utilizando o aparelho StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies), com o corante SYBR® GreenER™. Foram utilizados os iniciadores ALPS-F730 (5' - CAG TGG GAC GAC CAC GAG GT - 3') (SAKURAI et al., 2008) e ALPS-R1101 (5' - GAG GCC GAT CGG CAT GTC G - 3') (SAKURAI et al., 2008), gerando um fragmento de 370 pares de bases (pb).

As condições dos ciclos de reações foram as seguintes: 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 30s, 57°C por 60s e 72°C por 30s. A curva de Melt (desnaturação) foi realizada no final de cada quantificação com as seguintes condições: 95°C por 15s, 60°C por 60s e 95°C por 15s, para verificar a especificidade da amplificação. O volume final das reações foi de 25µL, contendo 12,5µL do SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies), 0,2µL de cada primer, 2µL (aproximadamente 50ng) de DNA molde, 0,5µL (10mg mL^{-1}) de albumina de soro bovino (BSA) e 9,6µL de água ultrapura autoclavada para completar o volume da reação. A estimativa do número de cópias do gene *phoD* por grama de solo foi calculada interpolando o valor de ciclos obtidos por amostra ($CT = \text{threshold cycles}$) na regressão linear gerada da curva padrão com cinco ordens de grandeza (10^4 a 10^8) de cópias do gene *phoD*. A eficiência (E) do qPCR foi de 88% e calculada com a fórmula $E = [10(-1/\text{slope}) - 1]$.

3.5.4 Abundância do gene ITS

A abundância de fungos foi estimada por qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*) da região intergênica (*Internal transcribed spacer* - ITS). A quantificação foi realizada utilizando o aparelho StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies), com o corante SYBR® GreenER™. Foram utilizados os iniciadores ITS1f (5' - CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A - 3') (GARDES; BRUNS, 1993) e 5.8s (5' - CGC TGC GTT CTT CAT CG - 3') (GARDES; BRUNS, 1993), gerando um fragmento de 300 pares de bases (pb).

As condições dos ciclos de reações foram as seguintes: 94°C por 15min, 40 ciclos de 94°C por 60s, 53°C por 30s e 72°C por 1min. A curva de Melt (desnaturação) foi realizada no final de cada quantificação com o incremento gradual de temperatura, de 72°C para 96°C, para verificar a especificidade da amplificação. O volume final das reações foi de 25µL, contendo 12,5µL do SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies), 0,2µL de cada primer (0,2µM), 1µL (aproximadamente 50ng) de DNA molde e 11,1µL de água ultrapura autoclavada para completar o volume da reação. A estimativa do número de cópias de ITS por grama de solo foi calculada interpolando o valor de ciclos obtidos por amostra ($CT = threshold\ cycles$) na regressão linear gerada da curva padrão com seis ordens de grandeza (10^1 a 10^6). A eficiência (E) do qPCR foi de 102% e calculada com a fórmula $E = [10(-1/slope) - 1]$.

3.5.5 Estrutura da comunidade bacteriana

A estrutura da comunidade bacteriana foi acessada por meio do T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polimorphism*) da região V6 do gene 16S RNAr. A amplificação do gene alvo foi realizada usando os iniciadores 8-FM (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG - 3') marcado com 6-carboxyfluorescein (6-FAM) (SCHUTTE et al., 2009) e 926r (5'-CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT - 3') (SCHUTTE et al., 2009).

As condições dos ciclos de reações foram os seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 4min, 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s, anelamento a 57°C por 30s, extensão a 72°C por 45s e uma extensão final de 72°C por 10min. O volume final das reações foi de 50µL, contendo 6µL de $MgCl_2$ (concentração final de Mg^{2+} de 3mM), 0,2µL (equivalente a 1U) de Taq polimerase, 5µL do tampão livre de Mg^{2+} (Sinapse Inc, São Paulo, Brasil), 4µL de desoxinucleosídeo trifosfato (dNTP) (0,2mM de cada base (Adenina, Timina, Citosina e Guanina)) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), 0,1µL de cada primer (0,01mM) e 1µL de DNA molde, completando com 33,6µL de água ultrapura autoclavada.

Os produtos de PCR foram purificados com álcool isopropílico, clivados com a enzima Anza™ 59 *HhaI* I (5U) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) e

precipitados com EDTA 125mM e acetato de sódio 3M. As amostras foram ressuspensas usando formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems, Life Technologies) com marcador GeneScan™ 1200 LIZ® (Applied Biosystems, Life Technologies) e analisadas em um sequenciador automático ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, Life Technologies). Os resultados foram processados usando o programa GeneMapper® 4.1 (Applied Biosystems, Life Technologies), com uma linha de corte de 50 unidades de fluorescência, para remover o “background” das amostras.

3.5.6 Estrutura da comunidade fúngica

A estrutura da comunidade fúngica foi acessada por meio do T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polimorphism*) da região intergênica (*Internal transcribed spacer* - ITS). A amplificação foi realizada usando os iniciadores ITS1 (5' - CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A - 3') marcado com 5-carboxyfluorescein (5-FAM) (GARDES; BRUNS, 1993) e ITS4 (5' - TCC TCC GCT TAT TGA TAT C - 3') (WHITE et al., 1990).

As condições dos ciclos de reações foram os seguintes: 94°C por 90s, 13 ciclos de 94°C por 35s, 55°C por 55s, 72°C por 45s, 13 ciclos de 94°C por 35s, 55°C por 2min, 72°C por 45s, 9 ciclos de 94°C por 35s, 55°C por 3min, 72°C por 45s e uma extensão final de 72°C por 10min. O volume final das reações foi de 50µL, contendo 6µL de MgCl₂ (concentração final de Mg²⁺ de 3mM), 0,5µL (equivalente a 2,5U) de Taq polimerase, 5µL do tampão livre de Mg²⁺ (Sinapse Inc, São Paulo, Brasil), 4µL de desoxinucleosídeo trifosfato (dNTP) (0,2mM de cada base (Adenina, Timina, Citosina e Guanina)) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), 0,2µL de cada primer (0,02mM), 1,5µL (10mg mL⁻¹) de albumina de soro bovino (BSA) e 2µL de DNA molde, completando com 30,6µL de água ultrapura autoclavada.

Os produtos de PCR foram purificados com álcool isopropílico, clivados com a enzima *HaeIII* (5U) (Thermo Scientific) e precipitados com EDTA 125mM e acetato de sódio 3M. As amostras foram ressuspensas usando formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems, Life Technologies) com marcador GeneScan™ 1200 LIZ® (Applied Biosystems, Life Technologies) e analisadas em um sequenciador automático ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, Life Technologies). Os resultados foram

processados usando o programa GeneMapper® 4.1 (Applied Biosystems, Life Technologies), com uma linha de corte de 50 unidades de fluorescência, para remover o “background” das amostras.

3.6 Análises química do solo e planta

Os dados químicos de solo e de planta, bem como os dados do fracionamento de P foram obtidos previamente por Lopes (2017) e foram utilizados para complementar os resultados enzimáticos e moleculares obtidos no presente estudo. Em síntese, os dados químicos foram determinados de acordo com Raij et al. (2001) e Malavolta et al. (1997). O fracionamento químico do fósforo no solo foi realizado de acordo com Hedley et al. (1982), adaptado por Condon et al. (1985) e Rodrigues et al. (2016), que consiste em uma série de extratores químicos (Resina de troca aniônica-RTA, NaHCO_3 , NaOH e HCl) capazes de liberar formas orgânicas e inorgânicas de P do solo. As diferentes frações de P são agrupadas de acordo com a labilidade (disponibilidade) pelos extratores (CROSS; SCHLESINGER, 1995). A fração lábil (mais disponível) inclui as frações solúveis em RTA e NaHCO_3 , a fração moderadamente lábil (disponibilidade intermediária) inclui as frações solúveis em NaOH e HCl 0,1M e a fração não lábil (não disponível) inclui as frações solúveis em HCl 0,5M e residual (extraído com $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{MgCl}_2$).

3.7 Análise dos dados

Os dados foram analisados como um delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial duplo com tratamento adicional ($3 \times 2 + 1$). O primeiro fator é a fonte de P (C, FA e FB), o segundo é inoculação (com e sem) e o adicional (tratamento controle). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk, seguido pelo teste de homocedasticidade da variância por meio do teste de Bartlett. Atendidos os critérios (normalidade e homocedasticidade) da análise da variância (ANOVA) e obtendo F significativo, foi executado teste de múltiplas comparações, teste de Tukey a 5 e 10%, com o auxílio do pacote estatístico *ExpDes* no programa R® (R CORE TEAM, 2017).

Para análise dos dados do T-RFLP, calculou-se a abundância relativa das áreas de picos dos fragmentos de restrição terminal (T-RFs). A abundância relativa

foi tomada como sendo a porcentagem de cada T-RF na soma de todas as áreas de picos do perfil de T-RFLP. As diferenças entre os perfis de T-RFLP foram comprovadas por meio da análise de dissimilaridade (ANOSIM) e visualização gráfica por meio de análise de coordenadas principais (PCoA) com o auxílio do pacote estatístico *Vegan* no programa R® (R CORE TEAM, 2017).

Para as análises de redundância baseada em distância (dbRDA) os perfis de T-RFLP foram usados como variáveis respostas e as variáveis explicativas foram as atividades enzimáticas, abundância de genes e os dados químicos obtidos por Lopes (2017). Diferenças foram comprovadas por meio do teste de ADONIS com o auxílio do pacote estatístico *Vegan* no programa R® (R CORE TEAM, 2017).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fosfatase ácida

Aos seis meses, a atividade da fosfatase ácida entre os tratamentos inoculados foi maior ($p \leq 0,05$) no solo adubado com o composto (88,52 $\mu\text{g PNF} \cdot \text{g}^{-1} \text{ solo} \cdot \text{h}^{-1}$) e no solo adubado com o composto enriquecido com fosfato de Araxá (79,04 $\mu\text{g PNF} \cdot \text{g}^{-1} \text{ solo} \cdot \text{h}^{-1}$), C+I e FA+I, respectivamente. Estes tratamentos não apresentaram diferença na atividade da fosfatase ácida em relação ao tratamento mineral (74,38 $\mu\text{g PNF} \cdot \text{g}^{-1} \text{ solo} \cdot \text{h}^{-1}$) (Figura 3A) (APÊNDICE B e C).

Figura 3. Atividade da fosfatase ácida aos seis meses (A) e 12 meses (B) no solo adubado com composto sem inoculação (C), composto com inoculação (C+I), composto enriquecido com fosfato de Araxá sem inoculação (FA), composto enriquecido com fosfato de Araxá com inoculação (FA+I), composto enriquecido com fosfato de Bayóvar sem inoculação (FB), composto enriquecido com fosfato de Bayóvar com inoculação (FB+I) e com adubação mineral (M). Letras maiúsculas avaliam o efeito de inoculação em uma determinada fonte de P e letras minúsculas comparam o efeito de fonte no mesmo nível de inoculação pelo teste de Tukey a 5% ($p \leq 0,05$). Asterisco indica diferença ($p \leq 0,05$) entre épocas, sendo maior na época onde está plotado.

Para estes tratamentos (C+I e FA+I) também foi observado aumento na produtividade de 15 e 13 Mg ha^{-1} , respectivamente, em relação ao tratamento mineral e também aumento no açúcar total (Figura 4A e 4B). Estudos aplicando adubação orgânica no solo mostraram o aumento de produtividade em cana-de-açúcar (SUNDARA; NATARAJAN; HARI, 2002; KAUR; REDDY, 2015), no entanto não

avaliaram o efeito de inoculação na atividade da fosfatase ácida no solo durante o cultivo. A atividade enzimática é um indicador sensível às práticas de manejo (NANNIPIERI et al., 2011) e o incremento da atividade da fosfatase ácida pode ter favorecido o aumento da produtividade da cana-de-açúcar no presente estudo.

O aumento da atividade da fosfatase ácida, aos seis meses, pode ter favorecido também a redução da fração de fósforo não disponível (P não lábil) e incrementado a fração disponível de P (representado pela fração lábil e moderadamente lábil) em relação aos tratamentos que não receberam inoculação (C e FA) (Figura 5A). Por meio da regressão linear foi possível relacionar que o aumento da atividade das fosfatases ácidas (em resposta a uma possível escassez de P) aumentou, aos seis meses, o teor de fósforo disponível (P lábil) e moderadamente disponível no solo (P moderadamente lábil) (Figura 6A e 6C).

Figura 4. Produtividade (A) e açúcar total da cana de açúcar (B) após 12 meses de cultivo (cana planta) nos tratamentos adubados com composto sem inoculação (C), composto com inoculação (C+I), composto enriquecido com fosfato de Araxá sem inoculação (FA), composto enriquecido com fosfato de Araxá com inoculação (FA+I), composto enriquecido com fosfato de Bayóvar sem inoculação (FB), composto enriquecido com fosfato de Bayóvar com inoculação (FB+I) e com adubação mineral (M). Letras maiúsculas diferem pelo teste de Tukey a 10% ($p \leq 0,1$). Fonte: Adaptado de Lopes (2017).

Os microrganismos utilizados no presente estudo (*Bacillus simplex* BACBR04, *Bacillus* sp. BACBR06 e *Rhizobium* sp. RIZBR0) são promotores do crescimento

vegetal e podem ter atuado diretamente na solubilização de P, excretando fosfatases ácidas, ou estimulando outros grupos microbianos (OWEN et al., 2015). É relatado também aumento nas frações disponíveis de carbono (C) e nitrogênio (N) com a aplicação de composto em cultivo de cana-de-açúcar devido ao estímulo da biomassa microbiana do solo na ciclagem de nutrientes (LIU et al., 2018). Aos seis meses não houve efeito de inoculação na atividade da fosfatase ácida no solo adubado com o composto enriquecido com fosfato de Bayóvar (FB e FB+I), enquanto que aos 12 meses houve efeito de inoculação, sendo maior no tratamento FB (Figura 3A e 3B).

Aos 12 meses, a atividade da fosfatase ácida foi maior ($p \leq 0,05$) no solo adubado com o composto com e sem inoculação ($96,02 \mu\text{g PNF.g}^{-1} \text{ solo.h}^{-1}$ e $90,20 \mu\text{g PNF.g}^{-1} \text{ solo.h}^{-1}$, respectivamente) e também no solo adubado com o composto enriquecido com fosfato de Bayóvar ($91,07 \mu\text{g PNF.g}^{-1} \text{ solo.h}^{-1}$), mas ambos não diferiram ($p \leq 0,05$) do solo adubado com superfosfato triplo (Figura 3B). A atividade da fosfatase ácida no tratamento mineral e no solo adubado somente com o composto foi maior ($p \leq 0,05$) aos 12 meses de cultivo do que aos seis meses (Figura 3A e 3B) (APÊNDICE D).

De maneira geral, a atividade da fosfatase ácida foi inversa à disponibilidade de P no solo (Figura 7A e 7B). Isso porque a comunidade microbiana e vegetal responde à disponibilidade de P na solução do solo com a extrusão de fosfatase ácida (NANNIPIERI et al., 2011). Por esta razão, no tratamento mineral (adubado com superfosfato triplo), que apresentou mais P disponível aos seis meses, a atividade da fosfatase ácida foi menor aos seis meses em relação aos 12 meses.

Figura 5. Porcentagens das frações de P no solo obtidas por meio do fracionamento químico do P no solo aos seis meses (A) e 12 meses (B) nos tratamentos C (composto), C+I (composto com inoculação), FA (composto enriquecido com fosfato de Araxá), FA+I (composto enriquecido com fosfato de Araxá com inoculação), FB (composto enriquecido com fosfato de Bayóvar), FB+I (composto enriquecido com fosfato de Bayóvar com inoculação) e M (mineral). Fonte: Adaptado de Lopes (2017).

Figura 6. Regressão linear entre a atividade da fosfatase ácida com o fósforo lábil aos seis e 12 meses (A e B) e com o fósforo moderadamente lábil aos seis e 12 meses (C e D) ($n=28$). Frações de P obtidas de Lopes (2017).

Figura 7. Média de todos os tratamentos da mesma época e erro padrão da atividade da fosfatase ácida (A) e fósforo disponível no solo (B). Os tratamentos diferem entre as épocas de amostragem pelo teste de Tukey a 5% ($p \leq 0,05$). Fósforo lábil adaptado de Lopes (2017).

4.2 Fosfatase alcalina

O solo adubado com o composto enriquecido com fosfato de Araxá sem inoculação (FA) apresentou maior ($p \leq 0,05$) atividade da fosfatase alcalina aos seis meses ($61,55 \mu\text{g PNF} \cdot \text{g}^{-1} \text{ solo} \cdot \text{h}^{-1}$) (Figura 8A). Isso pode estar associado a uma estimulação de fungos presentes no solo que, na presença de rocha fosfática, secretam fosfatases alcalinas para solubilizar o P para seu metabolismo (BRAHMAPRAKASH et al., 2017).

Figura 8. Atividade da fosfatase alcalina aos seis meses (A) e 12 meses (B) nos tratamentos adubados com composto sem inoculação (C), composto com inoculação (C+I), composto enriquecido com fosfato de Araxá sem inoculação (FA), composto enriquecido com fosfato de Araxá com inoculação (FA+I), composto enriquecido com fosfato de Bayóvar sem inoculação (FB), composto enriquecido com fosfato de Bayóvar com inoculação (FB+I) e com adubação mineral (M). Letras maiúsculas avaliam o efeito de inoculação em uma determinada fonte de P e letras minúsculas comparam o efeito de fonte no mesmo nível de inoculação pelo teste de Tukey a 5% ($p \leq 0,05$). Asterisco indica diferença ($p \leq 0,05$) entre épocas, sendo maior na época onde está plotado.

Aos 12 meses, entre os tratamentos que receberam inoculação, houve maior atividade da fosfatase alcalina no solo adubado com o composto ($47,13 \mu\text{g PNF} \cdot \text{g}^{-1} \text{ solo} \cdot \text{h}^{-1}$) e no solo adubado com o composto enriquecido com fosfato de Araxá ($49,41 \mu\text{g PNF} \cdot \text{g}^{-1} \text{ solo} \cdot \text{h}^{-1}$), C+I e FA+I, respectivamente (Figura 8B). Para estes dois tratamentos a atividade das fosfatases (ácida e alcalina) exibiu comportamento semelhante e pode ser atribuído à estimulação das associações entre as bactérias

inoculadas e a comunidade microbiana indígena do solo (ZHANG et al., 2014). Ademais, ressalta-se a possível existência de microssítios alcalinos que possibilitaram a maior atividade das fosfatases alcalinas, uma vez que o solo em estudo estava ligeiramente ácido (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

No presente estudo, para os tratamentos com BSF e com composto enriquecido com rocha fosfática foi observado o uso mais eficiente do P do que no solo adubado com superfosfato triplo, o que pode estar relacionado ao estímulo causado pelas bactérias ou interações microbianas com outros grupos (ROMÃO-DUMARESQ et al., 2017). Estudos avaliando a adubação com rocha fosfática (PAVINATO et al., 2017; MARGENOT et al., 2017) também observaram o uso mais eficiente do P com esse tipo de manejo em solos ácidos.

Foi observada maior contribuição da fosfatase ácida (avaliada pela maior atividade) do que a fosfatase alcalina. De acordo com Margenot et al. (2017), isso acontece porque a atividade da fosfatase ácida (pH ótimo de 6,5) é favorecida em solos ligeiramente ácidos enquanto que a atividade da fosfatase alcalina (pH ótimo de 11) é desfavorecida.

4.3 Fitase

Aos seis meses, em todos os solos adubados com composto e fontes alternativas de P que não receberam inoculação a atividade da fitase foi maior (Figura 9A). Aos 12 meses não houve diferença entre os tratamentos (Figura 9B). Pouca diferença na atividade da fitase pode estar relacionada com a maior estabilidade do fitato no solo uma vez que este possui uma elevada afinidade com os coloides do solo, reduzindo assim sua solubilidade (BHAT et al., 2017). Além disso, o fitato compõe a fração orgânica do solo (ZHU; LI; WHELAN, 2018) e no presente estudo a fração orgânica representou menos que 40% das frações de P no solo (Figura 5A e 5B).

Entre os solos que não receberam inoculação houve efeito da época de amostragem, nos quais os tratamentos FA e FB apresentaram maior atividade da fitase aos seis meses (Figura 9A). Ambos foram enriquecidos com fontes alternativas de P e isto sugere que a adição destes fosfatos naturais possa ter

contribuído para essa maior atividade da fitase neste período. O uso de fosfatos naturais tem ganhado relevância, sobretudo para o uso sustentável do P na agricultura (WITHERS et al., 2018). O fosfato de Bayóvar, de origem sedimentar, apresenta maior solubilidade, devido a sua dupla substituição isomórfica, do íon fosfato por carbonato e de hidroxilas por flúor (HAMMOND et al., 1986). Este tem se mostrado promissor na disponibilização rápida do P no solo. O fosfato de Araxá, de origem ígnea, com menor grau de substituição isomórfica, consequentemente menos solúvel, também tem apresentado elevado potencial para uso na agricultura, principalmente pelo seu poder residual (TELES et al., 2017). A menor solubilidade do fosfato de Araxá poderia ter contribuído para a maior atividade da fitase, aos seis meses, no solo que recebeu a inoculação (FA+I) (Figura 9A).

Figura 9. Atividade da fitase aos seis meses (A) e 12 meses (B) nos tratamentos adubados com composto sem inoculação (C), composto com inoculação (C+I), composto enriquecido com fosfato de Araxá sem inoculação (FA), composto enriquecido com fosfato de Araxá com inoculação (FA+I), composto enriquecido com fosfato de Bayóvar sem inoculação (FB), composto enriquecido com fosfato de Bayóvar com inoculação (FB+I) e com adubação mineral (M). Letras maiúsculas diferem os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% ($p \leq 0,05$). Asterisco indica diferença ($p \leq 0,05$) entre épocas, sendo maior na época onde está plotado.

4.4 β -Glucosidase

Houve maior atividade da β -glucosidase aos seis meses para todos os tratamentos, exceto no solo adubado somente com o composto com inoculação (Figura 10A).

Figura 10. Atividade da β -glucosidase aos seis meses (A) e 12 meses (B) nos tratamentos adubados com composto sem inoculação (C), composto com inoculação (C+I), composto enriquecido com fosfato de Araxá sem inoculação (FA), composto enriquecido com fosfato de Araxá com inoculação (FA+I), composto enriquecido com fosfato de Bayóvar sem inoculação (FB), composto enriquecido com fosfato de Bayóvar com inoculação (FB+I) e com adubação mineral (M). Letras maiúsculas avaliam o efeito de inoculação em uma determinada fonte de P e letras minúsculas comparam o efeito de fonte no mesmo nível de inoculação pelo teste de Tukey a 5% ($p \leq 0,05$). Asterisco indica diferença ($p \leq 0,05$) entre épocas, sendo maior na época onde está plotado.

O período de seis meses foi o que apresentou maior teor de carbono orgânico (ANEXO 1). Possivelmente esse carbono estava não disponível para manutenção do metabolismo microbiano, fazendo com que houvesse maior excreção de β -glucosidase para disponibilizá-lo, resultando assim em maior atividade destas enzimas (AHMED et al., 2017). Aos 12 meses, entre os tratamentos que receberam inoculação, os tratamentos C+I e FA+I apresentaram maior atividade (Figura 10B). Estes tratamentos foram os que apresentaram maior atividade da fosfatase ácida e maior produtividade em relação ao tratamento mineral. Logo, fica evidente uma estreita relação entre a produtividade e a atividade destas enzimas. Plantas e microrganismos são capazes de excretar estas enzimas (fosfatase ácida e β -glucosidase) em resposta à disponibilidade de P e C (AHMED et al., 2017). Em estudos com trigo (*Triticum aestivum*) Bhat et al. (2017) obtiveram maior atividade de β -glucosidase e fosfatases (ácida e alcalina) em cultivo orgânico em relação ao

convencional adubado com fertilizante sintético, sendo que atribuem esse efeito ao aporte de diferentes fontes de C no sistema o que promoveu uma maior biodiversidade e consequentemente maior eficiência na ciclagem de nutrientes, sobretudo do C e P.

Aos 12 meses todos os solos adubados com composto, inoculados ou não, apresentaram maior atividade da β -glucosidase em relação ao tratamento mineral (Figura 10B). Esse aporte do composto orgânico pode ter refletido em maior taxa de renovação do C do solo, se comparado com o mineral, consequentemente, aumentando a atividade da β -glucosidase no solo que está envolvida na hidrólise da celobiose (ZHANG et al., 2015). Além disso, o material orgânico adicionado ao solo é importante na imobilização de enzimas extracelulares do solo, no complexo argila-húmus (TABATABAI, 1994). O aumento da β -glucosidase pode refletir uma maior quantidade de sítios de proteção dentro do solo, como resultado do aumento do conteúdo de húmus (ZHANG et al. 2015).

4.5 Abundância do gene 16S RNAr

Aos seis meses houve diferença ($p \leq 0,05$) na abundância do gene 16S RNAr no solo adubado com o composto enriquecido com fosfato de Bayóvar que recebeu a inoculação (FB+I), apresentando este menor abundância em relação ao solo que recebeu este mesmo composto sem inoculação (FB) (Figura 11A) (APÊNDICE E e F). Aos 12 meses, os solos que não receberam inoculação apresentaram maior ($p \leq 0,1$) abundância do gene 16S RNAr (Figura 11B). Não houve diferença entre as épocas de amostragem entre os tratamentos (Figura 11A e 11B) (APÊNDICE G).

Foi observado que nos solos que receberam inoculação, independentemente da fonte de P, houve aumento na produtividade da cana-de-açúcar e diminuição na abundância do gene 16S RNAr. Isso sugere que o consórcio aplicado no solo (*Bacillus simplex* BACBR04, *Bacillus* sp. BACBR06 e *Rhizobium* sp. RIZBR0) possa ter estimulado grupos microbianos específicos no solo, em menor abundância, capazes de sustentar o aumento de produtividade obtido (SENGUPTA et al., 2017). Em estudo anterior que serviu como prelúdio a este, também foi obtida menor abundância do gene 16S RNAr nos solos que receberam inoculação, sendo as

plantas cultivadas nestes solos as que apresentaram maior teor foliar de P, N e K (ESTRADA-BONILLA, 2015).

As estirpes inoculadas foram selecionadas do ambiente rizosférico de cana-de-açúcar (ESTRADA-BONILLA, 2015) e são amplamente conhecidas pela capacidade de solubilizar P, sintetizar reguladores de crescimento de plantas (ácido indolacético, giberelinas e citocininas) e atuar no controle de patógenos (GOVINDASAMY et al., 2010). Por ter sido observado incremento nos teores de P no solo e, conseqüentemente, aumento na produtividade, sugere-se que o mecanismo de solubilização de P possa ter sido o mais atuante para este estudo.

Figura 11. Abundância do gene 16S RNAr aos seis meses (A) e 12 meses (B) nos tratamentos adubados com composto sem inoculação (C), composto com inoculação (C+I), composto enriquecido com fosfato de Araxá sem inoculação (FA), composto enriquecido com fosfato de Araxá com inoculação (FA+I), composto enriquecido com fosfato de Bayóvar sem inoculação (FB), composto enriquecido com fosfato de Bayóvar com inoculação (FB+I) e com adubação mineral (M). Letras maiúsculas avaliam o efeito de inoculação em uma determinada fonte de P e letras minúsculas comparam o efeito de fonte no mesmo nível de inoculação pelo teste de Tukey a 5% ($p \leq 0,05$). Asterisco indica diferença ($p \leq 0,05$) entre épocas, sendo maior na época onde está plotado.

4.6 Abundância do gene *phoD*

Não houve diferença ($p \leq 0,05$) na abundância do gene *phoD* (Figura 12A e 12B). Em média, a abundância do gene *phoD* foi de 6,5 (Log) cópias g^{-1} para os dois períodos de amostragem. Este gene faz parte do *Pho regulon* (responsável pela síntese de fosfatases e fitases) e foi identificado na codificação da fosfatase alcalina

em bactérias (GOMEZ; INGRAM, 1995). Em condições de solo alcalino é encontrada a relação entre número de cópias do gene *phoD* e atividade da fosfatase alcalina (FRASER et al., 2015a; FRASER et al., 2015b). No entanto, para este estudo (solo ligeiramente ácido), foi encontrada uma relação da abundância do gene *phoD* com a atividade da fosfatase ácida (Figura 13A e 13B). Isso pode estar relacionado a outros genes que poderiam estar associados ou não ao *phoD* (*phoA*, *phoX*, *phoC*) e que estariam codificando para fosfatase ácida (FRASER et al., 2017). Neste estudo, também observamos uma relação entre a abundância do gene *phoD* com as classes de P (lábil e moderadamente lábil) (Figura 14A e 14B).

Figura 12. Abundância do gene *phoD* aos seis meses (A) e 12 meses (B) nos tratamentos adubados com composto sem inoculação (C), composto com inoculação (C+I), composto enriquecido com fosfato de Araxá sem inoculação (FA), composto enriquecido com fosfato de Araxá com inoculação (FA+I), composto enriquecido com fosfato de Bayóvar sem inoculação (FB), composto enriquecido com fosfato de Bayóvar com inoculação (FB+I) e com adubação mineral (M).

Figura 13. Regressão linear entre a abundância do gene phoD com a atividade da fosfatase ácida (A) e com a atividade da fosfatase alcalina (B). Pontos referentes aos dois períodos de amostragem ($n=56$).

Figura 14. Regressão linear entre a abundância do gene phoD com a fração de P lábil (A) e com a fração de P moderadamente lábil (B). Pontos referentes aos dois períodos de amostragem ($n=56$). Dados das frações de P obtidas por Lopes (2017).

4.7 Abundância do gene ITS

Houve efeito de inoculação na abundância do gene ITS. Aos seis meses os solos adubados com composto e fontes alternativas de P que receberam inoculação apresentaram a menor abundância deste gene (Figura 15A). Comportamento semelhante foi observado para o gene 16S RNAr no período de 12 meses (Figura 11B).

Logo, no estágio de máximo crescimento da cana-de-açúcar (seis meses) houve menor abundância do gene ITS nos tratamentos que apresentaram maior produtividade (inoculados). Já no estágio de máxima maturação da cana-de-açúcar (12 meses) houve menor abundância do gene 16S RNAr nos tratamentos que apresentaram maior produtividade (inoculados). Aos seis meses podem ter sido predominantes os mecanismos de proteção contra patógenos exercidos ou estimulados pelas bactérias inoculadas, mais do que a comunidade fúngica, motivo pelo qual se reduziu a abundância do gene ITS. Além disso, pode ter ocorrido o recrutamento de uma microbiota especializada e menos abundante (fungos) em solubilizar as fontes alternativas de P (SENGUPTA et al., 2017). É sabido que fungos possuem maior capacidade de solubilizar rocha fosfática e isso pode estar relacionado com a sua maior capacidade de excreção de ácidos orgânicos, devido à sua constituição pluricelular (DASTOGEER et al., 2017).

Figura 15. Abundância do gene ITS aos seis meses (A) e 12 meses (B) nos tratamentos adubados com composto sem inoculação (C), composto com inoculação (C+I), composto enriquecido com fosfato de Araxá sem inoculação (FA), composto enriquecido com fosfato de Araxá com inoculação (FA+I), composto enriquecido com fosfato de Bayóvar sem inoculação (FB), composto enriquecido com fosfato de Bayóvar com inoculação (FB+I) e com adubação mineral (M). Letras maiúsculas avaliam o efeito de inoculação no grupo de tratamentos (teste de Tukey a 5% $p \leq 0,05$).

4.8 Estrutura da comunidade bacteriana

Aos seis meses a estrutura da comunidade bacteriana do solo diferiu com a inoculação entre os tratamentos C e C+I ($p \leq 0,05$; $R=0,36$) (Figura 16A). Mudança

na estrutura da comunidade bacteriana foi obtida tanto durante o processo de compostagem para obtenção do composto utilizado no presente estudo (ESTRADA-BONILLA et al., 2017) quanto no solo do experimento prévio em casa de vegetação com plantas de cana-de-açúcar após aplicação de composto e inoculação com BSF (ESTRADA-BONILLA, 2015). No estudo de Estrada-Bonilla (2015), o autor relatou que a aplicação de composto associado com BSF alterou a organização da comunidade bacteriana e promoveu maior abundância de *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, e *Actinobacteria*.

Para o presente estudo a técnica utilizada (T-RFLP) não permitiu acessar os grupos, apenas a forma na qual os grupos estavam estruturados. Entretanto, é provável que, neste estudo, haja uma maior abundância destes mesmos grupos (*Proteobacteria*, *Acidobacteria*, e *Actinobacteria*), pois estes são tidos como os principais em cultivos de cana-de-açúcar (DINI-ANDREOTE et al., 2010; DURRER et al., 2017).

Aos seis meses, também houve diferença ($p \leq 0,1$) entre os tratamentos C e FA ($R=0,25$), C e FB ($R=0,23$), e também houve diferença ($p \leq 0,05$) entre o C e FA+I ($R=0,45$) (Figura 16A). Esses resultados mostraram que, quando o solo foi adubado com composto enriquecido com fontes de P, as comunidades bacterianas se estruturaram de forma distinta. De acordo com Soman et al. (2017), essa mudança na estrutura da comunidade bacteriana pode estar relacionada à limitação na ciclagem de nutrientes, influxo de microrganismos e a qualidade do material orgânico que está sendo adicionado. Para o presente estudo, a diferença na solubilidade das fontes alternativas de P (fosfato de Araxá e fosfato de Bayóvar) (HAMMOND et al., 1986) pode ter influenciado na estruturação da comunidade bacteriana.

A maior diferenciação da estrutura da comunidade bacteriana (baseada no valor de R) foi apresentada por um dos tratamentos que apresentaram maior produtividade (FA+I), ao compará-lo com o tratamento C (APÊNDICE H). Assim, nota-se que, aos seis meses, mesmo não havendo diferença na abundância do gene 16S RNAr (Figura 11A) e também no gene funcional *phoD* (Figura 12A), a estrutura

da comunidade se organiza de forma distinta, podendo ter favorecido grupos específicos e estes podendo ter proporcionado melhorias na nutrição das plantas de cana-de-açúcar (LI et al., 2017), traduzidas para este estudo como o aumento na produtividade, sobretudo nos tratamentos FA+I e C+I. Este último foi o único tratamento que, aos 12 meses, apresentou diferença ($p \leq 0,1$; $R=0,19$) na estrutura da comunidade bacteriana ao compará-lo com o tratamento M (adubado com superfosfato triplo) (Figura 15B).

Houve diferença ($p \leq 0,01$) entre os períodos de amostragem (Figura 16C). Essa diferença pode estar relacionada à dinâmica dos atributos biológicos e químicos (LOPES, 2017). De acordo com a análise de redundância baseada em distância (dbRDA) foi possível observar que o período de seis meses de cultivo foi o que apresentou maior correlação com a dinâmica dos atributos químicos e biológicos (Figura 17). Com relação à dbRDA, observou-se que os atributos significativos que mais contribuem para explicar o perfil de picos obtidos a partir do T-RFLP são: a abundância do gene *phoD*, 16S RNAr, atividade da fosfatase alcalina, o carbono orgânico do solo e o fósforo lábil do solo (APÊNDICE I).

Foi observado que a atividade da fosfatase ácida e o teor de zinco no solo (LOPES, 2017) foram mais correlacionados com o período de 12 meses, no entanto não foram significativos (Figura 17) (APÊNDICE I).

Figura 16. Diagrama de coordenadas principais (PCoA) dos dados de T-RFLP do gene 16S RNAr aos seis meses (A), 12 meses (B) e nos dois períodos (C).

Figura 17. Análise de redundância baseada em distância (dbRDA) da estrutura da comunidade bacteriana obtida por meio do T-RFLP, atributos químicos (LOPES, 2017) e atributos biológicos no solo. FML: fósforo moderadamente lábil; FL: fósforo lábil; FNL: fósforo não lábil; S: teor de enxofre; 16S: abundância do gene 16S RNAr; Corg: carbono orgânico; ITS: abundância do gene ITS; phoD: abundância do gene phoD; pH: potencial hidrogeniônico; F.al: atividade da fosfatase alcalina; F.ac: atividade da fosfatase ácida e Zn: teor de zinco. *indica contribuição significativa pelo teste de ADONIS ($p < 0,05$).

4.9 Estrutura da comunidade fúngica

O solo que recebeu inoculação e foi adubado com o composto sem fonte adicional de P (C+I) foi o único que apresentou diferença ($p \leq 0,05$) na estrutura da comunidade de fungos nos dois períodos de amostragem ao compará-lo com o tratamento controle (M) (Figura 18A e 18B) (APÊNDICE J). Essa diferença pode ser explicada por duas frentes, a primeira é que a aplicação de material orgânico no solo é capaz de estimular o crescimento de fungos, aumentando a sua abundância se comparado com o solo quimicamente fertilizado (GUO et al., 2018). A segunda frente está relacionada à inoculação com BSF, pois esta pode ter interagido com a comunidade fúngica (positiva ou negativamente), e consequentemente promoveu diferenciação na estrutura da comunidade (SHARMA et al., 2017; ANDREOTE; PEREIRA E SILVA, 2017).

Figura 18. Diagrama de coordenadas principais (PCoA) dos dados de T-RFLP do gene ITS aos seis meses (A), 12 meses (B) e nos dois períodos (C).

Para o cultivo de cana-de-açúcar é relatado que os estágios iniciais de desenvolvimento são os mais significativos para a comunidade de fungos, mais do que para a de bactérias (DE SOUZA et al., 2016). Aqui foi observado que houve diferença na estrutura da comunidade fúngica aos seis meses (período de máximo crescimento da cana-de-açúcar) entre o solo adubado com composto que recebeu inoculação e o solo fertilizado quimicamente. Neste mesmo período também foi observada diminuição da abundância do gene ITS em todos os solos que receberam o composto e inoculação (Figura 15). Em relação ao período de amostragem, observou-se muita sobreposição entre estes ($R=0,04$) (Figura 18C), entretanto, encontrou-se uma diferença significativa ($p<0,05$) entre os períodos. Assim como o observado para a estrutura da comunidade bacteriana a estrutura da comunidade fúngica aos seis meses foi relacionada com todos os atributos biológicos e químicos (LOPES, 2017) avaliados (Figura 19) (APÊNDICE K).

Figura 19. Análise de redundância baseada em distância (dbRDA) da estrutura da comunidade fúngica obtida por meio do T-RFLP, atributos químicos (LOPES, 2017) e atributos biológicos no solo. FML: fósforo moderadamente lábil; FL: fósforo lábil; FNL: fósforo não lábil; S: teor de enxofre; 16S: abundância do gene 16S RNAr; Corg: carbono orgânico; ITS: abundância do gene ITS; phoD: abundância do gene phoD; pH: potencial hidrogeniônico; F.al: atividade da fosfatase alcalina; F.ac: atividade da fosfatase ácida e Zn: teor de zinco. *indica contribuição significativa pelo teste de ADONIS ($p<0,05$).

5 CONCLUSÕES

1. Nos solos que receberam inoculação e foram adubados com o composto enriquecido com fosfato de Araxá (FA+I) e o composto sem enriquecimento de P (C+I) houve aumento na atividade das fosfatases (ácida e alcalina) e da β -glucosidase, bem como na disponibilidade de P.

2. Os tratamentos FA+I e C+I apresentaram aumento de 10% (13Mg ha^{-1} e 15Mg ha^{-1} , respectivamente) na produtividade da cana-de-açúcar em relação ao tratamento adubado com superfosfato triplo (controle).

3. Com a inoculação de BSF houve a diminuição da abundância do gene ITS no período de máximo crescimento da cana-de-açúcar (seis meses) e diminuição da abundância do gene 16S RNAr no período de maturação máxima (12 meses).

4. Não foram encontradas diferenças na abundância do gene *phoD*, no entanto foi encontrada relação deste gene com a atividade da fosfatase ácida e com as frações de P no solo.

5. Mudanças na comunidade bacteriana e fúngica foram mais acentuadas no tratamento C+I em relação ao controle (M).

6. As estruturas das comunidades bacteriana e fúngica variaram entre os períodos de amostragem e foram mais relacionadas à dinâmica dos atributos químicos e biológicos aos seis meses.

7. O manejo baseado na aplicação de composto orgânico associado à inoculação com BSF é capaz de aumentar a produtividade em condições de campo em cultivo de cana planta. Ocorre o aumento da atividade da fosfatase ácida, fosfatase alcalina e β -glucosidase, sobretudo nos tratamentos que apresentam maior produtividade (C+I e FA+I). Com o uso da inoculação a estrutura da comunidade (fúngica e bacteriana) é alterada e há redução da abundância de genes ITS no período de máximo crescimento da cana planta e redução do gene 16S no período de máxima maturação da cana planta nas condições de nosso experimento.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA-MARTÍNEZ, V.; TABATABAI, M. A. Phosphorus cycle enzymes. In: DICK, R. P., ed. **Methods of soil enzymology**. Soil Science Society of America, Madison, p. 161–183, 2011.
- AHMED, A.; NASIM, F. ul-H.; BATOOL, K.; BIBI, A. Microbial β -Glucosidase: Sources, Production and Applications. **J Appl Environ Microbiol**, v. 5, p. 31–46, 2017.
- AMES, B. N. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. **Methods in Enzymology**, v. 8, p. 115–118, 1966.
- 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.
- ANDREOTE, F. D.; CARDOSO, E. J. B. N. Introdução à Biologia do Solo. In: CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D., eds. **Microbiologia do Solo**. ESALQ, Piracicaba, p. 9–22, 2016.
- ANDREOTE, F. D.; GUMIERE, T.; DURRER, A. Exploring interactions of plant microbiomes. **Scientia Agricola**, v. 71, p. 528–539, 2014.
- BHAT, N. A.; RIAR, A.; RAMESH, A.; IQBAL, S.; SHARMA, M. P.; SHARMA, S. K.; BHULLAR, G. S. Soil Biological Activity Contributing to Phosphorus Availability in Vertisols under Long-Term Organic and Conventional Agricultural Management. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1–11, 2017.
- BINI, D.; LOPEZ, M. V. Transformações microbianas do fósforo. In: CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D., eds. **Microbiologia do Solo**. ESALQ, Piracicaba, p. 149–166, 2016.
- BINI, D.; LOPEZ, M. V.; CARDOSO, E. J. B. N. Metabolismo microbiano. In: CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D., eds. **Microbiologia do Solo**. ESALQ, Piracicaba, p. 61–80, 2016.
- BRAHMAPRAKASH, G. P.; SAHU, P. K.; LAVANYA, G.; NAIR, S. S.; GANGARADDI, V. K.; GUPTA, A. Microbial Functions of the Rhizosphere. In: SINGH, D. P.; SINGH, H. B.; PRABHA, R., eds. **Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives: Fundamental Mechanisms, Methods and Functions**. Springer, Dordrecht, p.177–210, 2017.
- CARDOSO, E. J. B. N.; VASCONCELLOS, R. L. F.; BINI, D.; MIYAUCHI, M. Y. H.; SANTOS, C. A. dos; ALVES, P. R. L.; PAULA, A. M. De; NAKATANI, A. S.; PEREIRA, J. de M.; NOGUEIRA, M. A. Soil health: looking for suitable indicators. What should be considered to assess the effects of use and management on soil health? **Scientia Agricola**, v. 70, p. 274–289, 2013.

CASAGRANDE, A. A. **Tópicos de morfologia e fisiologia da cana-de-açúcar**. Jaboticabal: Funep, 1991. 157p.

CHANDEL, A.; SILVEIRA, M. H. L. **Advances in Sugarcane Biorefinery: Technologies, Commercialization, Policy Issues and Paradigm Shift for Bioethanol and By-Products**. Elsevier, Nova Iorque, p. 1–342, 2018.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; MARÍLIA, H.; ABREU, C. De; ARRUDA, P.; CIERO, L.; FERRO, J. A.; VARGAS, A.; FIGUEIRA, D. O.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; REINACH, F. D. C.; ROMANO, E. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, v. 4, p. 62–89, 2011.

CHERUBIN, M. R.; FRANCO, A. L. C.; CERRI, C. E. P.; OLIVEIRA, D. M. da S.; DAVIES, C. A.; CERRI, C. C. Sugarcane expansion in Brazilian tropical soils-Effects of land use change on soil chemical attributes. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 211, p. 173–184, 2015.

CLIMATEMPO, 2017. Disponível em: <https://www.climatempo.com.br/>. Acesso em 20/01/2017 às 15:00h.

CONAB - **Companhia Nacional de Abastecimento**. Acompanhamento da safra brasileira 2017/2018, Brasília, v. 4, 2017.

CONDRON, L. M.; GOH, K. M.; NEWMAN, R. H. Nature and distribution of soil phosphorus as revealed by a sequential extraction method followed by ³¹P nuclear magnetic resonance analysis. **Journal of Soil Science**, v. 36, p.199-207, 1985.

CONSECANA - **Conselho dos Produtores de Cana-de-Açúcar, Açúcar e Alcool do Estado de São Paulo**. Manual de Instruções, Piracicaba-SP, 2006. 112 p

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.

CROSS, A. F.; SCHLESINGER, W. H. A literature review and evaluation of the Hedley fractionation: Applications to the biogeochemical cycle of soil phosphorus in natural ecosystems. **Geoderma**, v. 64, p. 197–214, 1995.

DASTOGEER, K. M. G.; WYLIE, S. J. Plant–Fungi Association: Role of Fungal Endophytes in Improving Plant Tolerance to Water Stress. In: Singh, D. P.; SINGH, H. B.; PRABHA, R., eds. **Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives: Fundamental Mechanisms, Methods and Functions**. Springer, Dordrecht, p. 143–159, 2017.

DE SOUZA, R. S. C.; OKURA, V. K.; ARMANHI, J. S. L.; JORRÍN, B.; LOZANO, N.; DA SILVA, M. J.; GONZÁLEZ-GUERRERO, M.; DE ARAÚJO, L. M.; VERZA, N. C.; BAGHERI, H. C.; IMPERIAL, J.; ARRUDA, P. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–15, 2016.

DINI-ANDREOTE, F.; ANDREOTE, F. D.; COSTA, R.; TAKETANI, R. G.; VAN ELSAS, J. D.; ARAÚJO, W. L. Bacterial soil community in a Brazilian sugarcane field. **Plant and Soil**, v. 336, p. 337–349, 2010.

DOTANIYA, M. L.; DATTA, S. C.; BISWAS, D. R.; DOTANIYA, C. K.; MEENA, B. L.; RAJENDIRAN, S.; REGAR, K. L.; LATA, M. Use of sugarcane industrial by-products for improving sugarcane productivity and soil health. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture**, v. 5, p. 185–194, 2016.

DURRER, A.; GUMIERE, T.; TAKETANI, R. G.; COSTA, D. P. da; PEREIRA E SILVA, M. de C.; ANDREOTE, F. D. The drivers underlying biogeographical patterns of bacterial communities in soils under sugarcane cultivation. **Applied Soil Ecology**, v. 110, p. 12–20, 2017.

ESTRADA, G. A.; BALDANI, V. L. D.; DE OLIVEIRA, D. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. **Plant and Soil**, v. 369, p. 115–129, 2013.

ESTRADA-BONILLA, G. A. **Efeito da inoculação de bactérias mobilizadoras de fósforo na compostagem e no desenvolvimento da cana-de-açúcar**. 2015. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

ESTRADA-BONILLA, G. A.; LOPES, C. M.; DURRER, A.; ALVES, P. R. L.; PASSAGLIA, N.; CARDOSO, E. J. B. N. Effect of phosphate-solubilizing bacteria on phosphorus dynamics and the bacterial community during composting of sugar cane industry waste. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 40, p. 308–313, 2017.

FINK, J. R.; INDA, A. V.; TIECHER, T.; BARRÓN, V. Óxidos De Ferro E Matéria Orgânica Na Disponibilidade De fósforo No Solo. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 40, p. 369–379, 2016.

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, 2015a.

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.

FRASER, T.; LYNCH, D. H.; ENTZ, M. H.; DUNFIELD, K. E. Linking alkaline phosphatase activity with bacterial phoD gene abundance in soil from a long-term management trial. **Geoderma**, v. 257–258, p. 115–122, 2015b.

GARDES, M.; BRUNS, T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, v. 2, p. 113–118, 1993.

GOMEZ, P. F.; INGRAM, L. O. Cloning, Sequencing, and Characterization of the Intracellular Invertase Gene from *Zymomonas mobilis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 125, p. 237–246, 1995.

GOVINDASAMY, V.; SENTHILKUMAR, M.; MAGHESHWARAN, V.; KUMAR, U.; BOSE, P.; SHARMA, V.; ANNAPURNA, K. *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: Potential PGPR for Sustainable Agriculture. In: MAHESHWARI, D. K., ed. **Plant Growth and Health Promoting Bacteria**. Springer, Berlin, p. 333–363, 2010.

GUO, J.; LIU, W.; ZHU, C.; LUO, G.; KONG, Y.; LING, N.; WANG, M.; DAI, J.; SHEN, Q.; GUO, S. Bacterial rather than fungal community composition is associated with microbial activities and nutrient-use efficiencies in a paddy soil with short-term organic amendments. **Plant and Soil**, v. 424, p. 335–349, 2018.

GUPTA, N.; TRIPATHI, S.; BALOMAJUMDER, C. Characterization of pressmud : A sugar industry waste. **Fuel**, v. 90, p. 389–394, 2011.

HAHN-HÄGERDA, B.; SENAC, T.; SKOOG, K. Ethanolic Fermentation of Pentoses in Lignocellulose Hydrolysates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 28/29, p. 131–143, 1991.

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.

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.

HIDZIR, N. S.; SOM, A. M.; ABDULLAH, Z. Ethanol Production via Direct Hydration of Ethylene : A review. **International Conference On Global Sustainability And Chemical Engineering**, 2014.

KAUR, G.; REDDY, M. S. Effects of phosphate-solubilizing bacteria, rock phosphate and chemical fertilizers on maize-wheat cropping cycle and economics. **Pedosphere**, v. 25, p. 428–437, 2015.

LAMBAIS, M. R.; CURRY, J. C.; MALUCHE-BARETTA, C. R.; BÜLL, R. C. Diversidade Microbiana nos Solos: Definindo novos paradigmas. **Tópicos em Ciência do Solo**, Viçosa, v. 4, p. 42–84, 2005.

LI, F.; CHEN, L.; ZHANG, J.; YIN, J.; HUANG, S. Bacterial community structure after long-term organic and inorganic fertilization reveals important associations between soil nutrients and specific taxa involved in nutrient transformations. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-12, 2017.

LIU, X.; REZAEI RASHTI, M.; DOUGALL, A.; ESFANDBOD, M.; VAN ZWIETEN, L.; CHEN, C. Subsoil application of compost improved sugarcane yield through enhanced supply and cycling of soil labile organic carbon and nitrogen in an acidic soil at tropical Australia. **Soil and Tillage Research**, v. 180, p. 73–81, 2018.

LOPES, C. M. **Produção de biofertilizantes orgânicos e organominerais a partir dos resíduos sólidos do setor sucroenergético**. 2017. Relatório (Pós Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Associação Brasileira de Potassa e do Fósforo, 1997. 319 p.

MARGENOT, A. J.; SOMMER, R.; MUKALAMA, J.; PARIKH, S. J. Biological P cycling is influenced by the form of P fertilizer in an Oxisol. **Biology and Fertility of Soils**, v. 53, p. 899–909, 2017.

MARSH, T. L. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): An emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 323–327, 1999.

MENDES, L. W.; TSAI, S. M.; NAVARRETE, A. A.; DE HOLLANDER, M.; VAN VEEN, J. A.; KURAMAE, E. E. Soil-Borne Microbiome: Linking Diversity to Function. **Microbial Ecology**, v. 70, p. 255–265, 2015.

MORAES, M. A. F. D.; BACCHI, M. R. P.; CALDARELLI, C. E. Biomass and Bioenergy Accelerated growth of the sugarcane , sugar , and ethanol sectors in Brazil (2000 e 2008): Effects on municipal gross domestic product per capita in the south-central region. **Biomass and Bioenergy journal**, v. 91, p. 116–125, 2016.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Ecologia do solo. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O., eds. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. UFLA, Minas Gerais, p.83–161, 2006.

MULLANEY, E. J.; ULLAH, A. H. J. Phytases: attributes, catalytic mechanisms and applications. In: TURNER, B. L.; RICHARDSON, A. E.; MULLANEY, E. J., eds. **Inositol phosphates: Linking Agriculture and the Environment**. CABI Publishing, Oxfordshire, UK, p. 97-110, 2007.

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.

NAKANISHI, S. C.; SOARES, L. B.; BIAZI, L. E.; NASCIMENTO, V. M.; COSTA, A. C.; ROCHA, G. J. M.; IENCZAK, J. L. Fermentation Strategy for Second Generation Ethanol Production From Sugarcane Bagasse Hydrolyzate by *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, p. 2211–2221, 2017.

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.

NAVARRETE, A. A.; DINIZ, T. R.; BRAGA, L. P. P.; SILVA, G. G. Z.; FRANCHINI, J. C.; ROSSETTO, R.; EDWARDS, R. A.; TSAI, S. M. Multi-analytical approach reveals potential microbial indicators in soil for sugarcane model systems. **PLoS ONE**, v. 10, p. 1–19, 2015.

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

OECD/FAO. **Oecd-fao agricultural outlook 2015-2024**: highlights, 2015.

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

OWEN, D.; WILLIAMS, A. P.; GRIFFITH, G. W.; WITHERS, P. J. A. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. **Applied Soil Ecology**, v. 86, p. 41–54, 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.

R CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2017. URL <https://www.R-project.org/>.

RAIJ, B. VAN; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Instituto Agrônômico de Campinas, Campinas, 2001. p.285.

RODRIGUES, M.; PAVINATO, P. S.; WITHERS, P. J. A.; TELES, A. P. B.; HERRERA, W. F. B. Legacy phosphorus and no tillage agriculture in tropical oxisols of the Brazilian savanna. **Science of the Total Environment**, v. 542, p. 1050–1061, 2016.

ROMÃO-DUMARESQ, A. S.; FRANCO, H. C. J.; BORGES, B. M. M. N.; BATISTA, B. D.; QUECINE, M. C. Beneficial microorganisms Associated with Sugarcane Crops: The Green Gold for Clean Energy. In: AZEVEDO, J. L.; QUECINE, M. C., eds. **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**. Springer, Dordrecht, p. 313–339, 2017.

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.

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.

SALLES-FILHO, S. L. M.; FELÍCIO, P.; CASTRO, D. De; BIN, A.; EDQUIST, C.; FLÁVIA, A.; FERRO, P.; CORDER, S. Perspectives for the Brazilian bioethanol sector : The innovation driver. **Energy Policy**, v. 108, p. 70–77, 2017.

SANTOS-BENEIT, F. The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–13, 2015.

SCHÜTTE, U. M. E.; ABDO, Z.; BENT, S. J.; WILLIAMS, C. J.; SCHNEIDER, G. M.; SOLHEIM, B.; FORNEY, L. J. Bacterial succession in a glacier foreland of the high Arctic. **International Society for Microbial Ecology Journal**, v. 3, p. 1258-1268, 2009.

SENGUPTA, A.; GUNRI, S. K.; BISWAS, T. Microbial Interactions and Plant Health. In: SINGH, D. P.; SINGH, H. B.; PRABHA, R., eds. **Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives**. Springer, Singapore, p. 61-83, 2017.

SHARMA, I. P.; CHANDRA, S.; KUMAR, N.; CHANDRA, D. PGPR: Heart of Soil and Their Role in Soil Fertility. In: MEENA, V. S.; MISHRA, P. K.; BISHT, J. K.; PATTANAYAK, A., eds. **Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture**. Springer, Singapore, p. 51-67, 2017.

SHARMA, S. B.; SAYYED, R. Z.; TRIVEDI, M. H.; GOBI, T. A. Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus**, v. 2, p. 1–14, 2013.

SILVA, V. S. G. da; OLIVEIRA, M. W. de; FERREIRA, V. M.; OLIVEIRA, T. B. A.; GALVÃO, E. R.; SILVA, A. F. da; MACHADO, P. A. S. Nutritional Requirement of Sugarcane Cultivars. **Journal of Agricultural Science**, v. 10, p. 361-369, 2018.

SOMAN, C.; LI, D.; WANDER, M. M.; KENT, A. D. Long-term fertilizer and crop-rotation treatments differentially affect soil bacterial community structure. **Plant and Soil**, v. 413, p. 145–159, 2017.

SUNDARA, B.; NATARAJAN, V.; HARI, K. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. **Field Crops Research**, v. 77, p. 43–49, 2002.

TABATABAI, M. A. Soil enzymes. In: WEAVER, R. W.; SCOTT, A.; BOTTOMELEY, P. J., eds. **Methods of soil analysis: microbiological and biochemical properties**. Madison, Soil Science Society of America Journal, v. 2, p. 778-835, 1994.

TELES, A. P. B.; RODRIGUES, M.; BEJARANO HERRERA, W. F.; 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.

VAL-MORAES, S. P.; DE MACEDO, H. S.; KISHI, L. T.; PEREIRA, R. M.; NAVARRETE, A. A.; MENDES, L. W.; DE FIGUEIREDO, E. B.; LA SCALA, N.; TSAI, S. M.; DE MACEDO LEMOS, E. G.; ALVES, L. M. C. Liming in the sugarcane burnt system and the green harvest practice affect soil bacterial community in northeastern São Paulo, Brazil. **International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 109, p. 1643–1654, 2016.

VIAN, C. E. F.; RODRIGUES, L.; DA SILVA, H. J. T. Evolution in Public Policies Designed to Develop the Sugar–Energy Industry in Brazil. In: CHANDEL, A. K.; SILVEIRA, M. H. L. (Ed.). **Advances in Sugarcane Biorefinery**. Elsevier, p. 279–306, 2018.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.; GELFAND, D.; SNINSKY, D.; WHITE, T., eds. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. Orlando, Academic Press, p. 315–322, 1990.

WITHERS, P. J. A.; RODRIGUES, M.; SOLTANGHEISI, A.; DE CARVALHO, T. S.; GUILHERME, L. R. G.; BENITES, V. D. M.; GATIBONI, L. C.; DE SOUSA, D. M. G.; 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.

ZHANG, L.; CHEN, W.; BURGER, M.; YANG, L.; GONG, P.; WU, Z. Changes in soil carbon and enzyme activity as a result of different long-term fertilization regimes in a greenhouse field. **PLoS ONE**, v. 10, p. 1–13, 2015.

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.

ZHU, J.; LI, M.; WHELAN, M. Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. **Science of the Total Environment**, v. 612, p. 522–537, 2018.

ANEXOS

ANEXO 1. Atributos químicos do solo nos dois períodos de coleta.

Período	pH	Corg	H + Al	K	Ca	Mg	P	Mn	Zn
		g kg ⁻¹	-----mmolc kg ⁻¹ -----					-----mg kg ⁻¹ -----	
6 meses	5,5 A	5,9 A	12,3 B	3,0 A	12,5 A	4,6 A	44,5 A	13,0 A	0,1 B
12 meses	5,4 B	4,5 B	13,1 A	3,4 A	10,8 A	4,8 A	13,9 B	7,3 B	0,5 A

Corg: carbono orgânico. Médias seguidas por letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% (p≤0,05). Adaptado de Lopes (2017).

APÊNDICE A. Características químicas do composto no final do processo de compostagem.

Composição	pH	Corg	N	P	K	Ca	Mg	S	C/N	C/P
-----g kg ⁻¹ -----										
TF + cinzas	7,90	116,63	8,11	15,70	5,63	31,46	3,55	2,65	14	7
TF + cinzas +FA	7,90	99,30	8,76	13,90	4,16	26,45	2,74	1,84	11	7
TF + cinzas +FB	8,40	145,76	9,88	14,80	5,63	26,68	4,05	2,46	15	10

TF: torta de filtro; FA: fosfato de Araxá; FB: fosfato de Bayóvar; pH: potencial hidrogeniônico; Corg: carbono orgânico; N: nitrogênio; P: fósforo; K: potássio; Ca: cálcio; Mg: magnésio; S: enxofre; C/N: relação carbono/nitrogênio; C/P: relação carbono/fósforo. Fonte: Adaptado de Lopes (2017).

APÊNDICE B. Valores do teste F e significância para a atividade enzimática no solo para os períodos de amostragem (seis e 12 meses) considerando o fator fonte de fósforo (composto, composto + fosfato de Araxá e composto + fosfato de Bayóvar), inoculação de bactérias solubilizadoras de fósforo (com e sem) e o adicional mineral (controle).

Fonte de variação	Fosfatase ácida	Fosfatase alcalina	β-Glucosidase	Fitase
6 meses				
Fonte de P (F)	1,51 ^{ns}	4,21 ^{**}	1,73 ^{ns}	6,23 ^{***}
Inoculação (I)	7,93 ^{**}	0,54 ^{ns}	1,50 ^{ns}	13,53 ^{***}
Fatorial (F x I)	10,26 ^{***}	6,31 ^{***}	5,51 ^{**}	0,54 ^{ns}
Adicional*(F x I)	0,00 ^{ns}	1,57 ^{ns}	1,20 ^{ns}	12,43 ^{***}
CV (%)	10,37	25,06	10,39	2,87
12 meses				
Fonte de P (F)	16,98 ^{***}	10,05 ^{***}	9,61 ^{***}	9,51 ^{***}
Inoculação (I)	1,80 ^{ns}	40,54 ^{***}	0,17 ^{ns}	0,07 ^{ns}
Fatorial (F x I)	6,54 ^{***}	8,70 ^{***}	6,33 ^{***}	0,83 ^{ns}
Adicional*(F x I)	3,43 [*]	3,10 [*]	44,59 ^{***}	0,68 ^{ns}
CV (%)	9,19	18,26	14,71	2,87

ns: não significativo; ***: $p \leq 0,01$; **: $p \leq 0,05$; *: $p \leq 0,1$; CV: coeficiente de variação.

APÊNDICE C. Valores médios de atividade enzimática no solo nos períodos de amostragem (seis e 12 meses).

Tratamento	Fosfatase ácida	Fosfatase alcalina	β -Glucosidase	Fitase
	$\mu\text{g PNF.g}^{-1} \text{ solo.h}^{-1}$		$\mu\text{g PNG.g}^{-1} \text{ solo.h}^{-1}$	$\text{mg Pi. ml}^{-1} \text{ solo.g}^{-1}$
6 meses				
Fonte de P (F)				
C	*	*	*	0,108 B
FA	*	*	*	0,113 A
FB	*	*	*	0,109 B
Inoculação (I)				
Com	*	*	*	0,108 B
Sem	*	*	*	0,112 A
Fatorial (F x I)	74,19 A	42,43 A	18,62 A	0,110 A
Adicional	74,38 A	35,40 A	19,78 A	0,104 B
12 meses				
Fonte de P (F)				
C	*	*	*	0,111 A
FA	*	*	*	0,104 B
FB	*	*	*	0,104 B
Inoculação (I)				
Com	*	*	*	0,106 A
Sem	*	*	*	0,106 A
Fatorial (F x I)	81,73 b	32,74 a	13,41 A	0,106 A
Adicional	89,35 a	27,20 b	6,95 B	0,108 A
6 meses				
DMS (F)	*	*	*	0,01
DMS (I)	*	*	*	0,00
DMS (Adicional*(F x I))	18,01	24,24	4,56	0,01
12 meses				
DMS (F)	*	*	*	0,01
DMS (I)	*	*	*	0,00
DMS (Adicional*(F x I))	17,78	13,62	4,38	0,01

*Interação Fonte x Inoculação (F x I) desdobrada nos gráficos nos resultados e discussão. C: composto; FA: composto + fosfato de Araxá; FB: composto + fosfato de Bayóvar; Adicional: superfosfato triplo. Médias seguidas por letras iguais não diferem pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam médias a 5% ($p \leq 0,05$) e minúsculas a 10% ($p \leq 0,1$). DMS: Diferença mínima significativa.

APÊNDICE D. Valores médios para a atividade enzimática no solo considerando a diferença entre os períodos de amostragem (seis e 12 meses).

Período de amostragem	Fonte de P		
	C	FA	FB
Fosfatase ácida ($\mu\text{g PNF.g}^{-1} \text{ solo.h}^{-1}$)			
Com inoculação			
6 meses	88,52 A	79,04 A	68,88 A
12 meses	96,02 A	71,71 A	71,20 A
Sem inoculação			
6 meses	66,91 B	63,01 A	79,93 A
12 meses	90,20 A	70,18 A	91,07 A
Fosfatase alcalina ($\mu\text{g PNF.g}^{-1} \text{ solo.h}^{-1}$)			
Com inoculação			
6 meses	48,90 A	38,82 A	34,90 A
12 meses	43,17 A	49,41 A	28,37 A
Sem inoculação			
6 meses	35,03 A	61,55 A	35,37 A
12 meses	17,98 B	30,75 B	26,74 A
β-Glucosidase ($\mu\text{g PNG.g}^{-1} \text{ solo.h}^{-1}$)			
Com inoculação			
6 meses	17,37 A	17,76 A	19,27 A
12 meses	15,58 A	14,75 B	11,26 B
Sem inoculação			
6 meses	21,89 A	17,99 A	17,45 A
12 meses	16,55 B	10,65 B	13,43 B
Fitase ($\text{mg Pi.ml}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ solo}$)			
Com inoculação			
6 meses	0,105 B	0,111 A	0,107 A
12 meses	0,113 A	0,103 B	0,103 A
Sem inoculação			
6 meses	0,111 A	0,115 A	0,111 A
12 meses	0,109 A	0,104 B	0,104 B

C: composto; FA: composto + fosfato de Araxá; FB: composto + fosfato de Bayóvar. Médias seguidas por letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% ($p \leq 0,05$). Letras maiúsculas comparam os períodos de amostragem (seis e 12 meses) para cada fonte de fósforo com ou sem inoculação.

APÊNDICE E. Valores do teste F e significância para o número de cópias de genes no solo para os períodos de amostragem (seis e 12 meses) considerando o fator fonte de fósforo (composto, composto + fosfato de Araxá e composto + fosfato de Bayóvar), inoculação de bactérias solubilizadoras de fósforo (com e sem) e o adicional mineral (controle).

Fonte de variação	16S	ITS	phoD
6 meses			
Fonte de P (F)	0,26 ^{ns}	0,26 ^{ns}	0,42 ^{ns}
Inoculação (I)	2,38 ^{ns}	15,98 ^{***}	0,47 ^{ns}
Fatorial (F x I)	4,55 ^{**}	0,03 ^{ns}	1,43 ^{ns}
Adicional*(F x I)	0,46 ^{ns}	5,77 ^{**}	0,08 ^{ns}
CV (%)	0,85	2,84	2,82
12 meses			
Fonte de P (F)	1,31 ^{ns}	1,45 ^{ns}	0,43 ^{ns}
Inoculação (I)	8,90 ^{***}	0,05 ^{ns}	0,46 ^{ns}
Fatorial (F x I)	2,93 [*]	0,37 ^{ns}	0,48 ^{ns}
Adicional*(F x I)	1,91 ^{ns}	0,09 ^{ns}	1,65 ^{ns}
CV (%)	0,63	3,46	2,07

ns: não significativo; ***: $p \leq 0,01$; **: $p \leq 0,05$; *: $p \leq 0,1$; CV: coeficiente de variação.

APÊNDICE F. Valores médios do número de cópias de genes no solo nos períodos de amostragem (seis e 12 meses).

Tratamento	ITS	16 S	phoD
	Log (cópias do gene) g ⁻¹		
6 meses			
Fonte de P (F)			
C	6,17 A	*	6,62 A
FA	6,12 A	*	6,68 A
FB	6,11 A	*	6,71 A
Inoculação (I)			
Com	5,99 B	*	6,64 A
Sem	6,28 A	*	6,69 A
Fatorial (F x I)	6,13 A	*	6,67 A
Adicional	5,91 B	*	6,64 A
12 meses			
Fonte de P (F)			
C	6,02 A	9,72 A	6,63 A
FA	5,95 A	9,68 A	6,63 A
FB	5,85 A	9,68 A	6,69 A
Inoculação (I)			
Com	5,95 A	9,66 B	6,63 A
Sem	5,93 A	9,73 A	6,67 A
Fatorial (F x I)	5,94 A	9,69 A	6,65 A
Adicional	5,97 A	6,65 A	6,75 A
6 meses			
DMS (F)	0,31	-	0,34
DMS (I)	0,26	-	0,28
DMS (Adicional*(F x I))	0,40	-	0,44
12 meses			
DMS (F)	0,37	0,11	0,25
DMS (I)	0,30	0,09	0,20
DMS (Adicional*(F x I))	0,48	0,14	0,32

*Interação Fonte x Inoculação (F x I) desdobrada nos gráficos nos resultados e discussão. C: composto; FA: composto + fosfato de Araxá; FB: composto + fosfato de Bayóvar; Adicional: superfosfato triplo. Médias seguidas por letras iguais não diferem pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam médias a 5% ($p \leq 0,05$). DMS: Diferença mínima significativa.

APÊNDICE G. Valores médios para número de cópias de genes no solo considerando a diferença entre os períodos de amostragem (seis e 12 meses).

Período de amostragem	Fonte de P (F)		
	C	FA	FB
Abundância de 16S (Log cópias do gene 16S RNAr g⁻¹)			
<i>Com inoculação</i>			
6 meses	9,85 A	9,75 A	9,76 A
12 meses	9,70 A	9,67 A	9,75 A
<i>Sem inoculação</i>			
6 meses	9,75 A	9,87 A	9,90 A
12 meses	9,74 A	9,69 A	9,60 A
Abundância de ITS (Log cópias do gene ITS g⁻¹)			
<i>Com inoculação</i>			
6 meses	6,02 A	5,98 A	6,25 A
12 meses	6,02 A	5,92 A	5,79 A
<i>Sem inoculação</i>			
6 meses	6,32 A	6,26 A	5,98 A
12 meses	6,01 A	5,98 A	5,90 A
Abundância de phoD (Log cópias do gene phoD g⁻¹)			
<i>Com inoculação</i>			
6 meses	6,61 A	6,72 A	6,82 A
12 meses	6,64 A	6,62 A	6,74 A
<i>Sem inoculação</i>			
6 meses	6,63 A	6,63 A	6,59 A
12 meses	6,62 A	6,64 A	6,63 A

C: composto; FA: composto + fosfato de Araxá; FB: composto + fosfato de Bayóvar. Médias seguidas por letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% ($p \leq 0,05$). Letras maiúsculas comparam os períodos de amostragem (seis e 12 meses) para cada fonte de fósforo com ou sem inoculação.

APÊNDICE H. Valores das correlações de ANOSIM (R-valor) obtidas nas matrizes de distância de Bray-Curtis para os eletroferogramas dos fragmentos de restrição terminal (T-RFLP) do gene 16S RNAr e entre as épocas de amostragem (seis e 12 meses) em solo cultivado com cana-de-açúcar sob aplicação de composto sem inoculação (C), composto com inoculação (C+I), composto enriquecido com fosfato de Araxá sem inoculação (FA), composto enriquecido com fosfato de Araxá com inoculação (FA+I), composto enriquecido com fosfato de Bayóvar sem inoculação (FB), composto enriquecido com fosfato de Bayóvar com inoculação (FB+I) e no tratamento adicional adubado com superfosfato triplo (M).

		C	C+I	FA	FA+I	FB	FB+I	M
6 meses	C	0						
	C+I	0,36 **	0					
	FA	0,25 *	0,07 ^{ns}	0				
	FA+I	0,45 **	0,18 ^{ns}	-0,11 ^{ns}	0			
	FB	0,23 *	0,04 ^{ns}	-0,13 ^{ns}	-0,01 ^{ns}	0		
	FB+I	0,09 ^{ns}	0,02 ^{ns}	-0,09 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0	
	M	0,04 ^{ns}	0,09 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,11 ^{ns}	0,07 ^{ns}	-0,11 ^{ns}	0
		C	C+I	FA	FA+I	FB	FB+I	M
12 meses	C	0						
	C+I	-0,01 ^{ns}	0					
	FA	-0,09 ^{ns}	-0,18 ^{ns}	0				
	FA+I	-0,04 ^{ns}	0,09 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	0			
	FB	-0,04 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,01 ^{ns}	-0,13 ^{ns}	0		
	FB+I	-0,16 ^{ns}	0,04 ^{ns}	-0,13 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	-0,17 ^{ns}	0	
	M	0,20 ^{ns}	0,19 *	-0,18 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0
		C	C+I	FA	FA+I	FB	FB+I	M
6 meses	C	0,38 **						
	C+I		0,35 **					
	FA			0,28 **				
	FA+I				0,27 *			
	FB					0,38 **		
	FB+I						0,25 *	
	M							0,84 **

ns: não significativo; **: $p \leq 0,05$; *: $p \leq 0,1$.

APÊNDICE I. Análise de redundância baseada em distância com base nos perfis de T-RFLP do gene 16S RNAr e atributos químicos e biológicos do solo.

Eixos canônicos	F	<i>p</i> -valor
6 e 12 meses		
Modelo	1,78	0,001
Variáveis do modelo	6 e 12 meses	
Fosf.ácida	1,56	0,194
Fosf.alcalina	3,43	0,012
16S RNAr	9,58	0,001
ITS	0,98	0,450
phoD	2,33	0,066
pH	0,40	0,815
Corg	3,84	0,007
S	1,33	0,261
Zn	1,05	0,373
P lábil	3,26	0,019
P mod. lábil	1,09	0,336
P não lábil	0,44	0,776

Corg: carbono orgânico; P.lábil: fósforo lábil; P mod. Lábil: fósforo moderadamente lábil; P não lábil: fósforo não lábil.

APÊNDICE J. Valores das correlações de ANOSIM (R-valor) obtidas nas matrizes de distância de Bray-Curtis para os eletroferogramas dos fragmentos de restrição terminal (T-RFLP) do gene ITS e entre as épocas de amostragem (seis e 12 meses) em solo cultivado com cana-de-açúcar sob aplicação de composto sem inoculação (C), composto com inoculação (C+I), composto enriquecido com fosfato de Araxá sem inoculação (FA), composto enriquecido com fosfato de Araxá com inoculação (FA+I), composto enriquecido com fosfato de Bayóvar sem inoculação (FB), composto enriquecido com fosfato de Bayóvar com inoculação (FB+I) e no tratamento adicional adubado com superfosfato triplo (M).

		C	C+I	FA	FA+I	FB	FB+I	M
6 meses	C	0						
	C+I	0,09 ^{ns}	0					
	FA	-0,08 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0				
	FA+I	-0,10 ^{ns}	0,15 ^{ns}	-0,04 ^{ns}	0			
	FB	-0,01 ^{ns}	0,41 [*]	0,09 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0		
	FB+I	-0,03 ^{ns}	0,11 ^{ns}	-0,09 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0	
	M	0,14 ^{ns}	0,51 ^{**}	-0,03 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,26 [*]	0,11 ^{ns}	0
		C	C+I	FA	FA+I	FB	FB+I	M
12 meses	C	0						
	C+I	-0,08 ^{ns}	0					
	FA	0,01 ^{ns}	0,15 ^{ns}	0				
	FA+I	-0,07 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0			
	FB	0,00 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,15 ^{ns}	-0,02 ^{ns}	0		
	FB+I	-0,17 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	-0,13 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0	
	M	-0,03 ^{ns}	0,21 [*]	-0,10 ^{ns}	-0,01 ^{ns}	0,19 ^{ns}	0,06	0
		C	C+I	FA	FA+I	FB	FB+I	M
6 meses	C	-0,03 ^{ns}						
	C+I		0,23 ^{ns}					
	FA			0,15 ^{ns}				
	FA+I				-0,09 ^{ns}			
	FB					0,18 ^{ns}		
	FB+I						-0,08 ^{ns}	
	M							0,15 ^{ns}

ns: não significativo; **: $p \leq 0,05$; *: $p \leq 0,1$.

APÊNDICE K. Análise de redundância baseada em distância com base nos perfis de T-RFLP do gene ITS RNAr e atributos químicos e biológicos do solo.

Eixos canônicos	F	p-valor
6 e 12 meses		
Modelo	1,20	0,048
Variáveis do modelo	6 e 12 meses	
Fosf.ácida	0,29	0,936
Fosf.alcalina	0,84	0,511
16S RNAr	2,35	0,050
ITS	0,96	0,388
phoD	3,10	0,012
pH	1,18	0,270
Corg	3,51	0,006
P lábil	0,56	0,745
P mod. lábil	0,58	0,701
P não lábil	0,87	0,448

Corg: carbono orgânico; P.lábil: fósforo lábil; P mod. Lábil: fósforo moderadamente lábil; P não lábil: fósforo não lábil.