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

**Correlações entre as frações de fósforo do solo e o microbioma rizosférico
da cana-de-açúcar**

Diogo Paes da Costa

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

**Piracicaba
2017**

Diogo Paes da Costa
Engenheiro Agrônomo

Correlações entre as frações de fósforo do solo e o microbioma rizosférico da cana-de-açúcar

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr-6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **FERNANDO DINI ANDREOTE**

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

Piracicaba
2017

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

Costa, Diogo Paes da

Correlações entre as frações de fósforo do solo e o microbioma rizosférico da cana-de-açúcar / Diogo Paes da Costa. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.
119 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Fósforo 2. Solubilização 3. Rizosfera 4. Diversidade 5. Ecologia microbiana I. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Antônio & Maria,
pela educação e exemplos na minha vida.

Aos meus irmãos, Bruno & Luana,
pelo bom convívio e união em todos os momentos.

À minha companheira de todas as horas, Vanessa
pelo total apoio e por tantos momentos especiais concedidos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Gratidão a D'us!

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, em especial ao departamento de Ciência do Solo, pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação em Ciências.

À coordenação do programa de pós-graduação em Solos e Nutrição de Plantas da ESALQ, por toda instrução.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

Ao professor Dr. Fernando Dini Andreote, pela orientação e oportunidade de realização deste e de outros trabalhos desde o curso de Mestrado. A minha gratidão!

Ao professor Dr. Paulo Sergio Pavinato junto com toda sua equipe, em especial à Bruna Arruda, a Marcos Rodrigues e a Valdevan Rosendo, pelo total apoio durante as etapas experimentais do meu projeto de doutorado. A minha Gratidão!

À professora Dra. Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso, pelo pioneirismo nos trabalhos de microbiologia do solo, dando oportunidades a muitos alunos que passaram pelo Laboratório de Microbiologia do Solo da ESALQ. A minha Gratidão!

À Denise Mescolotti e a Luís Fernando Baldesin pelo grande apoio e excelente trabalho que fazem no Laboratório de Microbiologia do Solo. A minha Gratidão!

Agradeço também aos colegas do Lab. e aos demais amigos na ESALQ que, de algum modo, colaboraram com a minha passagem em Piracicaba, pela Gloriosa ESALQ e para a conclusão dos meus trabalhos nos cursos de Mestrado e Doutorado, registrando aqui alguns desses nomes: Ademir Durrer (Dema), que me ensinou muito na minha estadia em Piracicaba, Adjailton de Souza, Alessandra Rigoto, Alex nunes, Armando Cavalcante, Arthur Prudêncio, Danielle Santos, Danilo Camelo, Diego Sevastian, Dorotéia Alves, Fábio Soares (é o Dig), German Estrada, Joice Bonfim, Júlia Lima, Juliana Eschholz, Luana Lira, Marcos Vinícius (Polé), Maurício Zagatto, Maria Fernanda, Michele Silva, Pedro Avelino, Simone Cotta, Sonia Pires, Tiago Gumiere e aos demais colegas que, talvez, não tenha me recordado dos nomes.

A Hélio Henrique Soares Franco (Chaver), grande amigo com quem tive o privilégio de conviver, pelo grande apoio durante o Doutorado.

À minha família pelo porto seguro e pelos mais variados motivos desse mundo. Eterna gratidão!

Por fim, a todos os que agregaram valores e ensinamentos diversos nessa minha jornada.

Obrigado a todos vocês!

EPÍGRAFE

*“ Eu sou a terra, eu sou a vida.
Do meu barro primeiro veio o homem.
De mim veio a mulher e veio o amor.
Veio a árvore, veio a fonte.
Vem o fruto e vem a flor. ”*

(O cântico da terra, Cora Coralina)

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	14
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Fósforo na cultura da cana-de-açúcar	17
1.2. Dinâmica do fósforo no solo	18
1.3. Fracionamento do fósforo do solo	19
1.4. Disponibilidade de fósforo e atividade biológica	19
1.5. Bioquímica da solubilização do P no solo e abordagens moleculares	21
Referências	23
2. JUSTIFICATIVA	29
3. HIPÓTESE	31
4. OBJETIVOS	33
4.1. Objetivo geral	33
4.2. Objetivos específicos	33
5. FRAÇÕES DE P EM SOLOS CULTIVADOS COM CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZANDO DIFERENTES FONTES FOSFATADAS	35
Resumo	35
Abstract	35
5.1. Introdução	36
5.2. Material e métodos	37
5.2.1. Descrição dos microcosmos: preparo do solo e propagação das plântulas	37
5.2.2. Preparo e delineamento do experimento	38
5.2.3. Coletas do material vegetal e das rizosferas	39
5.2.4. Determinação do N foliar	39
5.2.5. Determinação do P foliar	40
5.2.6. Análise de fracionamento de fósforo	40

5.2.7. Análises estatísticas.....	42
5.3. Resultados	42
5.3.1. Crescimento das plantas e acúmulo de nutrientes	42
5.3.2. Frações de P geoquímico.....	45
5.3.3. Frações de P biológico	50
5.3.4. P total e divisões quanto a labilidade e estado orgânico	51
5.3.5. Relações entre o desenvolvimento vegetal e os teores de P nas frações	54
5.4. Discussão.....	56
5.4.1. Relações entre desenvolvimento vegetal e os teores foliares dos nutrientes.....	56
5.4.2. Efeitos das fontes de P e da torta de filtro sobre as frações de fósforo no solo	59
5.4.3. Considerações quanto ao estado de labilidade e origem orgânica das frações.....	67
5.4.4. Relações entre desenvolvimento vegetal, teores nutricionais e frações de P	68
5.5. Conclusões	68
Referências	69
6. EFEITO DA ADUBAÇÃO FOSFATADA SOBRE A DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS RIZOSFÉRICAS DA CANA-DE-AÇÚCAR	77
Resumo.....	77
Abstract	77
6.1. Introdução	78
6.2. Material e métodos	79
6.2.1. Descrição do estudo	79
6.2.2. Extrações de DNA total do solo rizosférico	80
6.2.3. Análise da estrutura microbiana por TRFLP.....	80
6.2.4. Sequenciamento da região V6 do gene 16S rDNA	81
6.2.5. Análises estatísticas multivariadas e de bioinformática	81
6.3. Resultados	82
6.3.1. Efeitos das fontes de P sobre a estrutura bacteriana da rizosfera	82
6.3.2. Diversidade microbiana por inferência do gene 16S rDNA.....	84
6.3.3. Abundâncias dos principais grupos bacterianos em função do tempo	86
6.3.4. Abundâncias dos grupos bacterianos em função dos tratamentos.....	87

6.3.5. Relações dos grupos bacterianos com o desenvolvimento das plantas	91
6.3.6. Correlações dos grupos bacterianos com as frações de P na rizosfera	94
6.3.7. Predições metagenômicas com base no gene 16S rRNA	96
6.4. Discussão	102
6.5. Conclusões.....	109
Referências	110
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	119

RESUMO

Correlações entre as frações de fósforo do solo e o microbioma rizosférico da cana-de-açúcar

O fósforo é um elemento-chave para a manutenção da vida, desde os processos de transferência energética (ATP) até a estruturação das cadeias de ácidos nucleicos. Frequentemente é o que mais limita o desenvolvimento vegetativo em função da alta reatividade do PO_4^{3-} na solução do solo. Mais de 80% do P adicionado ao solo pode ser imobilizado na forma de compostos de baixa labilidade, adsorvendo-se as superfícies das argilas e dos oxidróxidos de Fe^{3+} e Al^{3+} , processo irreversível em condições naturais. A solubilização do P não lábil às plantas é possível mediante a liberação de ácidos orgânicos sintetizados por micro-organismos nativos do solo, os quais também contribuem efetivamente com a mineralização do P orgânico através da produção de enzimas (fosfatases), entretanto, esses mecanismos ainda são pouco conhecidos. O principal objetivo desse estudo foi correlacionar as possíveis mudanças nas frações orgânicas (Po) e inorgânicas (Pi) de fósforo no solo rizosférico de plantas de cana-de-açúcar com a estrutura e a diversidade do seu microbioma. Para tanto, as plantas foram cultivadas durante 180 dias em diferentes microcosmos com fosfato monoamônico (MAP), superfosfato triplo (SFT) e fosfato natural reativo (NAT), tanto na ausência quanto na presença da torta de filtro. As diferentes frações de fósforo no solo rizosférico foram correlacionadas com os dados moleculares baseados no sequenciamento parcial dos amplicons do gene 16S rRNA obtidos do DNA total extraído desses solos. Aos 60 dias, houve uma maior diversidade geral de bactérias, sendo um período com altos teores de P-lábil na rizosfera, beneficiando principalmente as bactérias de hábitos copiotróficas (r-estrategistas): divisão Halophaga/Acidobacterium, Chloracidobacteria e Bacilli. A diminuição da diversidade aos 120 dias ocorreu como resposta da redução dos teores de P-lábil na rizosfera, beneficiando mais as bactérias oligotróficas (k-estrategistas): Actinobacteria e Proteobacterias. A associação da torta de filtro com o MAP revelou fortes indícios do aumento do processo de mineralização na superfície do solo, uma vez que houve rápida liberação de P lábil para a rizosfera. Isso teria aumentado a atividade de micro-organismos envolvidos na mineralização da torta de filtro, havendo forte correlação com o aumento da população de β -Proteobacteria aos 120 dias. Neste período, as Proteobacterias foram mais abundantes nos solos com NAT+torta. Isso explicaria o incremento de P moderadamente lábil desse tratamento aos 180 dias, pois esse filo possui várias espécies capazes de solubilizar o P ligado ao Ca, presente nos fosfatos de rocha. No geral, a torta de filtro alterou a solubilização e disponibilidade do P nas fontes minerais de modo diferente, contribuindo com os incrementos tanto das frações de Po como as de Pi. Esses resultados demonstraram que as bactérias participam ativamente dos processos de disponibilização do P de fontes minerais no solo. Nessas condições, a torta de filtro pode modular essas transferências, em benefício às plantas, por estimular a atividade de micro-organismos solubilizadores de P e mineralizadores da matéria orgânica do solo.

Palavras-chave: Fósforo; Solubilização; Rizosfera; Diversidade; Ecologia microbiana

ABSTRACT

Correlations between the phosphorus fractions of soil and rhizosphere microbiome of sugarcane

Phosphorus is a key element for the maintenance of life from the energy transfer processes (ATP) to the structuring of chains of nucleic acids. Often, it is more limited vegetative growth due to the high reactivity of PO_4^{3-} in the soil solution. Up to 80% of P added to the soil can be immobilized as low-labile compounds adsorbing to the clay surfaces and oxy-hydroxides of Fe^{3+} and Al^{3+} , irreversible process under natural conditions. Solubilization of non-labile P by plants may be carried out for organic acids synthesized by native soil microorganisms, which also effectively contribute for mineralization of organic P through the production of enzymes (phosphatases) although these mechanisms are still poorly understood. The main objective of this study was to correlate the changes in the organic (Po) and inorganic (Pi) fractions of P in the rhizosphere of sugarcane plants with the structure and diversity in their microbiome. Therefore, the plants were grown for 180 days in different microcosms with monoammonium phosphate (MAP), triple superphosphate (TSP) and rock phosphate (NAT), both in absence and in presence of the filter cake. The different P fractions in the rhizosphere soil were correlated with the molecular data based on the partial sequencing of 16S rRNA gene amplicons obtained from total DNA extracted from soils. At 60 days, there was a greater overall diversity of bacteria, it is a period with high labile-P in the rhizosphere, especially benefiting the copiotrophic bacteria (r-strategists): Halophaga/Acidobacterium division, Chloracidobacteria and Bacilli. The decrease in diversity at 120 days occurred in response to the reduction of labile-P content in the rhizosphere, more benefiting oligotrophic bacteria (k-strategists): Actinobacteria and Proteobacteria. The association filter cake with MAP showed strong evidence of increased mineralization process on the soil surface, since there was rapid release of labile P to the rhizosphere. It would have increased the activity of microorganisms involved in the mineralization of the filter cake with a strong correlation with increase in β -Proteobacteria population at 120 days. Then, Proteobacteria were more abundant in soils with NAT+filtercake at 120 days. That would explain the increases in moderately labile P content this treatment at 180 days, because this phylum has several species capable of solubilizing the P linked to Ca present in rock phosphates. In general, filter cake changed solubilization and availability of P in mineral sources of different ways, contributing to the increments of Po and Pi fractions. These results showed that bacteria participate in the processes that afford phosphorus in the soil. Under these conditions, the filter cake can modulate these transfers in beneficial to plants by stimulating the activity of P solubilizing microorganisms and mineralizing the soil organic matter.

Keywords: Phosphor; Solubilization; Rhizosphere; Diversity; Microbial ecology

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Imagem do experimento em casa de vegetação na primeira semana após o plantio das mudas de cana-de-açúcar nos vasos (variedade RB86-7515)..... 38
- Figura 2 - Composição dos teores de P_{total} no solo rizosférico de cana-de-açúcar após 2, 4 e 6 meses de cultivo. As classificações foram de acordo com a origem e formação das frações, proposto por Cross & Schlesinger (1995) (A); e com o estado de labilidade, proposto por Hedley, Stewart e Chauhan (1982) (B). 1) Origem das frações de P: P biológico (P_{bio}) e de P geoquímico (P_{geo}); 2) Estado de labilidade: P lábil (P.L); P moderadamente-lábil (P.ML) e P não-lábil (P.NL). 3) Fontes minerais: Fosfato Monoamônico (MAP); Superfosfato Triplo (SFT); Fosfato Natural Reativo de GAFSA (NAT); e testemunhas - sem fontes minerais (T ou sem), ambos testados na ausência (ST) e presença (CT) da torta de filtro. 52
- Figura 3- Análise de Correlações Canônicas (CCA) dos dados de massa seca (Ms) e dos teores de nitrogênio (N) e fósforo (P) foliar com as frações de P na rizosfera de cana-de-açúcar cultivada durante 2 (A), 4 (B) e 6 (C) meses. Tratamentos: fosfato monoamônico (MAP); superfosfato triplo (SFT); fosfato natural reativo de Gafsa (NAT); e testemunha (T), ambos testados na ausência (ST) e na presença (CT) da torta de filtro. Frações orgânica (Po) e inorgânicas (Pi) de P com diferentes estados de labilidade foram acessadas pelo uso sequencial de reagentes com poder extrator crescente: 1) P lábil - Resina de Troca de Ânions (RTA) e $NaHCO_3$ (BIC); 2) P moderadamente-lábil - $NaOH$ 0,1 mol L⁻¹ (NaOH.01) e HCl 0,1 mol L⁻¹ (HCL); e 3) P não-lábil - $NaOH$ 0,5 mol L⁻¹ (NaOH.05) e $H_2SO_4 + H_2O_2$ (P residual - RES). 55
- Figura 4 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA) mostrando diferenciações entre as comunidades de bactérias rizosféricas de cana-de-açúcar aos 2 (A), 4 (B) e 6 meses (C) após plantio com os tratamentos: sem fontes minerais (Testemunha); fosfato monoamônico (MAP); superfosfato triplo (SFT); e fosfato natural reativo (NAT) - sem (ST) e com torta de filtro (CT). Dados baseados na análise de TRFLP. . 83
- Figura 5 - Alteração da Alfa-diversidade na rizosfera da cana-de-açúcar aos 2 (A), 4 (B) e 6 (C) meses após plantio em resposta aos tratamentos: sem fontes minerais (Control ou T); fosfato monoamônico (MAP); superfosfato triplo (SFT); e fosfato natural reativo (NAT) - sem (ST) e com torta de filtro (CT). A diversidade foi quantificada pelo índice de Shannon (H') com base nas UTOs encontradas a 97% de similaridade. 85
- Figura 6 - Composição geral das comunidades bacterianas na rizosfera aos 2 (A), 4 (B) e 6 (C) meses após os plantios das mudas de cana-de-açúcar. A estruturas em network referentes aos 2 e 4 meses refletem uma maior complexidade de interações em virtude da maior diversidade de grupos existentes em comparação a estrutura do quarto mês..... 87
- Figura 7 - Abundância total das principais classes bacterianas associadas às rizosféricas de cana-de-açúcar aos 2 (A), 4 (B) e 6 meses (C) após o plantio e tratamentos com: fosfato monoamônico (MAP); superfosfato triplo (SFT); fosfato natural reativo (NAT); e testemunha (Control ou T); ambos testados com (CT) e sem (ST) a torta de filtro. *Valores nos eixos das ordenadas estão em número absoluto (UTOs). 88

- Figura 8 - Abundância relativa das 20 principais classes bacterianas encontradas na rizosfera de cana-de-açúcar aos 2, 4 e 6 meses após plantio. A mudança na composição das classes foi comparada com o Bulk Soil (esquerda) - solo antes dos tratamentos com as fontes de fósforo: fosfato monoamônico (MAP); superfosfato triplo (SFT); fosfato natural reativo (NAT); testemunha (Control ou T); COM torta de filtro (CT); e SEM torta de filtro (ST).90
- Figura 9 - Análise de Correlações Canônicas (CCA) da massa seca (Ms) e dos teores nitrogênio (N) e fósforo (P) foliar com as classes bacterianas mais abundantes na rizosfera de cana-de-açúcar aos 2 (A), 4 (B) e 6 (C) meses após plantio. Tratamentos: fosfato monoamônico (MAP); superfosfato triplo (SFT); fosfato Natural Reativo (NAT); e testemunha (T); COM (CT) e sem (ST) torta de filtro.92
- Figura 10 - Análises de Correlações Canônicas (CCA) entre as frações orgânicas (Po) e inorgânicas (Pi) de P com as classes bacterianas mais abundantes nas rizosferas de cana-de-açúcar aos 2 (A), 4 (B) e 6 (C) meses após o plantio com diferentes fontes de P: fosfato monoamônico (MAP); superfosfato triplo (SFT); fosfato Natural Reativo (NAT); e testemunha; COM (CT) e sem (ST) torta de filtro. Frações de P com diferentes estados de labilidade foram acessadas pelo uso sequencial de reagentes com poder extrator crescente: 1) P-lábil - Resina de Troca de Ânions (RTA) e NaHCO_3 (BIC); 2) P-moderadamente-lábil - NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (NaOH.01) e HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (HCL); 3) P-não-lábil - NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (NaOH.05) e $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ (P residual - PRES).95
- Figura 11 - Análise de Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS) mostrando diferenças nos perfis funcionais das comunidades bacterianas da rizosfera de cana-de-açúcar aos 2 (A), 4 (B) e 6 meses (C) após plantio com os tratamentos: sem fontes minerais (Testemunha); fosfato monoamônico (MAP); superfosfato triplo (SFT); e fosfato natural reativo (NAT) - sem (ST) e com torta de filtro (CT). Os valores de estresse indicam a precisão no ajuste da ordenação: $0,1 \leq \text{Stress} \leq 0,2$ - razoável; $0,05 \leq \text{Stress} \leq 0,1$ - bom; $\text{Stress} < 0,05$ - excelente. Baseados na análise de predição dos perfis funcionais de 16S rRNA.97
- Figura 12 - Correlações da abundância de classes com os principais processos preditos para as rizosferas aos 2 (A), 4 (B) e 6 (C) meses de desenvolvimento das plantas de cana-de-açúcar, com base na anotação KO (KEGG Orthology). Valores mais positivos (em amarelo) correspondem a correlações positivas mais fortes. O índice adotado foi o de correlação de Pearson (ρ). Detalhes sobre cada processo (KO) foram descritos na tabela 6.98
- Figura 13 - Mapas com perfis metabólicos representando o efeito da torta de filtro sobre os processos do metabolismo do nitrogênio, em rizosferas tratadas com fosfato monoamônico (A), e sobre as atividades de fosfatases em rizosferas tratadas com fosfato natural reativo (B). As enzimas (retângulos) podem exibir três perfis de cores referentes a atividade das mesmas nos diferentes estádios fenológicos das plantas: 2 meses (esquerda); 4 meses (centro); e 6 meses (direita). Quanto mais próximo ao vermelho maior é a correlação da torta de filtro como perfil metagenômico predito. 101

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Esquema fatorial do experimento em delineamento inteiramente casualizado. Foram utilizadas duas fontes de fósforo solúvel (MAP e SFT) e uma reativa (NAT) testadas na ausência e presença da torta de filtro ao longo de três períodos de coleta. 39
- Tabela 2 – Médias da massa seca foliar (Ms) e do acúmulo de nitrogênio (N) e de fósforo (P) pelas plantas de cana-de-açúcar aos dois (60 dias), quatro (120 dias) e seis (180 dias) meses de desenvolvimento. As plantas foram tratadas com o Fosfato Monoamônico (MAP), o Superfosfato Triplo (SFT) e o Fosfato Natural Reativo (NAT), havendo a Testemunha para ausência de adubo mineral (T), todos testados na ausência (-torta) e na presença (+torta) da torta de filtro. 43
- Tabela 3 - Médias das frações de P nos solos rizosféricos de cana-de-açúcar aos 2 (60 dias), 4 (120 dias) e 6 (180 dias) meses de desenvolvimento. As frações foram determinadas com base metodologia de Hedley, Stewart e Chauhan (1982). As frações orgânicas (Po) e inorgânicas (Pi) de P com diferentes estados de labilidade foram acessadas pelo uso sequencial de reagentes com poder extrator crescente: A) P-lábil - Resina de Troca de Ânions (RTA) e NaHCO_3 (BIC); B) P-moderadamente-lábil - NaOH 0,1 mol L⁻¹ (NaOH.01) e HCl 0,1 mol L⁻¹ (HCL); C) P-não-lábil - NaOH 0,5 mol L⁻¹ (NaOH.05) e $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ (residual). As plantas foram tratadas com o Fosfato Monoamônico (MAP), o Superfosfato Triplo (SFT) e o Fosfato Natural Reativo (NAT), havendo a Testemunha para ausência de adubo mineral (T), todos testados na ausência (-torta) e na presença (+torta) da torta de filtro. 45
- Tabela 4 - Distância das comunidades bacterianas rizosféricas da cana-de-açúcar aos 2, 4 e 6 meses sob ausência (ST) e a presença (CT) da torta de filtro em microcosmos sem fontes minerais (sem); com fosfato natural reativo (NAT); fosfato monoamônico (MAP); e superfosfato triplo (SFT). Os valores representam as correlações de ANOSIM obtidas com base nas matrizes de distância Bray-Curtis para os eletroferogramas dos fragmentos de restrição terminal (TRFLP). 83
- Tabela 5 - Contribuição das principais classes bacterianas na rizosfera de cana-de-açúcar cultivada em microcosmos com diferentes adubos fosfatados COM e SEM a torta de filtro após 2, 4 e 6 meses. Ausência e presença da torta de filtro foram testadas em cada um dos seguintes microcosmos: controle (T, SEM fontes minerais); com fosfato natural reativo de Gafsa (NAT); com fosfato monoamônico (MAP); e com superfosfato triplo (SFT). A contribuição geral é dada em ordem decrescente pela Dissimilaridade Média (DM%) e a contribuição dentro de cada grupo pela Abundância Média (%), de acordo com os resultados da análise de SIMPER. 93
- Tabela 6 - Anotações ortólogas (KO) dos principais processos identificados por predições metagenômicas com base no gene 16S rRNA. As 50 funções abaixo corresponderam a mais de 10% do total de sequências associadas aos genes preditos (mais de 6400 KO distintas). 99

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

'	Minuto
"	Segundo
%	Porcentagem
+torta / CT	Sufixos para tratamentos com a torta de filtro
°C	Grau Celsius
-torta / ST	Sufixos para tratamentos sem a torta de filtro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
cm	Centímetro
Control	Controle/Testemunha negativo (a) (ausência do adubo mineral fosfatado). Sinônimos: 'T' ou 'sem'
CTC	Capacidade de troca catiônica
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleosídeo trifosfato
h	Hora
H'	Índices de diversidade de Shannon-Weaver
H+Al	Acidez potencial
L	Litros
m	Metro
M	Molar (mol L ⁻¹)
MAP	Fosfato monoamônico
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MO	Matéria orgânica
Ms	Massa seca foliar (g)
NAT	Fosfato natural reativo de Gafsa (fosfato de rocha)
ng	Nanograma
P.L	P lábil
P.ML	P moderadamente-lábil
P.NL	P não-lábil
pb	Pares de base

Pbio	P biológico
PCoA	Análise de coordenadas principais
PCR	Polymerase chain reaction (reação de polimerase em cadeia)
Pgeo	P geoquímico
pH	Potencial hidrogeniônico
PiBIC	Fração inorgânica (lábil) de P extraído por NaHCO_3 0,5 mol L ⁻¹ (g kg ⁻¹)
PiHCl	Fração inorgânica (moderadamente lábil) de P extraído por HCl 1 mol L ⁻¹ (g kg ⁻¹)
PiNaOH-0,1	Fração inorgânica (moderadamente lábil) de P extraído por NaOH 0,1 mol L ⁻¹ (g kg ⁻¹)
PiNaOH-0,5	Fração inorgânica de P extraído por NaOH 0,5 mol L ⁻¹ (g kg ⁻¹)
PiRTA	Fração inorgânica (lábil) de P extraída por Resina de Troca Aniônica (g kg ⁻¹)
PoBIC	Fração orgânica (lábil) de P determinada após digestão da PiBIC (g kg ⁻¹)
PoNaOH-0,1	Fração orgânica (moderadamente lábil) de P determinada após digestão da PiNaOH-0,1 (g kg ⁻¹)
PoNaOH-0,5	Fração orgânica (não lábil) de P determinada após digestão da PiNaOH-0,5 (g kg ⁻¹)
Presid	Fração inorgânica (não lábil) de P residual extraído por H_2SO_4 e H_2O_2 (1:1) (g kg ⁻¹)
Ptotal	Somatório de todas as frações orgânicas e inorgânicas de P na rizosfera (g kg ⁻¹)
rpm	Rotações por minuto
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
SFT	Superfosfato triplo
T	Controle/Testemunha negativo (a) (ausência do adubo mineral fosfatado). Sinônimos: 'Control' ou 'sem'
TRF	Terminal Restriction Fragment
TRFLP	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism
U	Unidade
UTO	Unidade Taxonômica Operacional

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fósforo na cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) possui destaque no cenário nacional devido a sua utilização na produção de etanol e sacarose. A área cultivada com cana-de-açúcar para a safra 2015/16 foi estimada em 8.995,5 mil hectares, sendo o estado de São Paulo o maior produtor com 52,07% (4.678,7 mil hectares), seguido por Goiás com 10,1% (908 mil hectares) e Minas Gerais com 9% (811,2 mil hectares) (CONAB, 2015).

A cana-de-açúcar é muito exigente em nutrientes, o que torna a deficiência de fósforo (P) um dos maiores agravantes do seu desenvolvimento, podendo apenas 10 a 15% do P total dos fertilizantes aplicados serem absorvidos pelas raízes (TOMAZ, 2009). Além disso, alguns trabalhos têm estimado grande aumento da demanda mundial de P para os próximos 50 a 100 anos, levando a um esgotamento das reservas (CHILDERS et al., 2011). Diante desses problemas e dos altos custos dos fertilizantes solúveis, a utilização dos fosfatos de rochas, das fontes orgânicas, como a torta de filtro, e do uso de micro-organismos solubilizadores de P insolúvel têm sido avaliados (DINARDO-MIRANDA et al., 2010; MENDES & JUNIOR, 2003; RICHARDSON, 2003; MOHAPATRA et al., 2013, WU et al., 2005), postulando um aumento na disponibilidade de P às plantas a baixos custos.

Nos últimos anos, o número de trabalhos utilizando os micro-organismos solubilizadores do P contido nas fontes de baixa solubilidade vêm aumentando. O estudo de Mirza e colaboradores (2001) demonstrou que isolados do gênero *Enterobacter* são potenciais promotores do crescimento de plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas, revelando aumentos de até 55% da biomassa de raízes. Outros gêneros como *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Azotobacter* e *Erwinia*, além dos fungos *Aspergillus* e *Penicillium*, também já foram descritos como capazes de aumentar a disponibilidade de P às plantas de cana-de-açúcar (VERMA et al., 2001; INUI-KISHI et al., 2012).

Diante dessas considerações iniciais, a exploração de micro-organismos associados à rizosfera da cana-de-açúcar pode fornecer alternativas viáveis para se minimizar o problema da baixa disponibilidade do P nos solos brasileiros. Portanto, conhecer a relação dos principais táxons microbianos dessa zona com as diferentes espécies químicas de P no solo pode levar a seleção de espécies capazes de melhorar o crescimento das plantas e aumentar a produtividade da cultura no campo.

1.2. Dinâmica do fósforo no solo

O P é um elemento químico fundamental para a manutenção da vida nos ecossistemas, visto que é o componente da ATP (adenosina-trifosfato), dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) e dos fosfolipídios, além de ser integrante fundamental da sinalização celular em vias de fosforilação enzimática (MADIGAN, MARTINKO, PARKER, 2010).

Durante a formação do solo, o P é liberado das rochas através da desagregação das frações minerais, havendo subsequente adsorção desse elemento inorgânico (P_i) na fração coloidal, na interface de organominerais e de outros componentes do solo (NOVAIS et al., 2007). A fixação dessas fontes, juntamente com o P aplicado ao solo na forma de fertilizantes comerciais orgânicos e inorgânicos, é mediada por processos geoquímicos e biológicos, podendo acarretar na imobilidade do P na solução do solo, o que diminui sua indisponibilidade às plantas (OLANDER; VITOUSEK, 2004).

Em solos tropicais, devido ao alto estado de intemperização, ocorre uma baixa saturação por bases, elevada acidez e altos teores de íons Fe^{3+} e Al^{3+} trocáveis que se ligam ao P inorgânico (altamente reativo), limitando a sua disponibilidade (NOVAIS et al., 2007; BALIGAR & FAGERIA, 2001; GOMES et al., 2010). Outros fenômenos como a oclusão ou transformação em espécies químicas com estados mais estáveis de adsorção, além da difusão do P em microporos e em camadas de argila, levam a sua gradativa imobilização no solo (SIMS & PIERZYNSKI, 2005). Além disso, o P pode ser imobilizado por incorporação da biomassa microbiana, constituindo a fração orgânica do P no solo (XU et al., 2015). Em solos intemperizados, sabe-se que a adsorção de P pode chegar a ordem de 11 mil kg ha⁻¹ de P_2O_5 e que cerca de 50% desse pode ser fixado na fração não lábil (RIBEIRO et al., 1999).

O cenário descrito é predominante nos solos brasileiros (NOVAIS et al., 2007), levando a uma crescente demanda de P para assegurar a produtividade das culturas, pois a maior parte dos fertilizantes aplicados é rapidamente complexada aos constituintes do solo (GONÇALVES et al., 2008b; MENDES & JUNIOR, 2003). Isso leva a um aporte constante e intenso de nutrientes, onde os excedentes podem ser perdidos via processo de erosão para mares e rios, podendo ocasionar eutrofização (ELSER & BENNETT, 2011). Além disso, a recuperação do P pelas culturas pode ficar limitada a apenas 10 a 20% do P total aplicado em um ano agrícola (FERNANDES, 2006; TOMAZ, 2009), o que torna ainda mais relevante a questão da adubação fosfatada em culturas anuais, principalmente a cana-de-açúcar por ocupar uma grande extensão territorial.

1.3. Fracionamento do fósforo do solo

Em virtude dos diferentes estados de disponibilidade do P no solo, é comum classificá-lo em lábil (solúvel), moderadamente lábil (pouco solúvel) e não lábil (insolúvel), com a intensidade e frequência dessas ligações variando com as características, propriedades e grau de intemperismo do solo (BOWMAN, 1989; THIEN & MYERS, 1992). Algumas metodologias para a determinação do P do solo têm sido propostas, se destacando a de fracionamento por detalhar as transformações desse elemento no mesmo, permitindo quantificar tanto o P lábil como também as frações de menor solubilidade (GATIBONI et al., 2013). Essa metodologia foi inicialmente proposta por Hedley, Stewart e Chauhan (1982), sendo baseada no princípio da extração sequencial do P. Nesse caso, extratores mais fortes são gradualmente utilizados em cada etapa, quantificando arbitrariamente as diversas frações de P_i (inorgânico) e de P_o (orgânico). Esse método se faz necessário devido à complexidade de ligações e à dinâmica desse elemento no solo em função das condições de manejo, clima local, sistema de cultivo, práticas de correção e fertilização e das características peculiares de cada solo (BUSATO et al., 2005; CERETTA et al., 2010). Esses fatores ocasionam variações temporais na disponibilidade do P nos solos, que pode estar contido dentro de agregados e na forma de diversas espécies químicas com diferentes forças de ligação (solubilidade/labilidade variável) (GATIBONI et al., 2013).

1.4. Disponibilidade de fósforo e atividade biológica

Em solos muito intemperizados, o P é disponibilizado às plantas através dos mecanismos de solubilização, principalmente dos fosfatos de cálcio (fração inorgânica), e da mineralização da matéria orgânica (KELLER et al., 2012). Neste caso, há a secreção de enzimas (fosfatases e fitases) por micro-organismos e plantas que hidrolisam a matéria orgânica liberando os íons fosfato para a solução do solo (CHANG & YANG, 2009; GOMES et al., 2010). Entretanto, esses fenômenos não são suficientes para suprir a baixa disponibilidade de P em sistemas agrícolas com base no seu estoque natural, havendo grande demanda dos fertilizantes fosfatados solúveis (TOMAZ, 2009). Em tese, os métodos de solubilização natural do fosfato poderiam refletir positivamente na economia e compensar as fontes inorgânicas sintéticas de alto custo (WU et al., 2005). Fontes alternativas ao uso de fertilizantes químicos industriais têm sido propostas, se destacando os fosfatos naturais reativos, ou fosfatos de rocha, constituídos por minerais do grupo das apatitas, que são potenciais fontes de P no solo (MOHAPATRA et al., 2013).

Pesquisas combinando essas fontes com micro-organismos, para produção de biofertilizantes, têm sido realizadas visando minimizar o uso dos fertilizantes minerais de alto custo, que correspondem a mais de 90% do P_2O_5 utilizado na agricultura (SANTOS et al., 2008; AZZIZ, et al., 2012). Além disso, trabalhos tem mostrado que os fosfatos naturais fornecem uma quantidade de P com menor custo por massa equivalente (RENNER, 2008).

Alguns subprodutos orgânicos obtidos da usinagem da cana-de-açúcar têm sido utilizados como fertilizantes, tal como a vinhaça e a torta de filtro. Esta última é resultante do processo de clarificação do caldo da cana-de-açúcar, onde o subproduto é passado por filtragem a vácuo. A torta de filtro é rica em diversos nutrientes e é composta, na matéria seca, por cerca de: 77-85% de matéria orgânica (MO); 1,1-1,4% de N; 1,04-2,55% de P_2O_5 ; 0,3-0,96% de K_2O ; 4,07-5,46% de CaO; 0,15-0,56% de MgO; e 2,70-2,96% de SO_3 (FERREIRA et al., 1986). Além disso, a torta de filtro é rica em micronutrientes: 0,8-1,2% de Fe; 500-800 mg kg^{-1} de Mn; 40-80 mg kg^{-1} de Cu; e 150-220 mg kg^{-1} de Zn (NUNES JÚNIOR, 2008).

Uma vez no solo, o P da torta de filtro é liberado gradativamente através do processo de mineralização do seu conteúdo de matéria orgânica pela biomassa microbiana (SANTOS et al., 2011). Nesse caso, os micro-organismos produzem substâncias quelatizantes e complexantes que atuam minimizando a fixação do P nas partículas minerais do solo, o que resulta numa maior disponibilidade de P para as plantas ao longo do seu ciclo (DINARDO-MIRANDA et al., 2010). Entretanto, pouco se sabe sobre os agentes complexantes e quelatizantes de P presentes na torta de filtro, assim como o impacto desse material sobre a comunidade microbiana que coloniza a zona rizosfera da cana-de-açúcar.

Muitos micro-organismos são capazes de disponibilizar o P às plantas por meio de diversos mecanismos, alguns mais relacionados aos processos enzimáticos (fitases e/ou fosfatases) e outros relacionados à fisiologia celular, como a extrusão de íons H^+ e a liberação de ácidos orgânicos oriundos do metabolismo microbiano (WILLERDING et al., 2003; MENDES & JUNIOR, 2003; RICHARDSON, 2003). Trabalhos têm destacado o uso de espécies de micro-organismos em insumos biológicos comerciais capazes de aumentar a disponibilidade dos nutrientes (MOHAPATRA et al., 2013). Apesar disso, poucas alternativas têm sido implementadas visando minimizar a dependência das culturas pelos fertilizantes solúveis de alto custo.

1.5. Bioquímica da solubilização do P no solo e abordagens moleculares

Dentre as moléculas naturais que atuam na solubilização do fosfato no solo, se destacam as do grupo das fosfatases, em especial as conhecidas como fosfatases ácidas roxas (*purple acid phosphatase*). Essas são produzidas essencialmente por plantas, possuindo uma baixa especificidade quanto ao substrato utilizado, principalmente quando comparada às fitases. As fitases são enzimas responsáveis pela quebra do fitato (hexa-fosfato de inositol), principal forma orgânica do P no solo, produzidas principalmente por micro-organismos (RICHARDSON et al., 2001; RODRÍGUEZ et al., 2006). Apesar dos mecanismos das fosfatases secretadas pelas raízes, estudos apontam que as de origem microbiana apresentam maior afinidade por compostos fosfatados (TARAFDAR; YADAV; MEENA, 2001). Apesar disso, as pesquisas sobre espécies as de micro-organismos solubilizadores de fosfatos associados às rizosferas, assim como os mecanismos bioquímicos ativos, não são conclusivas.

Dentre as fitases estão categorizadas as enzimas que apresentam diferentes perfis catalíticos, mas com um substrato comum, o fitato. Essa diversidade enzimática pode ser dividida em três classes: a *BPP* (β -*propeller phytase*), sendo essa classe predominante em amostras de solos e águas; a *HAP* (*histine acid phytase*), que está associada a micro-organismos Gram-negativos; e a *CPhy* (*cysteine phytase*), que está relacionada a ambientes anaeróbios, como o rúmen bovino (MULLANEY & ULLAH, 2003; LIM et al., 2007). A produção de fosfatases e fitases é fortemente controlada por mecanismos regulatórios complexos, sendo a atividade enzimática detectada apenas em condições ambientais específicas, como a baixa disponibilidade de P (MILLER et al., 2010). Poucos genes relacionados a esses processos foram clonados, sequenciados e estudados (LIM et al., 2007).

Vale ressaltar que, dentre os processos biológicos, a produção de diversos ácidos orgânicos de baixo peso molecular, e prótons associados, é a principal responsável pela liberação de íons ortofosfatos inorgânicos solúveis devido à acidificação de sítios do solo (JONES, 2003; MENDES & JUNIOR, 2003). Os principais ácidos produzidos são os ácidos láctico, glicólico, cítrico, málico, oxálico, succínico e ácido tartárico, entre outros (MENDES & JUNIOR, 2003). Dentre esses, o mecanismo mais bem descrito é a oxidação direta da glicose para ácido glicólico (GA) em bactérias Gram-negativas (MEYER et al., 2011). A biossíntese do ácido glicólico é realizada pela enzima glicose dehidrogenase (GDH) e de seu cofator pirroloquilonina quinona (*PQQ*), sendo esse cofator necessário para a formação da holoenzima funcional glucose dehidrogenase (G-DH)-*PQQ*, essencial para a solubilização do P (RODRÍGUEZ et al., 2006). Em diversas bactérias Gram-negativas foram clonados e

sequeenciados os genes do operon *PQQ* responsável por codificar esse componente (MILLER et al., 2010). Os genes que codificam para o cofator *PQQ* estão organizados em um *operon* composto por 12 genes (*PQQA-B-C-D-E-F-G-H-I-J-K-M*), sendo os genes *PQQA*, *C*, *D* e *E* essenciais para o funcionamento do cofator. Dentre esses, o gene *PQQE* é um dos mais estudados e possui importantes regiões conservadas (PÉREZ et al., 2007; SHEN et al., 2012). A princípio, qualquer gene responsável pela produção de ácidos orgânicos pela célula é responsável pelo fenótipo de solubilização de P (MPS+) (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999).

A identificação desses processos, bem como dos micro-organismos que os expressam, é fundamental para o desenvolvimento futuro de insumos e de biofertilizantes que possam levar a um desenvolvimento significativo das culturas, se destacando as abordagens moleculares (AZZIZ et al., 2012; INUI-KISHI et al., 2012). O sequenciamento de genes da região 16S rRNA de estirpes isoladas de solos alcalinos permitiu a identificação das espécies *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhizobium* sp., *Acinetobacter* sp., e *Pseudomonas oryzae* como potenciais solubilizadoras de fósforo através da acidificação do solo por ácidos orgânicos (LIU et al., 2015).

Dentre os principais grupos bacterianos associados à solubilização do P do solo, se destaca o filo Proteobacteria, frequentemente relatado como o principal representante dos promotores de desenvolvimento da cana-de-açúcar e de outras espécies vegetais (ESTRADA et al., 2013; MIRZA et al., 2001; PISA et al., 2011; RACHID et al., 2013). Dentro desse filo, as classes α , β e γ -Proteobacteria têm demonstrado um grande número de espécies capazes de disponibilizar o P fortemente ligado às frações orgânicas e inorgânicas por meio da produção de ácidos orgânicos e síntese de fosfatases, destacando-se os gêneros: *Azospirillum* sp., *Rhizobium* sp. e *Bradyrhizobium* sp. (α -Proteobacteria); *Burkholderia* sp. (β -Proteobacteria); *Acinetobacter* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp., *Azotobacter* sp e *Klebsiella* sp. (γ -Proteobacteria) (AHEMAD & KIBRET, 2014; AZZIZ et al., 2012; KAUR & REDDY, 2015).

Dentre esses gêneros, as espécies *Pantoea cypripedii* e *Pseudomonas plecoglossicida* foram relatadas por Kaur e Reddy (2015) como potenciais solubilizadoras de fósforo de rocha quando inoculadas em plantas de milho e trigo, podendo elevar a biomassa de caules e raízes, a produção de grãos e a absorção total de P a níveis equivalentes aos das fontes mais solúveis (KAUR & REDDY, 2015). Além disso, alguns trabalhos têm demonstrado que a adição da torta de filtro e de outros materiais orgânicos pode selecionar grupos de micro-organismos que são capazes de aumentar a solubilização do fósforo de rocha e do P contido em outras fontes

naturalmente presentes no solo (GONZÁLEZ et al., 2014; MINHONI et al., 1991). Desse modo, a combinação de fontes minerais (baixo custo) com a torta de filtro poderia aumentar a disponibilidade de P nos solos cultivados com a cana-de-açúcar e gerar economia.

Além da atividade solubilizadora, o trabalho de Dee et al. (2003) demonstrou que a torta de filtro pode estimular a colonização de micro-organismos produtores de arilsulfatases e de fosfatases ácida e alcalina em solos cultivados com milho, sendo a expressão dessas enzimas regulada por fatores ambientais, principalmente a deficiência de P (KAPRI et al., 2010). Nessas condições, apenas a identificação dos grupos de micro-organismos mais abundantes já poderia responder por boa parte dos processos envolvidos com a disponibilização do P na rizosfera, já que é possível correlacionar com precisão os dados filogenéticos com as principais funções do solo, embora não se possa inferir com exatidão a expressão das mesmas (ABHAUER, et al., 2015).

Diante do que foi exposto, relacionar as mudanças temporais nas frações de P, baseado na sua labilidade no solo, com a estrutura e a diversidade do microbioma rizosférico da cana-de-açúcar poderia fornecer informações valiosas sobre o papel dos micro-organismos na nutrição dessas plantas. Para tanto, o presente estudo avaliou o efeito de diferentes fontes minerais de P aplicadas nas superfícies de solos em vasos cultivados com cana-de-açúcar, na ausência e na presença da torta de filtro, observando o desenvolvimento dessas plantas e as alterações do seu microbioma rizosférico durante 180 dias.

Referências

- ABHAUER, K.P.; WEMHEUER, B.; DANIEL, R.; MEINICKE, P. Tax4Fun: predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 31, n. 17, p. 2882-2884, 2015.
- AZZIZ, G.; BAJSA, N.; HAGJOU, T.; TAULÉ, C.; VALVERDE, A.; IGUAL, J.M.; ARIAS, A. Abundance, diversity and prospecting of culturable phosphate solubilizing bacteria on soils under crop–pasture rotations in a no-tillage regime in Uruguay. **G. Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 61, p.320-326, 2012.
- BALIGAR, V. C.; FAGERIA, N. K. Nutrient use efficiency in plants. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 32, p. 921-950, 2001.
- BOWMAN, R. A. A sequential extraction procedure with concentrated sulfuric acid and dilute base for soil organic phosphorus. **Soil Science Society of American Journal**, Madison v. 53, n. 2, p. 362-366, 1989.

BUSATO, J.G.; CANELLAS, L.P.; VELLOSO, A.C.X. Fósforo num Cambissolo Cultivado com Cana-de-Açúcar por Longo Tempo. I - Fracionamento Sequencial. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 29, p. 935-944, 2005.

CERETTA, C.A.; LORENSINI, F.; BRUNETTO, G.; GIROTTI, E.; GATIBONI, L.C.; LOURENZI, C.R.; TIECHER, T.L.; CONTI, L.D.; TRENTIN, G.; MIOTTO, A. Frações de fósforo no solo após sucessivas aplicações de dejetos de suínos em plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 6, p. 593-602, 2010.

CHANG, C.H; YANG, S.S. Thermo-tolerant phosphate-solubilizing microbes for multi-functional biofertilizer preparation. **Bioresource Technol**, Amsterdam, v. 100, p. 1648-1658, 2009.

CHILDERS, D.L. et al. Sustainability challenges of phosphorus and food: solutions from closing the human phosphorus cycle. **Bio Science**, Washington, v. 61, p. 117-124, 2011.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**, v.2 – safra 2015/16, n.3 – Terceiro levantamento. Brasília, DF, dez. 2015. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_12_17_09_03_29_boletim_cana_portugues_-_3o_lev_-_15-16.pdf; Acesso em: 15 ago. 2016.

DEE, B.M.; HAYNES, R.J.; GRAHAM, M.H. Changes in soil acidity and the size and activity of the microbial biomass in response to the addition of sugar mill wastes. **Biology and Fertility Soils**, New York, v. 37, p. 47-54, 2003.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, G.A. (Org.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2010. 882 p.

ELSER J, BENNETT E. Phosphorus cycle: A broken biogeochemical cycle. **Nature**. London, doi: 10.1038/478029^a, 2011.

ESTRADA, G.A.; BALDANI, V.L.D.; 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**, Dordrecht, v. 369, p. 115-129, 2013.

FERNANDES, M. S. Nutrição mineral de plantas. **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**. Viçosa, 2006. 432 p.

FERREIRA, E. S.; ZOTARELLI, E. M. M.; SALVIATI, L. Efeitos da utilização da torta de filtro na produtividade da cana-de-açúcar. In: SEMINÁRIO DE TECNOLOGIA AGRONÔMICA, 4, **Anais Copersucar**, Piracicaba, p. 321-331, 1986.

GATIBONI, L. C.; BRUNETTO, G.; RHEINHEIMER, D. S.; KAMINSKI, J. Fracionamento químico das formas de fósforo do solo: usos e limitações. **Tópicos em Ciência do Solo**, Viçosa, v.8, p.141-187, 2013.

GOMES, E.A.; SOUZA, F.A.; SOUSA, S.M.; VASCONCELOS, M.J.V.; MARRIEL, I.E.; SILVA, U.C. Prospecção de comunidades microbianas do solo ativas no aproveitamento agrícola de fontes de fósforo de baixa solubilidade. **Embrapa Milho e Sorgo**, Sete Lagoas - MG, p.34, 2010.

GONÇALVES, J.L.M.; STAPE, J.L.; LACLAU, J.P.; BOUILLET, J.P.; RANGER, J. Assessing the effects of early silvicultural management on long-term site productivity of fast growing Eucalypt plantations: the Brazilian experience. **Southern Forests: a Journal of Forest Science**, Pretoria, v. 70, n. 2, p. 105-118, 2008.

GONZÁLEZ, L.C.; PRADO, R.M.; HERNÁNDEZ, A.R.; CAIONE, G.; SELVA, E.P. Uso de torta de filtro enriquecida com fosfato natural e biofertilizantes em Latossolo Vermelho distrófico. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 44, n. 2, p. 135-141, 2014.

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**, Madison, v. 46, n. 5, p. 970-976, 1982.

INUI-KISHI, R.N.; KISHI, L.T.; PICCHI, S.C.; BARBOSA, J.C.; LEMOS, M.T.O.; MARCONDES, J.; LEMOS, E.G.M. Phosphorus solubilizing and IAA production activities in plant growth promoting rhizobacteria from brazilian soils under sugarcane cultivation. **ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences**, Ipswich (USA), v. 7, p. 1446-1454, 2012.

JONES, D. L., DENNIS, P. G., OWEN, A. G., VAN HEES, P. A. W. Organic acid behavior in soils - misconceptions and knowledge gaps. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 248, p. 31-41, 2003.

KAPRI, A. TEWARI, L., Phosphate Solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric Trichoderma spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 3, 2010. 9p.

KAUR, G., & REDDY, M. S. Effects of phosphate-solubilizing bacteria, rock phosphate and chemical fertilizers on maize-wheat cropping cycle and economics. **Pedosphere**, Beijing, v. 25, n. 3, p. 428-437, 2015.

KELLER, M.; OBERSON, A.; KATHRIN E. A.; TAMBURINI, F., MÄDER, P.; MAYER, J.; FROSSARD, E.; BÜNEMANN, E. K. Phosphorus forms and enzymatic hydrolyzability of organic phosphorus in soils after 30 years of organic and conventional farming. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 175, p. 385-393, 2012.

LIM, B.L.; YEUNG, P.; CHENG, C.; HILL, J.E. Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. **ISME Journal**, New York, v. 1, p. 321-330, 2007.

LIU, Z., LI, Y. C., ZHANG, S., FU, Y., FAN, X., PATEL, J. S., & ZHANG, M. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 96, p. 217-224, 2015.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; & CLARK, D.P. Brock Biology of Microorganisms, 12th edn. **Benjamin Cummings**, San Francisco, 2010.

MENDES, I.C.; JUNIOR, F.B.R. Micro-organismos e disponibilidade de fósforo (P) nos solos: uma análise crítica. **EMBRAPA Cerrados**. 2003. 26 p.

MEYER, J.B., FRAPOLLI, M., KEEL, C., MAURHOFER, M. Pyrroloquinoline quinone

biosynthesis gene *PQQC*, a novel molecular marker for studying the phylogeny and diversity of phosphate-solubilizing Pseudomonads. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, p. 7345-7354, 2011.

MILLER SH, BROWNE P, PRIGENT-COMBARET C, COMBES-MEYNET E, MORRISSEY JP, O'GARA F. Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in Pseudomonas species. **Environmental Microbiology Reports**, Hoboken, v. 2, p 403-411, 2010.

MINHONI, M.T.A.; CARDOSO, E.J.B.N.; EIRA, A.F. Efeito de cinco tipos de matéria orgânica na solubilização microbiana de fosfato de rocha. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.15, p.29-35, 1991.

MIRZA, M.S.; AHMAD, W.; LATIF, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; MALIK, K.A. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 237, p. 47-54, 2001.

MOHAPATRA, B., VERMA, D. K., SEN, A., PANDA, B. B., ASTHIR, B. Biofertilizers- A Gateway to Sustainable Agriculture. **Popular Kheti**, West Bengal, v. 1, n. 4, p. 97-106, 2013.

MULLANEY, E.J.; ULLAH, A.H.J. The term phytase comprises several different classes of enzymes. **Biochemical Biophysical Research Communications**, New York, v. 312: p. 179-184, 2003.

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., eds. *Fertilidade do Solo*. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p 471-550.

NUNES JÚNIOR, D. Torta de filtro: de resíduo a produto nobre. **Idea News**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 92, p. 22-30, 2008.

OLANDER L.P.; VITOUSEK P.M. Biological and geochemical sinks for phosphorus in soil from a wet tropical forest. **Ecosystems**, New York, v. 7, p. 404-419, 2004.

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

PISA, G.; MAGNANI, G.S.; WEBER, H.; SOUZA, E.M.; FAORO, H.; MONTEIRO, R.A.; DAROS, E.; BAURA, V.; BESPALHOK, J.P; PEDROSA, F.O.; CRUZ, L.M. Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 44, n. 12, p. 1215-1221, 2011.

RACHID, C.T.; SANTOS, A.L.; PICCOLO, M.C.; BALIEIRO, F.C.; COUTINHO, H.L.C.; PEIXOTO, R.S.; et al. Effect of sugarcane burning or green harvest methods on the Brazilian cerrado soil bacterial community structure. **PLoS ONE**, Berkeley, v. 8, n.3 p. 1-8, 2013.

RENNER, R. Fertilizer phosphate demands could corrode water safety. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 42, p. 7030, 2008.

RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ V., V. H. (1999) **Recomendações para**

o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais – 5a Aproximação, Viçosa, 1999. 359p.

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

RICHARDSON, A.E. Making microorganism mobilize soil phosphorus. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. **Anais**, Netherlands, p. 85-90, 2003.

RODRÍGUEZ, H. & FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, Amesterdã, v. 17: p. 319-339, 1999.

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

SANTOS, D.H. et al. Qualidade tecnológica da cana-de-açúcar sob adubação com torta de filtro enriquecida com fosfato solúvel. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, Campina Grande, v.15, n.5, p. 443-449, 2011.

SANTOS, J.Z.L.; NETO, A.E.F.; RESENDE, A.V.; CURI, N. CARNEIRO, L.F. ANDRADE-COSTA, S.E.V.G. Frações de fósforo em solo adubado com fosfatos em diferentes modos de aplicação e cultivado com milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 705-714, 2008.

SHEN, Y-Q., BONNOT, F., IMSAND, E.M., ROSEFIGURA, J.M., SJÖLANDER, K., KLINMAN, J.P. Distribution and properties of the genes encoding the biosynthesis of the bacterial cofactor, pyrroloquinoline quinone. **Biochemistry: American Chemical Society**, Washington, v. 51, p. 2265-2275, 2012.

SIMS, J.T.; PIERZYNSKI, G.M. Chemistry of phosphorus in soils. In: TABATABAI, M.A.; SPARKS, D.L. (Ed.). Chemical processes in soils. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, 2005. p. 151-192. (Book Series, 8).

TARAFDAR, J.C; YADAV, R.S; MEENA, S.C. Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 164, p. 79–282, 2001.

THIEN, S. J.; MYERS, R. Determination of bioavailable phosphorus in soil. **Soil Science Society of American Journal**, Madison, v. 56, n. 3, p. 814-818, 1992.

TOMAZ, H.V.Q. **Fontes, doses e formas de aplicação de fósforo na cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP, 2009, 93 p.

VERMA S.C., LADHA J.K. AND TRIPATHI A.K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, p. 127-141, 2001.

WILLERDING, A.L.; DE OLIVEIRA, L.A.; MOREIRA. Ocorrência de bactérias solubilizadoras de fosfato nas raízes de plantas frutíferas do município de Rio Preto da Eva,

Amazonas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa. 2003.

WU, S. C., CAO, Z. H., LI, Z. G., CHEUNG, K. C., WONG, M. H. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. **Geoderma**, Amsterdam, v. 125, p. 155-166, 2005.

XU, X.; HUI, D.; KING, A.W.; SONG, X.; THORNTON, P. E.; & ZHANG, L. Convergence of microbial assimilations of soil carbon, nitrogen, phosphorus, and sulfur in terrestrial ecosystems. **Scientific Reports**, London, v. 5, n. 17445, p. 1-8, 2015.

2. JUSTIFICATIVA

Diante da importância do P para a cana-de-açúcar e para as demais culturas, a realização do presente estudo se justifica por serem necessários: **A** – Novas alternativas para aumentar a disponibilidade do P lábil no solo; **B** – Estratégias de utilização da torta de filtro e dos fosfatos de rocha que melhorem o aproveitamento dessas fontes; **C** – Avaliação do potencial da torta de filtro para estimular o desenvolvimento da microbiota benéfica que compõe a rizosfera da cana-de-açúcar; **D** – Apresentação dos impactos da adubação fosfatada sobre a estrutura e diversidade das comunidades bacterianas naturalmente presentes em solos cultivados com a cana-de-açúcar; **E** – Identificação de potenciais grupos de micro-organismos do solo capazes de solubilizar o P não lábil.

3. HIPÓTESE

A hipótese central desse trabalho é a de que o P lábil da solução do solo é a principal fração desse elemento responsável pela seleção de certos táxons bacterianos para colonização da rizosfera da cana-de-açúcar. Desse modo, diferentes fontes fosfatadas resultariam em diferentes teores de P disponível na solução do solo em períodos específicos após a adubação, fator que pode alterar gradualmente a estrutura e diversidade da microbiota natural que compõem a rizosfera dessas plantas.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Em função das diferenças entre os fertilizantes fosfatados, o principal objetivo desse estudo foi correlacionar as mudanças temporais nas frações de P, baseado na sua labilidade no solo, com a estrutura e a diversidade do microbioma rizosférico da cana-de-açúcar.

4.2. Objetivos específicos

O presente estudo foi delineado com base nos seguintes objetivos secundários:

- 1 – Relacionar os teores foliares de N e P com as diferentes fontes fosfatadas na presença e na ausência da torta de filtro;
- 2 – Relacionar os teores foliares de P com as mudanças nas frações orgânicas (Po) e inorgânicas (Pi) da rizosfera;
- 3 – Relacionar as frações do P no solo com as alterações da estrutura das comunidades bacterianas da rizosfera em cada tratamento;
- 4 – Relacionar os índices de diversidade e de abundância dos principais táxons bacterianos (sequenciamento parcial do gene 16S rRNA) com cada tratamento e com as concentrações das diferentes frações de P;
- 5 – Realizar predições metagenômicas dos principais processos e rotas metabólicas por inferências baseadas no gene 16S rRNA, sequenciado parcialmente em cada tratamento.

5. FRAÇÕES DE P EM SOLOS CULTIVADOS COM CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZANDO DIFERENTES FONTES FOSFATADAS

Resumo

A grande exigência de P pela cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) tem induzido à importação de grandes quantidades de adubos minerais no Brasil. Essa demanda se deve a intensa imobilização dos íons fosfato em frações mais recalcitrantes do solo logo após a fertilização. Essa fixação tem força variável, formando um gradiente fonte/dreno de P, dependendo das características químicas do solo. Contudo, as fontes solúveis de P representam um grande custo, incentivando novos estudos com fontes alternativas mais econômicas e que assegurem a produtividade das culturas. Nesse contexto, a maioria dos trabalhos considera o solo como um todo, ignorando a rizosfera, região de intensa atividade metabólica e deposição de fontes orgânicas por raízes e micro-organismos. O presente trabalho teve por objetivo avaliar, durante 180 dias, o balanço das frações de P no solo rizosférico e o desenvolvimento inicial da cana-de-açúcar em microcosmos contendo fosfato monoamônico (MAP), superfosfato triplo (SFT) e fosfato natural reativo (NAT) aplicados em superfície juntos à torta de filtro. A torta contribuiu com frações orgânicas e inorgânicas de P e sua combinação com o MAP aumentou a disponibilidade de P lábil nos primeiros meses. Isso evidenciou um possível aumento da mineralização da torta em virtude da diminuição da relação C/N em solos com MAP. O uso do NAT com a torta de filtro aumentou mais tardiamente os teores de P moderadamente-lábil seguidos pelo P lábil na rizosfera, sugerindo que a torta pode estimular os processos de solubilização do P ligado a Ca. Esses resultados são indícios de que a disponibilidade do P na rizosfera pode ser mais dependente de processos bioquímicos do que diretamente da imobilização química no solo e na matéria orgânica.

Palavras-chave: *Saccharum* spp.; Fracionamento de fósforo; Fertilidade do solo; Adubos alternativos

Abstract

The great demand for P by sugarcane (*Saccharum* spp.) has led to import large amounts of mineral fertilizers in Brazil. This demand is due to intense immobilizing phosphate ions in most recalcitrant fractions of the soil after fertilization. This fixation has variable force, forming a P source/drain gradient, depending on the physicochemical characteristics of the soil. However, soluble P sources represent a large cost, encouraging further studies with more economical alternative sources and to ensure the productivity of crops. In this context, most studies consider the soil as a whole, ignoring the rhizosphere, intense metabolic activity area and deposition of organic sources by roots and microorganisms. This study aimed to evaluate, for 180 days, the balance of P fractions in the rhizosphere and the initial development of sugarcane in microcosms containing monoammonium phosphate (MAP), triple superphosphate (TSP), and rock phosphate (NAT) applied surface together the filtercake. Filtercake contributed organic and inorganic fractions of P and its combination with MAP has increased the availability of labile P in the first months. It showed a possible increase in the filtercake mineralization due to the decrease in the C/N ratio in soils with MAP. The combination of the NAT with the filtercake was a late increased moderately labile P content followed by labile P in the rhizosphere, suggesting that the filtercake can stimulate the solubilization processes of P bound to Ca. These results are evidence that the availability P in the rhizosphere may have greater reliance on biochemical process than directly of the chemical immobilization in soil and organic matter.

Keywords: *Saccharum* spp.; Phosphorus fractionation; Soil fertility; Alternative fertilizers

5.1. Introdução

No Brasil, a área cultivada com cana-de-açúcar na safra 2015/16 foi de 8,995,0 mil hectares, com o estado de São Paulo (Brasil) ocupando mais de 52% desse total (CONAB, 2015). Essa grande extensão territorial, a alta demanda nutricional de P dessa cultura e a rápida fixação desse elemento nos solos tropicais exigem quantidades cada vez maiores de P para assegurar a produtividade agrícola (MENDES; JUNIOR, 2003; TOMAZ, 2009).

Além disso, as fontes minerais industrializadas de P representam um dos mais elevados custos da agricultura, o que reivindica estudos sobre o uso e a eficiência de fontes alternativas de P, como a torta de filtro e os fosfatos naturais de rochas (DINARDO-MIRANDA et al., 2010; MOHAPATRA et al., 2013). Aplicadas ao solo, essas fontes podem ter o seu conteúdo de P gradativamente disponibilizado através dos processos de solubilização, principalmente dos fosfatos de cálcio, e de mineralização da matéria orgânica (KELLER et al., 2012).

Os fosfatos naturais reativos têm sido indicados em trabalhos como potenciais substitutos das fontes mais solúveis industrializadas, tendo em vista que podem fornecer teores de P ao solo com menor custo por massa equivalente (RENNER, 2008; WU et al., 2005). Pesquisas combinando essas fontes com micro-organismos para produção de biofertilizantes têm sido realizadas, visando minimizar o uso dos fertilizantes químicos (minerais) de alto custo, que correspondem a mais de 90% do P_2O_5 usado na agricultura (SANTOS et al., 2008; AZZIZ, et al., 2012).

A torta de filtro, por sua vez, já é largamente aplicada em canaviais, sendo rica em P, N, Ca, K, S e em matéria orgânica (FERREIRA et al., 1986). Essas características da torta de filtro estimulam a atividade dos micro-organismos presentes no solo, podendo melhorar a disponibilização de P e de outros nutrientes às plantas (RASUL et al., 2008). Os estudos do efeito da torta de filtro no solo e de sua interação com as comunidades microbianas foram intensificados nas últimas décadas, pois os micro-organismos podem melhorar a disponibilização do P do solo para as plantas por meio de uma série de processos, como a produção de quelantes e complexantes (DINARDO-MIRANDA et al., 2010).

Em virtude dos diferentes compartimentos e estados de labilidade do P no solo, novas metodologias descritivas têm sido propostas para quantificar os seus teores, destacando-se o método de fracionamento de Hedley, Stewart e Chauhan (1982), desenvolvido para solos agrícolas. Nessa metodologia, as frações com diferentes estados de labilidade são acessadas fornecendo informações valiosas sobre as mais diversas formas orgânicas e inorgânicas de P nos solos (GATIBONI et al., 2013).

Apesar desses trabalhos, até o presente não são encontrados estudos quantificando as frações de P na região mais próxima às raízes, a rizosfera, onde a atividade metabólica e a secreção de substâncias e de ácidos orgânicos é diversificada, sendo feita tanto pelas raízes quanto pelos micro-organismos (DINARDO-MIRANDA et al., 2010; MOHAPATRA et al., 2013; TARAFDAR; YADAV; MEENA, 2001).

Diante do exposto, o presente estudo teve por objetivo avaliar a dinâmica da solubilização do P nas rizosferas de plantas de cana-de-açúcar, cultivadas em vasos, com diferentes fontes fosfatadas. Para tanto, foram utilizados o fosfato natural reativo (NAT), o superfosfato triplo (SFT) e o fosfato monoamônico (MAP), na ausência e na presença da torta de filtro, aplicados nas superfícies dos solos. As diferentes frações de P foram acessadas ao longo de 180 dias (seis meses) e correlacionadas aos teores foliares de N, de P e com a massa seca foliar das plantas.

5.2. Material e métodos

5.2.1. Descrição dos microcosmos: preparo do solo e propagação das plântulas

O experimento foi conduzido nas dependências do Departamento de Ciência do Solo da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP), Piracicaba – SP (22° 42' 29,5"S; 47° 37' 54,2"W, ~546 m), onde plantas de cana-de-açúcar foram cultivadas em vasos (microcosmos) durante 180 dias em casa de vegetação (**Figura 1**). Foi utilizado um Latossolo vermelho-amarelo de textura média-arenosa coletado do perfil de 0-25 cm, predominante na região. O solo foi considerado pobre em P pelo método da resina de troca iônica (9 mg dm^{-3}), condição ideal para o experimento, além de: pH = 5; matéria orgânica = 18 g dm^{-3} ; K = $1,8 \text{ mmol dm}^{-3}$; Ca = 7 mmol dm^{-3} ; Mg = 5 mmol dm^{-3} ; H+Al = 20 mmol dm^{-3} ; Soma de Bases = 14 mmol dm^{-3} ; CTC = 34 mmol dm^{-3} ; e saturação por Al = 41%.

O solo foi corrigido com calcário dolomítico (PRNT 98%), permanecendo em repouso durante 60 dias para equilibrar o pH na faixa entre 5,5-6,0 e elevar a Saturação por Bases (V%) em 60%, valores ideais para a cana-de-açúcar (CANTARELLA et al., 1996; NOVAIS et al., 2007). Após esse período, os teores de N e K foram corrigidos com base nas recomendações para o estado de São Paulo (RAIJ et al., 1996). Os teores de N foram corrigidos com ureia incorporada ao solo, prevenindo contra volatilização, com uma dose equivalente a 20 mg N kg^{-1} de solo ou 40 kg ha^{-1} de N. Os teores de K foram corrigidos com $40 \text{ mg K}_2\text{O kg}^{-1}$ de solo ou 80 kg ha^{-1} de K_2O .

A plântulas de cana-de-açúcar foram obtidas através da propagação por colmos, com 3-5

cm, da variedade RB867515. Antes do plantio para germinação, os colmos foram desinfetados por 1' em etanol 70%, 3' em hipoclorito de sódio (NaOCl) 2% e 30'' em etanol 70%, finalizando com lavagem abundante em água esterilizada. Em seguida, os colmos foram plantados em bandejas (8 x 25 x 30 cm) contendo areia lavada e vermiculita (1:1), sendo aclimatadas em casa de vegetação a temperaturas variando entre 22°C a 30°C. Após germinação (15 dias), as plântulas mais homogêneas e vigorosas foram selecionadas para replantio em vasos contendo 4 kg, 6 kg e 10 kg do solo corrigido para serem coletadas após 60 dias (2 meses), 120 dias (4 meses) e 180 dias (6 meses), respectivamente. Esse aumento gradativo dos vasos teve por objetivo minimizar o efeito da limitação espacial em virtude do crescimento das raízes. Logo após o replantio das plântulas, os tratamentos foram aplicados.

Figura 1 - Imagem do experimento em casa de vegetação na primeira semana após o plantio das mudas de cana-de-açúcar nos vasos (variedade RB86-7515).

5.2.2. Preparo e delineamento do experimento

A variação das fontes de P utilizadas representou o primeiro fator dos tratamentos, sendo o segundo a presença ou ausência da torta de filtro. As adubações fosfatadas foram feitas em superfície, com doses equivalentes a 90 mg P_2O_5 kg^{-1} de solo, correspondendo a 180 kg ha^{-1} de P_2O_5 . Para tanto, três fontes distintas de P mineral foram utilizadas, aplicando as dosagens em cada vaso com base nos teores de P_2O_5 dos fertilizantes: **A)** 2,0 g de superfosfato triplo (SFT – 45% P_2O_5); **B)** 1,87 g de fosfato monoamônico (MAP – 48% de P_2O_5); e **C)** 3,1 g de fosfato natural reativo de GAFSA (NAT – 10% solúvel e 29% total de P_2O_5).

A torta de filtro foi adicionada como fonte alternativa numa dosagem de 5 g kg^{-1} do material seco na superfície do solo, equivalente a cerca de 10 t ha^{-1} . A torta tinha 60% de umidade, 50,4% de matéria orgânica total, 24,7% de carbono orgânico, 2,2% de N, 0,7% de P, 0,75% de K_2O , 3,4% de Ca, 0,4% de Mg, 0,11% de S, 185 mg Cu kg^{-1} , 684 mg Mn kg^{-1} , 195

mg Zn kg⁻¹, 5 mg B kg⁻¹, 309 mg Na kg⁻¹. Testemunhas negativas foram consideradas tanto para a torta quanto para as fontes minerais e as amostragens foram feitas aos 60, 120 e 180 dias após o plantio, em 5 repetições, em delineamento inteiramente casualizado (**Tabela 1**). Para facilitar as interpretações, as amostragens feitas aos 60, 120 e 180 dias foram denominadas de 2º, 4º e 6º mês, respectivamente.

Tabela 1 - Esquema fatorial do experimento em delineamento inteiramente casualizado. Foram utilizadas duas fontes de fósforo solúvel (MAP e SFT) e uma reativa (NAT) testadas na ausência e presença da torta de filtro ao longo de três períodos de coleta.

Fontes de P (n=4)	Torta de Filtro (n=2)	Coletas (n=3)	Repetições (n=5)
<i>Superfosfato Triplo ('SFT')</i>	<i>Com torta de filtro ('+torta')</i>	<i>60 dias ('2º mês')</i>	<i>Rep. 1 ('1')</i>
<i>Fosfato Monoamônico ('MAP')</i>	<i>Sem torta de filtro ('-torta')</i>	<i>120 dias ('4º mês')</i>	<i>Rep. 2 ('2')</i>
<i>Fosfato Rocha, GAFSA ('NAT')</i>	-	<i>180 dias ('6º mês')</i>	<i>Rep. 3 ('3')</i>
<i>Testemunha sem P Mineral ('T')</i>	-	-	<i>Rep. 4 ('4')</i>
-	-	-	<i>Rep. 5 ('5')</i>

*O experimento foi realizado com um total de 120 vasos cultivados com a variedade RB86-7515.

5.2.3. Coletas do material vegetal e das rizosferas

O material vegetal consistiu na parte aérea e nas raízes das plantas que foram removidas do solo, lavadas e desidratadas durante duas semanas, em estufa de ventilação forçada (50 °C) para determinações da massa seca e dos teores de N e P foliar, consideradas quantificações indiretas desses nutrientes no solo (MALAVOLTA al., 1997). A rizosfera foi considerada a fração aderida a menos de 2 mm das raízes, sendo removida com o auxílio de espátula após a retirada do excesso de solo. Em seguida, as amostras foram armazenadas em tubos plásticos de 15 mL para as análises das frações de P e para as extrações do DNA para sequenciamento.

5.2.4. Determinação do N foliar

O N foliar foi estimado através da digestão sulfúrica (MALAVOLTA et al., 1997). Para o preparo da solução digestora foram adicionados em Becker de 1000 mL: 175 mL de água destilada; 5,47 g de Na₂SeO₃.5H₂O ou 3,6 g Na₂SeO₃; 21,39 g Na₂SO₄ ou 48,5 g de Na₂SO₄.10H₂O; e 4,0 g de CuSO₄.5H₂O. Essas substâncias foram misturadas nessa ordem para então serem adicionados 200 mL de H₂SO₄ concentrado. A digestão foi feita com 100 mg de amostra vegetal, seca e triturada, em tubo apropriado, acrescentando 7 mL da solução digestora. Os tubos foram mantidos em blocos digestores elevando a temperatura em 50 °C, a cada 30 minutos, até chegar a 350 °C, em que foram mantidos até o final da digestão (solução incolor ou levemente esverdeada). O teor de N nos extratos foi determinado através das soluções de NaOH 18 N, H₂SO₄ 0,02 N e solução indicadora de ácido bórico [20g de ácido bórico (H₃BO₃); 1000 mL de água destilada; 15 mL de solução alcoólica de Verde de Bromocresol

($C_{21}H_{14}Br_4O_5S$) 0,1%; e 6 mL de solução alcoólica de Vermelho de Metila ($C_{15}H_{15}N_3O_2$) 0,1%]. Os tubos de digestão foram acoplados ao destilador, sendo lentamente acrescidos com solução de NaOH 18N até virar a coloração para marrom-esverdeada. Na saída do destilador foi posicionado erlenmeyer com 10 mL da solução indicadora de ácido bórico, mantendo o processo até se dobrar o volume da solução e a coloração ficar levemente esverdeada. Após a digestão, a solução foi titulada com H_2SO_4 0,02 N, até o indicador virar de verde para azul. O volume gasto foi anotado, em mL (**V**), e o percentual de nitrogênio no substrato (**%N**) foi calculado pela expressão: **%N = 0,28V** (MALAVOLTA et al., 1997).

5.2.5. Determinação do P foliar

O P foliar foi estimado através da digestão nítrico-perclórica (MALAVOLTA et al., 1997), digerindo 0,5 g do material vegetal em tubos de digestão com 6 mL da mistura de HNO_3 e $HClO_4$, na proporção de 8:1. Os tubos foram mantidos em blocos digestores, aumentando a temperatura em 40 °C a cada 30 minutos, até chegar a 160 °C, mantendo essa temperatura até o volume da solução reduzir pela metade (~ 40'). Em seguida, a temperatura foi aumentada gradativamente até 210 °C, permanecendo nessas condições até o $HClO_4$ volatilizar e o extrato ficar incolor (~ 20' a 30'). Após o resfriamento, os extratos foram completados para 50 mL com água deionizada em balões volumétricos.

O teor de P foi determinado através de reativo colorido obtido da mistura, em partes iguais, das soluções de molibdato de amônio $[(NH_4)_6Mo_7O_{24}]$ a 5% com o metavanato de amônio (NH_4VO_3) a 0,25%. Uma solução padrão com 80 ppm de P foi feita adicionando 300 mL de água destilada, 10 mL de H_2SO_4 (1N) e 0,3509 g de KH_2PO_4 (seco em estufa por 2 horas a 80 °C), completando o volume em balão volumétrico de 1000 mL. Os padrões de leitura da curva de regressão foram com 0, 4, 8, 12, 16 e 10 ppm de P. As reações foram feitas misturando 2 mL do reativo colorido em 5 mL de cada padrão; e para as amostras foram adicionados 4 mL do reativo colorido em 1 mL do extrato nítrico-perclórico, deixando em repouso por 5', realizando as leituras em espectrofotômetro com filtro azul ($\lambda = 420$ nm). Após o cálculo da concentração de fósforo nos extratos (**C** µg para cada 5,0 mL) pela curva de regressão, o percentual de P total no tecido vegetal (**%P**) foi determinado pela expressão: **%P = 0,01C** (MALAVOLTA et al., 1997).

5.2.6. Análise de fracionamento de fósforo

As determinações das frações orgânicas e inorgânicas do P do solo rizosférico foram

realizadas com base nas metodologias propostas por Hedley, Stewart e Chauhan (1982), com modificações de Condon, Goh e Newman (1985). Foram pesados 0,5 g de solo rizosférico em tubos de 15 mL, realizando a bateria analítica com soluções de potencial extrator crescente. Essas extrações foram intercaladas por intervalos de 16 h de agitações orbitais a 30 rpm seguidas por centrifugações a 4000 rpm, formando os seguintes extratos (sobrenadantes): **A) P_{RTA}** – 0,5 g de solo em 10 mL de H_2O contendo Resina de Troca Aniônica (P_i). A resina utilizada possuía área de aproximadamente $2,0\text{ cm}^2$ extraíndo P_i lábil; **B) P_{BIC}** – Solo da P_{RTA} em 10 mL de $NaHCO_3$ $0,5\text{ mol L}^{-1}$ (P_i). Extrai o P_i lábil que está fracamente adsorvido a superfícies cristalinas e a compostos orgânicos fosfatados de baixa recalcitrância, como os ácidos nucleicos e glicerofosfatos (Tiessen; Moir, 1993); **C) $P_{NaOH-0,1}$** – Solo da P_{BIC} em 10 mL de $NaOH$ $0,1\text{ mol L}^{-1}$ ($P_i + P_o$). Extrai o P_i moderadamente-lábil, adsorvidos a Fe, Al e argilominerais (HEDLEY; STEWART; CHAUHAN, 1982) e o P_o moderadamente-lábil presente em ácidos fúlvicos e húmicos adsorvidos às superfícies dos minerais (Linguist et al, 1997); **D) P_{HCl}** – Solo da $P_{NaOH-0,1}$ em 10 mL de HCl 1 mol L^{-1} (P_i). Extrai P_i moderadamente-lábil ligado a óxidos de superfícies com cargas negativas e ao cálcio (pouco solúvel) (GATIBONI et al., 2007); **E) $P_{NaOH-0,5}$** – Solo da P_{HCl} em 10 mL de $NaOH$ $0,5\text{ mol L}^{-1}$ ($P_i + P_o$). Extrai as formas de P_i mais recalcitrantes (não lábeis) ligadas a Fe, Al e argilominerais e as formas de P_o associadas aos ácidos húmicos e fúlvicos presentes dentro de agregados (CONDON; GOH; NEWMAN, 2011).

Os extratos contendo $P_i + P_o$ (B, C e E) foram submetidos a digestão em solução de H_2SO_4 e $(NH_4)_2S_2O_8$ (persulfato de amônio) a $120\text{ }^\circ\text{C}$ em autoclave, determinando o P total do solo (P_{total}). A diferença entre o P_{TOT} e P_i representa os teores de P_o . O solo remanescente foi seco em estufa a $60\text{ }^\circ\text{C}$ durante uma semana e moído em almofariz com pistilo. Em seguida, 0,1 g desses materiais foram pesados e digeridos com a mistura de H_2SO_4 e H_2O_2 (1:1) para a determinação do fósforo residual (P_{res}) (OLSEN; SOMMERS, 1982). O P dos extratos ácidos A e D, além das digestões totais dos extratos B, C e E, foram quantificados pelo método proposto por Murphy e Riley (1962). Para os extratos alcalinos (B, C e E), a determinação do P_i foi feita segundo o método colorimétrico proposto por Dick e Tabatabai (1977).

As nove frações de P foram agrupadas em P geoquímico e P biológico de acordo com o proposto por Cross e Schlesinger (1995), sendo o primeiro obtido pela soma das frações inorgânicas mais o P residual (P_{IRTA} , P_{BIC} , $P_{NaOH-0,1}$, $P_{NaOH-0,5}$, P_{HCl} e P_{resid}) e o segundo pela soma das frações orgânicas (P_{OBIC} , $P_{NaOH-0,1}$ e $P_{NaOH-0,5}$). Além disso, as frações também foram agrupadas em P lábil (P_{IRTA} , P_{BIC} e P_{OBIC}), P moderadamente-lábil ($P_{NaOH-0,1}$, $P_{NaOH-0,1}$

e P_{HCl}) e P não-lábil ($P_{NaOH-0,5}$, $P_{NaOH-0,5}$, P_{resid}), de acordo com o proposto por Hedley, Stewart e Chauhan (1982).

5.2.7. Análises estatísticas

Todas as análises descritivas e multivariadas foram computadas na plataforma R 3.2.5. ANOVA “one-way” e os testes de Tukey HSD foram adotados para a comparação de médias dos dados de produção vegetal, teores de nitrogênio, fósforo foliar e dos valores encontrados nas análises de fracionamento de fósforo, adotando nível de significância padrão de 5%. As dependências ‘agricolae’, ‘stats’ e ‘aov’ foram utilizadas para essas finalidades.

5.3. Resultados

5.3.1. Crescimento das plantas e acúmulo de nutrientes

As análises estatísticas indicaram distribuições normais e variâncias homogêneas para os dados de massa seca e teores de N e P foliar em cada estágio fenológico das plantas (aos 2, 4 e 6 meses de idade). Nessas condições, foram feitas comparações entre as médias dos oito tratamentos resultantes da combinação da torta de filtro com as fontes minerais (**Tabela 2**). Os valores de massa seca das raízes e dos teores foliares de K não foram considerados no presente estudo por não apresentarem clareza ou mudanças significativas.

Aos dois meses, independentemente da aplicação da torta de filtro, as plantas tratadas com fosfato monoamônico (MAP) tiveram significativo incremento de massa seca foliar ($M_s = 23$ a 24 g) em comparação aos outros tratamentos (13 a 18 g). A segunda maior média foi no tratamento NAT+torta ($17,9$ g), que inclusive diferiu significativamente de NAT-torta ($13,2$ g) e foi equivalente a SFT+torta ($15,7$ g). Apesar desse efeito da torta sobre o NAT (menos solúvel), não foram observadas diferenças entre T+torta e T-torta, que são testemunhas negativas para fontes minerais, o que é um forte indício de que a torta de filtro pode estimular a disponibilização de nutrientes presentes no fosfato de rocha (**Tabela 2**).

Aos dois meses, o maior teor de N foliar foi encontrado na testemunha absoluta (23 g kg^{-1}), estando entre as plantas com o menor acúmulo de massa seca, apenas $13,5$ g. Com exceção das plantas adubadas com MAP aos dois meses, as demais acumularam mais massa na presença da torta de filtro, embora as concentrações de nitrogênio foliar tenham sido menores. Ainda aos dois meses, as concentrações de fósforo foliar foram significativamente maiores em tratamentos com MAP e SFT (entre $1,4$ a $1,7 \text{ g kg}^{-1}$), independentemente da aplicação da torta de filtro.

Entretanto, Testemunha+torta apresentou teor de P foliar significativamente superior a testemunha absoluta (sem torta ou fontes de P), evidenciando uma grande contribuição do P oriundo da torta já aos dois meses após a sua aplicação no solo.

Tabela 2 – Médias da massa seca foliar (Ms) e do acúmulo de nitrogênio (N) e de fósforo (P) pelas plantas de cana-de-açúcar aos dois (60 dias), quatro (120 dias) e seis (180 dias) meses de desenvolvimento. As plantas foram tratadas com o Fosfato Monoamônico (MAP), o Superfosfato Triplo (SFT) e o Fosfato Natural Reativo (NAT), havendo a Testemunha para ausência de adubo mineral (T), todos testados na ausência (-torta) e na presença (+torta) da torta de filtro.

Trat.	Ms (60 dias)			Ms (120 dias)			Ms (180 dias)		
	+torta	-torta	Média	+torta	-torta	Média	+torta	-torta	Média
MAP	23.02 aA	24.07 aA	23.5	155.0 aA	124.0 bB	139.5	333.3 aA	271.0 aB	302.2
SFT	15.74 bA	14.65 bA	15.2	140.0 abB	148.4 aB	144.2	293.3 bA	277.0 aA	285.2
NAT	17.91 bA	13.17 bB	15.5	122.0 bB	102.5 bcB	112.3	287.5 bA	230.0 bB	258.8
T	15.48 bA	13.50 bA	14.5	111.0 bB	99.0 cB	105.0	232.0 cB	221.0 bB	226.5
Média	18.0 A	16.3 A		132.0 A	118.5 A		286.5 A	249.8 B	

Trat.	N (60 dias)			N (120 dias)			N (180 dias)		
	+torta	-torta	Média	+torta	-torta	Média	+torta	-torta	Média
MAP	21.03 aA	20.78 abA	20.9	15.65 abB	12.92 bB	14.3	21.34 abB	26.39 aA	23.9
SFT	14.03 cB	17.19 bB	15.6	17.14 aA	17.67 aA	17.4	19.68 bB	19.85 cB	19.8
NAT	17.16 bcA	21.04 abA	19.1	17.08 abA	17.84 aA	17.5	20.61 abB	21.42 bcB	21.0
T	13.16 cB	23.04 aA	18.1	14.1 bB	13.22 bB	13.7	22.90 aB	21.88 bcB	22.4
Média	16.3 A	20.5 A		16.0 A	15.4 A		21.1 A	22.4 A	

Trat.	P (60 dias)			P (120 dias)			P (180 dias)		
	+torta	-torta	Média	+torta	-torta	Média	+torta	-torta	Média
MAP	1.67 aA	1.70 aA	1.68	0.88 bB	0.86 aB	0.87	0.68 bB	1.01 aA	0.84
SFT	1.47 aA	1.50 aA	1.48	1.28 aA	0.95 aB	1.11	0.82 aB	0.69 bB	0.76
NAT	0.79 bB	0.68 bB	0.73	0.62 cB	0.48 bB	0.55	0.64 bB	0.58 bB	0.61
T	0.91 bA	0.67 bB	0.79	0.67 cA	0.45 bB	0.56	0.73 abA	0.56 bB	0.65
Média	1.21 A	1.14 A		0.86 A	0.69 B		0.72 A	0.71 A	

Diferentes letras minúsculas na mesma coluna mostram diferenças significativas entre as fontes de fósforo pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Diferentes letras maiúsculas na mesma linha significam diferenças entre +torta e -torta pelo teste t (LSD de Fisher) ($p < 0,05$).

Aos quatro meses, a torta de filtro não resultou em ganhos significativos de massa seca foliar (Ms) para a testemunha ($Ms_{T+torta} = 111$ g; $Ms_{T-torta} = 99$ g), aplicada junto ao fosfato natural reativo ($Ms_{NAT+torta} = 122$ g; $Ms_{NAT-torta} = 102$ g) ou ao superfosfato triplo ($Ms_{SFT+torta} = 140$ g; $Ms_{SFT-torta} = 148$ g). Entretanto, o ganho de MS proporcionado pela torta foi significativo quando usada junto com o fosfato monoamônico ($Ms_{MAP+torta} = 155$ g; $Ms_{MAP-torta} = 124$ g), evidenciando uma interação positiva dessas fontes entre si (**Tabela 2**).

Aos quatro meses, os teores de N foliar variaram entre 12-18 g kg⁻¹ de Ms, mas o uso da torta de filtro não resultou em diferenças dentro de cada fonte mineral. No geral, os teores

foliares de N, antes mais abundantes na testemunha absoluta no segundo mês, passaram a não mais diferirem entre as testemunhas e os tratamentos com MAP no quarto mês, apresentando valores abaixo de $15,65 \text{ g kg}^{-1}$. Entretanto, esses teores foram predominantemente inferiores aos encontrados nos tratamentos com SFT e NAT, todos com N foliar acima de $17,0 \text{ g kg}^{-1}$.

Ainda aos quatro meses, os teores de P foliar em tratamentos com MAP e SFT permaneceram significativamente maiores do que em NAT e nas testemunhas. A torta de filtro proporcionou aumentos nos teores de P foliar dentro de todos os tratamentos, sendo significativos nas testemunhas e no SFT. O maior teor de P foi observado em SFT+torta ($1,28 \text{ g kg}^{-1}$), diferindo significativamente dos demais. O segundo maior teor de P foi em SFT-torta ($0,95 \text{ g kg}^{-1}$), diferindo de todas as testemunhas e dos tratamentos com NAT, independentemente da aplicação da torta de filtro. Esses resultados sugerem uma maior solubilidade do MAP no segundo mês e do SFT no quarto mês após aplicação de ambas as fontes fosfatadas no solo. Os teores de P foliar no quarto mês foram menores do que os encontrados no segundo mês para todos os tratamentos, sugerindo um gradativo esgotamento do P-lábil, possivelmente em função da sua imobilização no solo, além da sua diluição nos tecidos das plantas.

Aos seis meses, MAP+torta resultou numa produção de Ms superior a todos os outros tratamentos ($333,3 \text{ g}$) e foi superior a MAP-torta ($271,0 \text{ g}$). De modo semelhante, NAT+torta ($287,5 \text{ g}$) foi significativamente superior a NAT-torta ($230,0 \text{ g}$) e não diferiu de SFT+torta ($293,3 \text{ g}$), de SFT-torta ($277,0 \text{ g}$) e de MAP-torta ($271,0 \text{ g}$). As plantas testemunha não responderam significativamente a aplicação da torta de filtro, demonstrando que a resposta da cana-de-açúcar está diretamente mais relacionada à combinação da torta de filtro com fontes minerais com diferentes teores de P e graus de solubilidade (**Tabela 2**).

Ainda aos seis meses, os teores de N variaram entre $19\text{-}26 \text{ g kg}^{-1}$ de massa seca. As plantas tratadas com MAP-torta se destacaram significativamente de todas as outras por possuírem os maiores teores de N ($26,4 \text{ g kg}^{-1}$), inclusive diferindo de MAP+torta ($21,3 \text{ g kg}^{-1}$). Outros efeitos significativos da torta sobre as concentrações de N dentro de cada fonte mineral não foram observados. No geral, os teores de N foram maiores que os encontrados no quarto mês para todos os tratamentos.

De modo semelhante ao nitrogênio, a média do P foliar em plantas tratadas com MAP-torta ($1,0 \text{ g kg}^{-1}$) foi significativamente superior a todos os outros tratamentos, incluído MAP+torta ($0,68 \text{ g kg}^{-1}$). Entretanto, nos outros casos, a torta de filtro elevou as concentrações de P nas plantas, sendo esse acréscimo significativo nas testemunhas. Apesar dos maiores teores

de N e P foliar em plantas tratadas apenas com MAP, a Ms média dessas plantas foi apenas a quinta maior dentre os oito diferentes tratamentos. Isso sugere uma possível redução no desenvolvimento vegetal por conta das limitações espaciais dos vasos no sexto mês.

Os resultados revelaram que, no geral, os teores de P em plantas tratadas com fontes minerais mais solúveis (SFT e MAP), com exceção do tratamento MAP-torta, diminuíram ao longo do experimento até alcançarem um valor mínimo no sexto mês. No caso das plantas testemunha e tratadas com fosfato natural reativo, os teores de P foliar foram mínimos no quarto mês para todos os tratamentos. Isso reforça a hipótese da limitação espacial do microcosmo sobre o desenvolvimento das plantas no sexto mês, sendo mais perceptível em plantas tratadas com MAP e SFT devido as maiores quantidades de P disponibilizadas por essas fontes logo após as aplicações das mesmas nos solos, o que pode acelerar o crescimento inicial das plantas.

5.3.2. Frações de P geoquímico

a) P inorgânico extraído por resina de troca de ânions (P_{IRTA})

Aos dois meses, o tratamento que mais disponibilizou P_{IRTA} na solução do solo foi o SFT+torta (226,8 mg kg⁻¹), sendo esse valor equivalente ao acréscimo de cerca de 140% nos teores de P_{IRTA} encontrados em SFT-torta (94,9 mg kg⁻¹) neste mesmo estágio (**Tabela 3**). Fato semelhante ocorreu nos solos com MAP aos dois meses, que na presença e na ausência da torta de filtro apresentou 116,5 e 29,2 mg kg⁻¹ de P_{IRTA} na rizosfera, respectivamente. Nesse caso, o teor de P_{IRTA} em MAP+torta foi equivalente a um incremento de cerca de 300% nos teores de P_{IRTA} encontrados em MAP-torta, mostrando a importância da interação da torta de filtro com as fontes mais solúveis de P. Diferenças significativas nos teores de P_{IRTA} não foram encontradas em solos tratados com NAT e nas testemunhas.

Aos quatro meses, os teores gerais de P_{IRTA} , para fontes com e sem torta diminuíram em 61% e 23%, respectivamente, com relação aos teores dos dois meses, sugerindo grande absorção pelas plantas ou transferência do P_{IRTA} para as frações menos lábeis do solo aos quatro meses (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Médias das frações de P nos solos rizosféricos de cana-de-açúcar aos 2 (60 dias), 4 (120 dias) e 6 (180 dias) meses de desenvolvimento. As frações foram determinadas com base metodologia de Hedley, Stewart e Chauhan (1982). As frações orgânicas (Po) e inorgânicas (Pi) de P com diferentes estados de labilidade foram acessadas pelo uso sequencial de reagentes com poder extrator crescente: A) P-lábil - Resina de Troca de Ânions (RTA) e NaHCO₃ (BIC); B) P-moderadamente-lábil - NaOH 0,1 mol L⁻¹ (NaOH.01) e HCl 0,1 mol L⁻¹ (HCL); C) P-não-lábil - NaOH 0,5 mol L⁻¹ (NaOH.05) e H₂SO₄ + H₂O₂

(residual). As plantas foram tratadas com o Fosfato Monoamônico (MAP), o Superfosfato Triplo (SFT) e o Fosfato Natural Reativo (NAT), havendo a Testemunha para ausência de adubo mineral (T), todos testados na ausência (-torta) e na presença (+torta) da torta de filtro.

	2 meses (60 dias)			4 meses (120 dias)			6 meses (180 dias)		
	P (mg kg ⁻¹)								
	+torta	-torta	Média	+torta	-torta	Média	+torta	-torta	Média
1ª - Pi _{RTA}									
MAP	116.5 bA	29.2 bB	72.8	64.0 Aa	52.3 aA	58.2	84.3 aA	28.3 bB	56.3
SFT	226.8 aA	94.9 aB	160.8	47.3 aA	45.4 aA	46.3	71.8 aA	57.4 aA	64.6
NAT	8.4 cA	12.0 bA	10.2	8.4 bA	7.6 bA	8.0	21.0 bA	6.7 bA	13.8
T	12.8 cA	9.7 bA	11.3	24.0 bA	6.5 bB	15.2	10.8 bA	9.9 bA	10.3
Média	91.1 /ns	36.4		35.9 /ns	27.9		47.0 /ns	25.6	
2ª - Pi _{BIC}									
MAP	8.5 bA	4.3 ns/A	6.4	11.4 abA	6.4 aA	8.9	21.2 aA	6.3 ns/B	13.8
SFT	17.4 aA	7.9 B	12.6	18.2 aA	7.9 aB	13.1	28.0 aA	5.1 B	16.5
NAT	8.9 bA	4.1 A	6.5	8.9 bA	3.1 aA	6.0	6.9 bA	2.8 A	4.9
T	6.7 bA	3.7 A	5.2	6.9 bA	4.8 aA	5.8	3.9 bA	4.6 A	4.2
Média	10.4 A	5.0 B		11.3 A	5.6 B		15.0 /ns	4.7	
3ª - Po _{BIC}									
MAP	15.3 /ns/	14.9 /ns/	15.1	18.9 /ns/	25.7 /ns/	22.3	3.7 bA	23.1 abB	13.4
SFT	19.5	22.1	20.8	30.8	28.2	29.5	14.9 abA	14.1 bA	14.5
NAT	25.4	14.0	19.7	19.5	21.6	20.6	22.9 aA	31.4 aA	27.2
T	13.7	19.1	16.4	19.4	9.7	14.6	28.5 aA	23.1 abA	25.8
Média	18.5 /ns	17.5		22.2 /ns	21.3		17.5 /ns	22.9	
4ª - Pi _{NaOH-0.1}									
MAP	24.1 abA	16.5 bB	20.3	16.0 aA	15.6 aA	15.8	24.2 aA	14.9 ns/B	19.5
SFT	27.8 aA	23.5 aA	25.7	14.6 aA	14.6 aA	14.6	25.2 aA	14.8 B	20.0
NAT	18.2 bcA	13.2 bA	15.7	12.5 bA	10.3 bB	11.4	14.5 bA	12.2 A	13.4
T	13.9 cA	12.5 bA	13.2	12.2 bA	11.6 bA	11.9	11.8 bA	11.3 A	11.6
Média	21.0 A	16.4 B		13.8 /ns	13.0		18.9 /ns	13.3	
5ª - Po _{NaOH-0.1}									
MAP	7.4 b/ns	12.3 /ns/	9.8	29.2 aA	16.4 bB	22.8	8.7 cA	12.4 ns/A	10.6
SFT	18.8 ab	9.0	13.9	11.6 bA	20.4 bB	16.0	14.5 bcA	13.9 A	14.2
NAT	7.4 b	20.2	13.8	18.1 bA	19.2 bA	18.6	15.0 bA	15.2 A	15.1
T	23.3 a	12.6	17.9	15.0 bA	13.5 bA	14.2	21.1 aA	13.3 B	17.2
Média	14.2 /ns	13.5		18.5 /ns	17.4		14.9 /ns	13.7	
6ª - Pi _{HCl}									
MAP	11.9 abA	8.7 ns/A	10.3	13.6 ab/ns	10.6 b/ns	12.1	18.7 bA	12.0 bA	15.4
SFT	13.1 abA	10.1 A	11.6	9.9 b	10.7 b	10.3	20.3 bA	13.3 bA	16.8
NAT	32.9 aA	10.4 B	21.7	18.9 a	18.3 a	18.6	137.5 aA	25.3 aB	81.4
T	6.4 bA	5.6 A	6.0	8.8 b	9.4 b	9.1	9.7 cA	8.8 bA	9.2
Média	16.1 /ns	8.7		12.8 /ns	12.2		46.6 /ns	14.9	
7ª - Pi _{NaOH-0.5}									
MAP	6.5 aA	6.8 aA	6.6	6.5 aA	6.5 aA	6.5	7.7 bA	7.7 cA	7.7
SFT	6.5 aA	6.5 aA	6.5	6.5 aA	6.5 aA	6.5	7.7 bA	7.7 cA	7.7
NAT	6.5 aA	1.9 cB	4.2	6.5 aA	1.9 bB	4.2	7.7 bA	11.6 aB	9.7
T	1.9 bA	3.6 bB	2.7	1.9 bA	3.2 bA	2.6	10.3 aA	9.9 bA	10.1
Média	5.3 /ns	4.7		5.3 /ns	4.5		8.4 /ns	9.3	

2 meses (60 dias)			4 meses (120 dias)			6 meses (180 dias)			
----- P (mg kg ⁻¹) -----									
	+torta	-torta	Média	+torta	-torta	Média	+torta	-torta	Média
8 ^a - P _{NaOH-0,5}									
MAP	35.3 b/ns	33.4 ab/ns	34.4	39.4 ab	40.7 ab	40.1	40.4 b	44.2 a	42.3
SFT	50.7 a	40.4 a	45.5	28.5 b	51.4 a	39.9	43.8 b	29.1 b	36.5
NAT	38.8 ab	31.5 ab	35.1	41.8 a	34.5 b	38.1	60.4 a	32.5 ab	46.5
T	31.8 b	25.4 b	28.6	40.9 ab	34.0 b	37.4	39.2 b	30.2 b	34.7
Média	39.2 A	32.7 B		37.6 /ns	40.1		45.9 /ns	34.0	
9 ^a - P _{resid}									
MAP	9.9 ns/A	7.1 bB	8.5	8.0 ns/A	8.6 bA	8.3	7.7 b/ns	8.9 a/ns	8.3
SFT	9.5 A	8.8 abA	9.2	7.3 A	8.7 abB	8.0	8.7 ab	7.8 ab	8.3
NAT	9.6 A	9.3 aA	9.4	8.0 A	9.9 aB	9.0	9.2 a	8.1 ab	8.7
T	8.7 A	7.3 bA	8.0	7.4 A	7.6 bA	7.5	8.2 ab	7.5 b	7.9
Média	9.4 A	8.1 B		7.7 A	8.7 B		8.5 /ns	8.1	
P _{total}									
MAP	222.2 bA	151.7 abA	186.9	241.7 a/ns	206.1 a/ns	223.9	177.7 bcA	180.3 aA	179.0
SFT	365.0 aA	241.6 aB	303.3	168.1 b	178.8 ab	173.5	210.5 bA	152.7 abB	181.6
NAT	189.9 bA	159.7 abA	174.8	135.0 b	148.9 bc	141.9	436.1 aA	156.6 abB	296.4
T	141.9 bA	103.9 bA	122.9	144.4 b	111.6 c	128.0	137.4 cA	122.8 bA	130.1
Média	229.8 A	164.2 B		172.3 /ns	161.4		240.4 /ns	153.1	

Diferentes letras minúsculas na mesma coluna mostram diferenças significativas entre as fontes de fósforo pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Diferentes letras maiúsculas na mesma linha significam diferenças entre +torta e -torta pelo teste t (LSD de Fisher) ($p < 0,05$). As médias das fontes de P, seguidas por ns/ na mesma coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As médias de +torta e -torta, seguidas por /ns na mesma linha, não diferiram significativamente pelo teste t (LSD de Fisher) ($p < 0,05$).

Ainda aos quatro meses, os tratamentos com MAP e o SFT não apresentaram respostas significativas dos teores de P_{IRTA} quando associados com a torta de filtro. Apesar da significativa contribuição dessas fontes mais solúveis com relação ao NAT e as testemunhas, esta última (sem fontes minerais de P) respondeu mais a aplicação da torta de filtro, encontrando-se valores médios de P_{IRTA} iguais 24,0 e 6,5 mg kg⁻¹ para a adição e ausência da torta de filtro, respectivamente. Ainda nas testemunhas do quarto mês, a aplicação da torta tendeu a levar ao dobro dos teores de P_{IRTA} observados nas testemunhas com torta do segundo mês (12,8 mg kg⁻¹).

Aos seis meses, semelhante ao segundo, a torta exerceu efeito significativo no tratamento com MAP, que apresentou $P_{IRTA} = 84,0$ mg kg⁻¹ com a torta e $P_{IRTA} = 28,3$ mg kg⁻¹ sem a torta, um aumento de 198%, o mesmo não foi observado para SFT (**Tabela 3**). Semelhante as coletas anteriores, no sexto mês o MAP e o SFT, no geral, resultaram em maiores teores de P_{IRTA} do que NAT e as testemunhas. No sexto mês, os teores de P_{IRTA} em solos com MAP e SFT com torta também subiram em 32% e 52%, respectivamente, com relação aos valores médios do quarto mês. Entretanto, no sexto mês, esses teores permaneceram baixos na ausência da torta de filtro (entre 6 e 10 mg kg⁻¹), evidenciando o melhor aproveitamento da torta de filtro junto as fontes minerais solúveis.

b) P inorgânico extraído por NaHCO_3 (Pi_{BIC})

Semelhante a fração de P_{RTA} , o teor de Pi_{BIC} no solo para SFT+torta ($17,4 \text{ mg kg}^{-1}$) foi significativamente maior do que SFT-torta ($7,9 \text{ mg kg}^{-1}$) no segundo mês. No geral, o teor de Pi_{BIC} para SFT+torta foi significativamente maior do que em todos os outros tratamentos e outros efeitos significativos não foram observados neste caso.

No quarto mês, os teores de Pi_{BIC} no solo com SFT+torta ($18,2 \text{ mg kg}^{-1}$) continuou sendo significativamente maior do que em SFT-torta ($7,9 \text{ mg kg}^{-1}$). O teor de Pi_{BIC} em SFT+torta continuou sendo o maior encontrado, se diferenciando de todos os outros tratamentos, com exceção do MAP+torta ($11,4 \text{ mg kg}^{-1}$).

No sexto mês, o que se observou foi que os teores de Pi_{BIC} continuaram aumentando nos tratamentos MAP+torta ($21,2 \text{ mg kg}^{-1}$) e SFT+torta ($28,0 \text{ mg kg}^{-1}$). Juntos, os teores de Pi_{BIC} nesses tratamentos foram significativamente maiores do que em MAP-torta ($6,3 \text{ mg kg}^{-1}$) e em SFT-torta ($5,1 \text{ mg kg}^{-1}$). Outros efeitos significativos não foram notados. Esses resultados mostram que a torta de filtro aumentou, no geral, os teores de P-lábil extraído por NaHCO_3 quando aplicada junto a fontes minerais de maior solubilidade. Esses aumentos nos 2, 4 e 6 meses para o MAP foram de 98%, 79% e 235% e para o SFT foram de 119%, 130% e 448%, respectivamente, com relação a MAP e SFT sem torta de filtro.

c) P inorgânico extraído por NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{Pi}_{\text{NaOH-0,1}}$)

Aos dois meses, o teor de P inorgânico moderadamente-lábil extraído por NaOH $0,1 \text{ M}$ ($\text{Pi}_{\text{NaOH-0,1}}$) foi maior no tratamento SFT+torta ($27,8 \text{ mg kg}^{-1}$). Entretanto, este não diferiu de SFT-torta ($23,5 \text{ mg kg}^{-1}$). Esses valores também não se diferenciaram dos observados em MAP+torta ($24,1 \text{ mg kg}^{-1}$), segundo maior teor de P, mas este foi significativamente maior ao MAP-torta ($16,5 \text{ mg kg}^{-1}$), mostrando um maior efeito da torta sobre a fração de $\text{Pi}_{\text{NaOH-0,1}}$ em tratamentos com MAP aos 2 meses após o início do experimento. Ainda nessas condições, essa fração de P não foi influenciada pela aplicação da torta de filtro nas testemunhas e nos tratamentos com fosfato natural.

Aos quatro meses, os tratamentos com MAP e SFT, independentemente da torta de filtro, não apresentaram divergências significativas entre si quanto aos teores de $\text{Pi}_{\text{NaOH-0,1}}$, mas ambos foram superiores às fontes de fosfato natural reativo e às testemunhas. De modo semelhante, aos seis meses, os teores de $\text{Pi}_{\text{NaOH-0,1}}$ em MAP+torta ($24,2 \text{ mg kg}^{-1}$) e SFT+torta ($25,2 \text{ mg kg}^{-1}$) foram significativamente maiores do que em todos os outros tratamentos.

d) P inorgânico extraído por NaOH 0,5 mol L⁻¹ (Pi_{NaOH-0,5})

No segundo mês, os teores de P não-lábil extraído por NaOH 0,5 M (Pi_{NaOH-0,5}) foram significativamente maiores nos tratamentos com MAP e SFT. Em ambos os casos, cerca de 6,5 mg kg⁻¹ de fósforo foram imobilizados nessa fração, independentemente da aplicação da torta de filtro. O mesmo valor foi encontrado para NAT+torta, mas NAT-torta foi significativamente menor (Pi_{NaOH-0,5} = 1,9 mg kg⁻¹). Praticamente os mesmos resultados foram observados no quarto mês. No sexto mês, os teores de Pi_{NaOH-0,5} em tratamentos com MAP e SFT com e sem torta, no geral, aumentaram em 20% com relação aos outros meses. Entretanto, a única diferença significativa foi entre NAT+torta (Pi_{NaOH-0,5} = 7,7 mg kg⁻¹) e NAT-torta (Pi_{NaOH-0,5} = 11,6 mg kg⁻¹).

e) P inorgânico extraído por HCl (Pi_{HCL})

Os resultados do segundo mês mostraram que a torta de filtro contribuiu significativamente com o incremento do P moderadamente-lábil, extraído por HCl (Pi_{HCL}), quando aplicada com o fosfato natural reativo de GAFSA (NAT). Neste caso, os teores de Pi_{HCL} foram de 32,9 mg kg⁻¹ e 10,4 mg kg⁻¹ com e sem a torta de filtro, respectivamente. No quarto mês, os teores de Pi_{HCL} nos tratamentos com NAT+torta e NAT-torta foram semelhantes e próximos a 18 mg kg⁻¹, sendo significativamente maiores do que nos outros tratamentos, com exceção de MAP com torta de filtro (13,6 mg kg⁻¹).

Aos seis meses, o tratamento NAT+torta apresentou o teor de Pi_{HCL} significativamente maior do que em todos os outros encontrados (137 mg kg⁻¹). Além disso, em NAT-torta houve o segundo maior teor de Pi_{HCL} (25,3 mg kg⁻¹), sendo significativamente maior do que em todos os outros tratamentos sem a torta de filtro. Vale ressaltar que nesse período, como mostrado anteriormente, o tratamento NAT+torta apresentou valores de Ms significativamente maiores que no NAT-torta: 287,5 g e 230,0 g, respectivamente.

f) P residual

Ao longo dos ensaios os teores de fosforo residual (P_{resid}) apresentaram baixa variação, com valores próximos oscilando entre 7,1 e 9,9 mg kg⁻¹. Isso refletiu a estabilidade do solo utilizado e a eficiência do processo de extração sequencial das frações de fósforo do solo que compõem o microbioma rizosférico da cana-de-açúcar.

5.3.3. Frações de P biológico

a) P orgânico extraído por NaHCO₃ (P_{OBIC})

No segundo mês, não foram encontradas diferenças significativas nos teores de fósforo orgânico lábil extraído por NaHCO₃ (P_{OBIC}), com valores oscilando entre 13,7 e 25,4 g kg⁻¹. No quarto mês, a única diferença significativa encontrada foi nos teores de P_{OBIC} entre os tratamentos SFT+torta (30,8 g kg⁻¹) e Testemunha-torta (9,7 g kg⁻¹), com os demais tratamentos oscilando entre 18,9 a 28,1 g kg⁻¹.

No sexto mês, um baixo teor de P_{OBIC} foi encontrado em solos tratados com MAP+torta (3,7 g kg⁻¹), sendo um valor significativa inferior aos teores encontrados em MAP-torta (23,1 g kg⁻¹), NAT-torta (31,4 g kg⁻¹) e a Testemunha-torta (23,1 g kg⁻¹). Vale ressaltar que no sexto mês, as plantas tratadas com MAP+torta apresentara incorporação de massa seca (333,3 g) significativamente maior do que em todas os outros tratamentos, o que pode ser um indício da maior incorporação de fósforo lábil pelas plantas resultando no exaurimento de frações mais lábeis nas proximidades da rizosfera, como o P_{OBIC} por exemplo. Ainda nesse período, o teor médio de P_{OBIC} encontrado em NAT-torta foi significativamente maior do que o encontrado em SFT-torta (14,1 g kg⁻¹), revelando que as frações orgânicas de P no solo podem responder a mudanças no uso de fontes minerais reativas em estádios fenológicos mais avançados da cana-de-açúcar.

b) P orgânico extraído por NaOH 0,1 mol L⁻¹ (P_{ONaOH-0,1})

No segundo mês, os maiores teores de P de labilidade moderada extraído por NaOH 0,1 M (P_{ONaOH-0,1}), foram encontradas nas Testemunhas+torta (23,3 g kg⁻¹). Esse valor foi significativamente maior do que em MAP+torta (7,4 g kg⁻¹), NAT+torta (7,4 g kg⁻¹) e SFT-torta (9,0 g kg⁻¹). Outras diferenças significativas não foram encontradas nesse período.

No quarto mês, os maiores teores de P_{ONaOH-0,1} foram encontrados em MAP+torta (29,2 g kg⁻¹), sendo significativamente maior que em todos os outros tratamentos com exceção do SFT-torta (20,4 g kg⁻¹). O SFT-torta, por sua vez, apresentou teores significativamente maiores com relação aos SFT+torta (11,6 g kg⁻¹), o inverso do que foi observado para o MAP. Outras diferenças significativas não foram observadas.

No sexto mês, o maior teor de P_{ONaOH-0,1} foi no solo Testemunha+torta (21,1 g kg⁻¹), que se diferenciou do Testemunha-torta (13,3 g kg⁻¹). Além disso, a Testemunha+torta apresentou os teores de P_{ONaOH-0,1} significativamente maiores do que em MAP+torta (8,7 g kg⁻¹), SFT+torta

(14,5 g kg⁻¹) e NAT+torta (15,0 g kg⁻¹). Esses resultados demonstram que a adição da torta de filtro, no geral, aumentou os teores de P_{NaOH-0,1} nas rizosferas-testemunhas, sendo esses ganhos de 84%, 11% e 58% no segundo, quarto e sexto mês, respectivamente, com relação a testemunha absoluta. Esses resultados revelam que a torta de filtro pode aumentar o estoque de P moderadamente lábil próximo a rizosfera, podendo ser disponibilizado à cultura em condições específicas.

c) P orgânico extraído por NaOH 0,5 mol L⁻¹ (P_{NaOH-0,5})

No segundo mês, no geral, os teores de P orgânico não-lábil, extraído por NaOH 0,5 M (P_{NaOH-0,5}), foram maiores em tratamentos com torta de filtro. A torta aumentou os teores de P_{NaOH-0,5} nos solos com o MAP, SFT, NAT e Testemunha em 5,6%, 25%, 23% e 25%, com relação aos correspondentes sem torta. O SFT+torta (50,7 g kg⁻¹), SFT-torta (40,4 g kg⁻¹) e o NAT+torta (38,8 g kg⁻¹) demonstraram os maiores valores de P_{NaOH-0,5}. Ambos se diferenciaram de Testemunha-torta (testemunha absoluta, 25,4 g kg⁻¹).

No quarto mês, o efeito significativo da torta de filtro foi observado apenas para o SFT, que apresentou 28,5 g kg⁻¹ e 51,4 g kg⁻¹, com e sem torta, respectivamente. No sexto mês essa situação se inverteu, com teores de P_{NaOH-0,5} = 43,8 g kg⁻¹ e 29,1 g kg⁻¹, com e sem torta, respectivamente. De modo geral, a torta de filtro aplicada junto a SFT, NAT e Testemunha proporcionou aumentos significativos de 50%, 86%, 30%, respectivamente, nos teores de P_{NaOH-0,5} no sexto mês, revelando uma fixação mais tardia, porém considerável de fósforo na fração não-lábil devido a aplicação da torta de filtro.

5.3.4. P total e divisões quanto a labilidade e estado orgânico

Os resultados de P_{total} foram obtidos com base na somatória das nove frações descritas anteriormente seguidas pela remoção dos dados discrepantes (*outliers*), de acordo com as análises no software R. Desse modo, vale ressaltar que os somatórios das nove primeiras frações de P podem divergir ligeiramente dos valores de P_{total} (**Tabela 3**).

Aos dois meses, os teores de P geoquímico nos tratamentos com MAP, SFT, NAT e nas testemunhas com torta de filtro corresponderam a 75%, 77%, 54% e 42% e sem a torta de filtro foi 55%, 68%, 44% e 43% do fósforo total, respectivamente. O complemento desses valores para 100% corresponde ao P biológico e vice-versa (**Figura 2A**).

Figura 2 - Composição dos teores de P_{total} no solo rizosférico de cana-de-açúcar após 2, 4 e 6 meses de cultivo. As classificações foram de acordo com a origem e formação das frações, proposto por Cross & Schlesinger (1995) (A); e com o estado de labilidade, proposto por Hedley, Stewart e Chauhan (1982) (B). 1) Origem das frações de P: P biológico (Pbio) e de P geoquímico (Pgeo); 2) Estado de labilidade: P lábil (P.L); P moderadamente-lábil (P.ML) e P não-lábil (P.NL). 3) Fontes minerais: Fosfato Monoamônico (MAP); Superfosfato Triplo (SFT); Fosfato Natural Reativo de GAFSA (NAT); e testemunhas - sem fontes minerais (T ou sem), ambos testados na ausência (ST) e presença (CT) da torta de filtro.

De modo semelhante, aos quatro meses, o P geoquímico para MAP, SFT, NAT e testemunhas corresponderam, respectivamente, a 58%, 59%, 44% e 45% (com torta) e 55%, 48%, 40% e 43% (sem torta) do P total. Para o sexto mês esses valores foram 76%, 69%, 67% e 38% (com torta) e 49%, 65%, 46% e 44% (sem torta) do P total para MAP, SFT, NAT e testemunhas, respectivamente. Esses resultados revelam que a adição da torta de filtro fez com que o NAT tivesse resposta semelhante ao MAP e ao SFT no segundo e no sexto mês, uma vez que houve o predomínio do P geoquímico. As testemunhas apresentaram teores de P geoquímico sempre menores do que P biológico, independentemente da aplicação da torta de filtro. Esses resultados mostram que, no geral, houve o predomínio do P geoquímico sobre o P orgânico nos tratamentos com MAP, SFT e algumas vezes com NAT, ocorrendo o contrário nos tratamentos testemunha ao longo dos períodos observados.

Aos dois meses, o teor de P_{total} no tratamento SFT+torta foi o maior (365 g kg⁻¹),

superando o SFT-torta (242 g kg⁻¹) e os demais tratamentos (**Figura 2B**). Nas aplicações de MAP com e sem torta os teores de P_{total} foram de 222 e 151 g kg⁻¹, respectivamente. Estes foram os maiores valores encontrados na rizosfera após o SFT. Essa diferença pareceu estar atribuída, principalmente, à alta concentração de P lábil favorecida pela aplicação da torta de filtro. Como esperado, o menor P_{total} foi encontrado na testemunha absoluta (104 g kg⁻¹). Porém, esse valor não se diferenciou significativamente do encontrado em testemunha+torta (142 g kg⁻¹).

Aos quatro meses, o maior teor de P_{total} ocorreu nos solos com MAP+torta (P_{total} = 242 g kg⁻¹), embora não tenha diferido de MAP-torta (P_{total} = 206 g kg⁻¹), sendo significativamente superior a todos os outros tratamentos. O SFT+torta, e SFT-torta apresentaram 168 e 178 g kg⁻¹ de P_{total} , respectivamente, ambos significativamente diferentes da Testemunha-torta, que apresentou os menores teores de P_{total} aos quatro meses (P_{total} = 112 g kg⁻¹).

Aos seis meses, foi observado um aumento conjunto das frações de P lábil e moderadamente-lábil em todos os tratamentos com fonte mineral e torta de filtro. Nesses casos, somando o P lábil e o moderadamente-lábil, os aumentos com relação ao quarto mês foram de 5%, 32% e 152% para o MAP, SFT, NAT, ambos com torta de filtro.

Esse resultado revela um aumento significativo da liberação do P ligado principalmente ao cálcio no sexto mês em resposta a adição do fosfato natural reativo de GAFSA (NAT), e a potencialização desse processo pela torta de filtro. Desse modo, no sexto mês, o teor de P_{total} para NAT+torta (P_{total} = 436,1 g kg⁻¹) foi significativamente superior a NAT-torta (P_{total} = 156,6 g kg⁻¹) e a todos os outros tratamentos. Nesse caso, as mais altas concentrações de P moderadamente-lábil foram encontradas em solos com NAT+torta aos seis meses (295 g kg⁻¹), enquanto NAT-torta apresentou apenas cerca de 50% desse valor (146 g kg⁻¹).

De acordo com o exposto, a torta de filtro resultou em picos máximos dos valores de P_{total} em dois momentos: **a)** primeiro momento aos 2 meses, com teores médios de 230 g kg⁻¹ contra 164 g kg⁻¹ de P_{total} nos tratamentos sem torta, favorecendo o incremento do P lábil no solo junto com adubos fosfatados mais solúveis (MAP e SFT) num estágio importante para o desenvolvimento das plantas; **b)** segundo momento aos 6 meses, com teores médios de 240 g kg⁻¹ contra 153 g kg⁻¹ de P_{total} nos tratamentos sem torta, sendo essa resposta devido principalmente a fração moderadamente-lábil em tratamentos com fosfato natural reativo.

Ainda no sexto mês, nos tratamentos sem torta de filtro, a única diferença significativa nos teores de P_{total} foi entre o MAP-torta (180 g kg⁻¹) e Testemunha-torta (123 g kg⁻¹). No geral, a adição da torta de filtro aumentou os teores de P_{total} em 40%, 7% e 57% no segundo, quarto e

sexto mês, respectivamente.

5.3.5. Relações entre o desenvolvimento vegetal e os teores de P nas frações

A análise de correlações canônicas (CCA) revelou que, aos dois meses, o teor de fósforo no tecido das plantas de cana-de-açúcar teve uma correlação positiva com o ganho de Ms, principalmente nos tratamentos com MAP e SFT (**Figura 3.A**). O mesmo não foi observado para o nitrogênio, nem mesmo em tratamentos com o MAP, que possui cerca de 10% de N. Isso revela a estabilidade do experimento e que a correção do solo foi feita de modo adequado, minimizando as fontes de variação provenientes de elementos que não fossem o fósforo.

A CCA revelou ainda uma contribuição positiva das formas inorgânicas de P-lábil ($P_{IRTA}+P_{IBIC}$) na rizosfera, com os teores de P no tecido vegetal estando relacionados ao maior acúmulo de massa nas plantas aos dois meses. Também nesse período, foi observado que o fosfato natural reativo (NAT) se correlacionou positivamente com o aumento nos teores P-lábil inorgânico extraído por $NaHCO_3$ (P_{IBIC}), além de P moderadamente lábil ligado a cálcio, abundante no NAT.

A CCA feita para os quatro meses revelou as mesmas correlações observadas no segundo mês, havendo nítida participação do MAP e do SFT (mais P) na liberação de P lábil na rizosfera (P_{IRTA}) (**Figura 3.B**). Outro grupo, a esquerda do eixo central, foi formado pelos tratamentos com fosfato natural e as testemunhas (menos P). Nesse grupo, a testemunha absoluta se distanciou de todos os outros tratamentos e da testemunha com torta de filtro.

Aos seis meses, a CCA revelou que os tratamentos com MAP e SFT aplicados juntos a torta de filtro tiveram as maiores correlações positivas com os teores de fósforo nas plantas e com o ganho de massa, porém com menor intensidade (**Figura 3.C**). O MAP e o SFT sem torta também apresentaram essas correlações, só que menor. Mais uma vez os teores de P lábil ($P_{IRTA}+P_{IBIC}$) apresentaram uma forte correlação com o acúmulo de P e o ganho de massa. O aumento nos teores de P inorgânico modernamente-lábil, extraído por $NaOH$ 0,1 M ($P_{INaOH-0,1}$), também apresentou correlação positiva com o ganho de massa vegetal e com as aplicações de MAP e SFT.

Figura 3- Análise de Correlações Canônicas (CCA) dos dados de massa seca (Ms) e dos teores de nitrogênio (N) e fósforo (P) foliar com as frações de P na rizosfera de cana-de-açúcar cultivada durante 2 (A), 4 (B) e 6 (C) meses. Tratamentos: fosfato monoamônico (MAP); superfosfato triplo (SFT); fosfato natural reativo de Gafsa (NAT); e testemunha (T), ambos testados na ausência (ST) e na presença (CT) da torta de filtro. Frações orgânica (Po) e inorgânicas (Pi) de P com diferentes estados de labilidade foram acessadas pelo uso sequencial de reagentes com poder extrator crescente: 1) P lábil - Resina de Troca de Ânions (RTA) e NaHCO_3 (BIC); 2) P moderadamente-lábil - NaOH 0,1 mol L^{-1} (NaOH.01) e HCl 0,1 mol L^{-1} (HCL); e 3) P não-lábil - NaOH 0,5 mol L^{-1} (NaOH.05) e $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ (P residual - RES).

Aos seis meses, foi observada a separação dos tratamentos em três grupos: a) o primeiro formado por solos tratados com NAT-torta e todas as testemunhas; b) o segundo formado por solos tratados com apenas NAT+torta; c) e o terceiro formado por todos os solos tratados com MAP e SFT. No primeiro grupo, foi observada maior correlação com as frações orgânicas de fósforo, no segundo com as frações inorgânicas de P ligado ao Ca (P_{iHCL}) e no terceiro com as frações inorgânicas mais solúveis (P_{iRTA} , P_{iBIC} , $P_{iNaOH01}$).

5.4. Discussão

5.4.1. Relações entre desenvolvimento vegetal e os teores foliares dos nutrientes

Aos dois meses, o significativo aumento da massa seca foliar (Ms) nos tratamentos com MAP esteve relacionado ao incremento de nitrogênio foliar proporcionado por essa fonte, que possui 10% de N e 48% de P_2O_5 , enquanto o superfosfato triplo (SFT) tem 45% de P_2O_5 e 12% de Ca (SANTOS et al., 2009). Já o incremento significativamente maior de P foliar, nas aplicações de MAP e SFT, com relação a NAT e testemunha, não demonstrou relação direta com o acúmulo de massa, tendo em vista que os teores foliares de P entre MAP e SFT não diferiram entre si.

Esses resultados mostraram que, aos dois meses, as plantas responderam mais ao N suplementar do que ao fósforo para o mesmo tratamento, considerando que o solo foi previamente tratado com uma dose de N dentro da faixa recomendada para cana-planta, que fica entre 30 a 40 kg ha⁻¹ (AGUIAR et al., 2014), prevenindo limitações por sua deficiência. Os valores de N foliar foram muito próximos dos encontrados por Reis et al. (2008) para a variedade de cana-de-açúcar RB867515, aos dois meses de idade, plantada em microcosmos com Latossolo Vermelho-Amarelo do estado de Minas Gerais (18,9 a 20,4 g kg⁻¹). Além disso, no mesmo trabalho, as plantas com 45 a 60 dias de idade apresentaram médias de massa seca da parte aérea entre 24 a 44 g, valores próximos aos de nosso estudo. Isso indica ausência de limitações no desenvolvimento das plantas adubadas com fontes solúveis de P, confirmando que o experimento foi desenvolvido em condições ideais para se responder às hipóteses propostas no presente estudo.

Além disso, no trabalho de Trivelin et al. (2009) foi demonstrado o efeito significativo da aplicação de 40 kg ha⁻¹ de N (no plantio) sobre o crescimento da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar no estágio inicial, cultivadas em Latossolo Vermelho-Amarelo, semelhante ao utilizado em nosso estudo. Nesses casos, as raízes crescem menos em solos com altos teores de nutrientes, levando ao desenvolvimento da parte aérea com menor gasto energético. Vale

ressaltar que os dados de massa seca de raízes e dos teores de K foliar não foram incluídos por não demonstrarem variabilidade significativa. Além disso, ainda vale reforçar que os teores foliares desses nutrientes representam uma medida indireta de suas concentrações no solo (MALAVOLTA et al., 1997).

Ao contrário desses resultados, outros trabalhos indicam ausência de resposta da cana-planta às fontes nitrogenadas, sendo esta atribuída as reservas existentes no tolete, a mineralização da matéria orgânica durante o preparo do solo, a profundidade do sistema radicular e a fixação biológica de N_2 (FBN), que pode corresponder de 25% a 60% de todo o N assimilado em plantios comerciais de cana-de-açúcar no Brasil (BODDEY et al., 2001; SEGATO et al., 2006). Entretanto, a aplicação de N é mais eficiente nas soqueiras, onde as raízes são mais desenvolvidas, havendo aumento de produtividade em função do manejo e do tipo de solo (URQUIAGA et al., 2003).

Com relação aos teores foliares de P, aos dois meses, as plantas tratadas com SFT e MAP com ou sem torta de filtro apresentaram teores superiores a $1,4 \text{ g kg}^{-1}$, valor significativamente superior as das testemunhas e dos tratamentos com fosfato natural reativo (NAT). Entretanto, essas diferenças não foram estatisticamente significativas para o acúmulo de massa na parte aérea. Essa relativa baixa resposta da cana à adubação fosfatada, no início dos estádios fenológicos, pode estar relacionada com o alto efeito residual do P no solo. Isso se deve a elevação do grau de saturação da superfície adsorvente, resultando no aumento gradual da concentração de P na solução do solo em estádios fenológicos mais tardios (COSTA et al., 2006).

No geral, as concentrações foliares de P aos dois meses de desenvolvimento das planas, para MAP e SFT, ficaram próximas das encontradas por Maule et al. (2001) em plantas de cana-de-açúcar aos nove meses de idade cultivadas em Planossolo mesotrófico ($1,5 \text{ g kg}^{-1}$) e em Podzólico Vermelho Amarelo mesotrófico ($2,0 \text{ g kg}^{-1}$), localizados no noroeste do estado de São Paulo, ambos com textura arenosa-média. Esses valores foram superiores aos encontrados por Reis et al. (2008) em tecido foliar da variedade de cana-de-açúcar RB867515, dois meses após o plantio, em Latossolo Vermelho-Amarelo do estado de Minas Gerais ($0,93$ a $1,25 \text{ g kg}^{-1}$).

A redução dos teores foliares de P, em todos os tratamentos no quarto mês, evidenciou o seu rápido esgotamento ou adsorção no solo. Isso correspondeu a reduções em 29% e 40% nos conteúdos de P foliar em tratamentos com e sem torta de filtro, respectivamente, indicando uma

contribuição mais efetiva da torta para o reservatório de P-lábil no solo. Essas contribuições podem ser caracterizadas pelo fato do P orgânico, presente na torta de filtro, ser liberado gradualmente junto com o N orgânico e outros nutrientes, através da mineralização, via a ação dos micro-organismos (TORRES et al., 2012). Essa liberação lenta do P no solo torna mais eficiente o seu aproveitamento pelas plantas pois, quanto menor o tempo de contato dos íons fosfato no solo, menores são as perdas por imobilização nas vias de solubilização (NOVAIS et al., 1980).

Em termos de desenvolvimento vegetal, no quarto mês de cultivo, o benefício do MAP e do SFT sobre o acúmulo de massa seca da parte aérea, com relação a testemunha absoluta, revelou a relevância de fontes mais solúveis para o desenvolvimento vegetal nesse estágio da cultura. Nesse período, a associação do MAP com a torta de filtro foi ainda mais relevante. Isso pode ser explicado pelo fato das fontes solúveis, contendo nitrogênio, diminuírem a relação C:N, acelerando os processos de mineralização da matéria orgânica do solo (MOS) (TRIVELIN et al., 2002), sendo a torta de filtro uma abundante fonte de MOS.

Apesar dos seus benefícios, o aumento da taxa de mineralização da matéria orgânica do solo, em estádios de baixa demanda nutricional das plantas, pode levar a perdas do nitrogênio por lixiviação (CREWS; PEOPLES, 2005). No atual experimento foi observado indícios desse processo, comparando os tratamentos com MAP e SFT. Em tratamentos com SFT sem a torta de filtro, ausentes de fontes adicionais de N, as plantas tiveram uma significativa incorporação de massa seca comparadas as tratadas com MAP-torta, embora os teores de P foliar não tenha diferido. Por outro lado, com a adição da torta, há uma inversão desse quadro, com plantas se desenvolvendo mais com o MAP (fonte solúvel de N) do que com o SFT, embora os teores foliares de N e P sejam sempre menores no MAP. Isso aponta para uma rápida liberação desses nutrientes no solo com MAP+torta em uma fase fenológica de pouca exigência nutricional das plantas.

No sexto mês, semelhante ao quarto, o uso de MAP com a torta de filtro continuou se destacando em benefício às plantas, embora os teores de N e P foliar não tenham se diferido. Essa observação explica a interação da torta de filtro com o MAP, reforçando a hipótese de que o N contido nessa fonte pode favorecer os processos de mineralização da torta, beneficiando tanto às plantas quanto aos micro-organismos a elas associados.

Vale destacar ainda que, a superioridade da massa seca de plantas tratadas com NAT+torta sobre NAT sem torta, no sexto mês, e sua equivalência a SFT+torta apontam o potencial do uso combinado da torta de filtro com fontes menos solúveis de P. Normalmente,

os trabalhos tem relatado respostas significativas da variedade RB867515 à aplicação do superfosfato triplo com dosagens de torta de filtro entre 1,0-2,0 t ha⁻¹ (SANTOS et al., 2014). Nessas condições, caso doses maiores da torta de filtro possam mesmo estimular a solubilização dos fosfatos naturais reativos em solos com cultivos comerciais de cana-de-açúcar em estádios fenológico iniciais, grandes rendimentos podem ser obtidos, precisando de ensaios específicos para comprovar tal efeito.

Além desses benefícios, a torta de filtro pode proteger o fósforo da fixação (Bittencourt, 2006), processo que é minimizado, principalmente, devido a produção de quelatizantes e complexantes pelos micro-organismos que são estimulados pela torta de filtro (DINARDO-MIRANDA et al., 2010). Desse modo, o conteúdo de P da torta e dos fosfatos naturais pode ser gradativamente disponibilizado às plantas através de processos de mineralização da MO e solubilização das fontes reativas, respectivamente (KELLER et al., 2012). Esses mecanismos podem explicar, em parte, os benefícios da torta e das fontes de fosfato natural reativo sobre as culturas em estádios mais tardios, principalmente na cana-soca (MOHAPATRA et al., 2013; SANTOS et al., 2014).

Considerando as discussões já expostas, tanto os teores de P como os de N foliar, aos dois meses de cultivo das plantas tratadas com MAP e/ou SFT com torta de filtro, estão dentro dos limites da faixa adequada estabelecidos por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997). Entretanto, ao longo de quatro e seis meses, os teores de P nos tecidos das plantas vão decrescendo, ficando abaixo do limite considerado ideal para assegurar a produtividade. Isso se deve, provavelmente, ao efeito da diluição desse elemento nos tecidos das plantas, embora os teores de N foliar, comparados aos de P, tenham variado em menor amplitude ao longo dos estádios fenológicos (2, 4 e 6 meses) das plantas.

5.4.2. Efeitos das fontes de P e da torta de filtro sobre as frações de fósforo no solo

Os resultados do fracionamento revelaram que, no geral, a torta de filtro aumentou os teores de P em todas as rizosferas aos dois meses de desenvolvimento, mesmo nas extrações inorgânicas. Esses incrementos podem ser explicados pela imobilização do fósforo da matéria orgânica, abundante na torta de filtro, em frações orgânicas no solo (Po) (TIECHER; RHEINHEIMER; CALEGARI, 2012) e pela mineralização de parte desse fósforo para compor a fração inorgânica no solo (Pi) (FOX et al., 2011), contribuindo, concomitantemente, com as mudanças nos teores de Pi e Po quantificados nos extratos.

a) P inorgânico extraído por resina de troca de ânions (P_{IRTA})

Aos dois meses, a aplicação de SFT teve um destaque significativo nos aumentos dos teores lábeis de P inorgânico (P_{IRTA}), superior até mesmo aos teores encontrados em tratamentos com MAP que, como foi visto, proporcionou maiores ganhos de massa seca foliar. Nesse caso, os teores de P_{IRTA} no solo rizosférico mostraram correlações diretas com os teores de P-foliar, porém não ficou clara sua relação com o ganho de massa, mostrando que o crescimento inicial das plantas em solos adubados com MAP parece estar mais relacionado ao teor foliar de N que, por sua vez, também é proporcional a sua concentração no solo (MALAVOLTA, et al., 1997).

Os teores de P_{IRTA} nos solos tratados com MAP (com torta) e SFT (com e sem torta) aos dois meses foram superiores aos relatados por Simões Neto et al. (2009) em Latossolo Amarelo Distrófico (LAd) cultivado com cana-de-açúcar, 30 dias após plantio, com aplicações entre 153 a 204 kg ha⁻¹ de P, via superfosfato triplo, com 65,5 a 92,1 mg kg⁻¹ de P resina, respectivamente. Ainda para os solos com torta de filtro junto a MAP e SFT, as reduções nos teores de P_{IRTA} no quarto mês (< 65 mg kg⁻¹) mostram correlações com uma série de fatores, destacando a assimilação do nutriente pelas plantas, lenta liberação a partir da superfície do solo e passagem para as formas de menor labilidade no solo.

No caso do MAP, tendo em vista que o teor de P foliar diminuiu do segundo para o quarto mês (de 1,67 para 0,88 g kg⁻¹), evidencia-se uma diluição do fósforo no tecido foliar, com plantas pesando de 23 para 155 g, respectivamente. Isso pode ter acontecido tanto pelo rápido crescimento das plantas como pela fixação do P no solo, já que ocorreu um aumento do P total do segundo para o quarto mês (222 para 240 mg kg⁻¹), embora o teor de P_{IRTA} tenha diminuído.

Com relação as plantas adubadas com SFT+torta, a redução nas concentrações do P foliar no quarto mês foi baixa (< 0,2 g kg⁻¹ de P), permanecendo com teores altos. Em paralelo, o P total do solo no quarto mês (168 mg kg⁻¹) foi bem menor que no segundo (365 mg kg⁻¹), revelando um melhor aproveitamento do SFT pelas plantas, com uma menor taxa de fixação do P no solo. Isso é relevante, pois grande parte do P solúvel é rapidamente adsorvido quando aplicado ao solo (CORRÊA et al., 2008). Entretanto, a velocidade desse processo depende da capacidade máxima de adsorção de P no solo, que é diretamente proporcional a saturação dos sítios de adsorção (GONÇALVES et al., 1985).

Esses fatos apontam, mais uma vez, que o aproveitamento inicial do fósforo pelas plantas tratadas com MAP e SFT, até os 4 meses, são diferentes quando aplicados com a torta de filtro. Esses dados também reforçam a hipótese de que tal diferença seja em função do provável

aumento da taxa de mineralização da torta de filtro em solos com MAP (fonte de N). Corroborando essa hipótese, o trabalho de Vargas et al. (2004) demonstrou que o uso de fontes nitrogenadas junto aos resíduos de aveia-preta (alta relação C:N) aumentou a imobilização de N na biomassa microbiana, diminuindo a relação C:N em Argissolo Vermelho distrófico cultivado com milho.

O mesmo trabalho revelou que essa redução na relação C:N favoreceu a população bacteriana ($<$ relação C:N) e que, com a imobilização ou saída do N do sistema, a relação C:N aumenta passando a favorecer mais o crescimento da população de fungos ($>$ relação C:N). Esse balanço da microbiota do solo é fundamental para manutenção do sistema agrícola, principalmente em solos pobres em P, onde há maior dependência das formas orgânicas que são armazenadas na biomassa microbiana (GATIBONI et al. 2008b). Já em solos pouco intemperizados e bem adubados, o fósforo inorgânico é a principal fonte de P às plantas (RHEINHEIMER et al., 2008). Apesar da imobilização dos nutrientes na biomassa microbiana, esses não são adsorvidos aos colóides do solo, em especial o fósforo, permanecendo biodisponível às plantas ao longo dos estágios fenológicos (CONTE; ANGHINONI; RHEINHEIMER, 2002). Portanto, o manejo do solo, através da adição de torta de filtro junto às fontes minerais de alta solubilidade, pode beneficiar tanto as culturas como as comunidades microbianas associadas, tanto a curto quanto a longo prazo.

No sexto mês, os teores de P_{RTA} voltam a aumentar nos solos com MAP e SFT, ambos com torta. Embora esses teores de P_{RTA} não tenham diferido entre si, a massa seca de plantas com MAP+torta, aos seis meses, foi maior do que em todos os outros tratamentos, mas apresentou teores de P foliar ($0,68 \text{ g kg}^{-1}$) significativamente menores do que os encontrados em SFT+torta ($0,86 \text{ g kg}^{-1}$). Isso mostra que quantidades de P foliar equivalente a $0,8 \text{ g kg}^{-1}$ podem indicar uma planta em ótimo estágio de desenvolvimento aos seis meses, devendo-se essa redução dos teores de P foliar ao efeito da diluição deste elemento em seus tecidos. Esse fenômeno foi explicado por Malavolta (1997) e por Mishra e Kurchania (2001), que mostraram que as concentrações dos macronutrientes em tecidos foliares reduzem com a idade da planta.

b) P orgânico e inorgânico extraído por NaHCO_3 (P_{BIC} e P_{IBIC})

Com relações as frações lábeis de P extraídas por NaHCO_3 (P_{IBIC} e P_{OBIC}), suas contribuições são ativas para o fornecimento de nutrientes às plantas e transferências no meio

ambiente através das águas de percolação ou deflúvio (GATIBONI et al. 2007). No atual experimento, essas frações pouco variaram em função dos tratamentos aos dois meses, com exceção do P_{iBIC} no SFT+torta ($17,4 \text{ mg kg}^{-1}$).

No geral, a torta de filtro contribuiu significativamente com o aumento dos teores de P_{iBIC} quando aplicada em conjunto com as fontes solúveis, ao longo do tempo avaliado, principalmente com o SFT e aos seis meses. De modo semelhante, no quarto mês, os tratamentos com SFT juntos tiveram os maiores teores de P_{OBIC} do experimento, principalmente quando aplicados com a torta de filtro. Isso pode ser explicado pelo fato da fração P_{OBIC} está relacionada a compostos orgânicos de fácil decomposição que são regulados pela biomassa microbiana da rizosfera (CHEN et al., 2002). Desse modo, pode haver acúmulo de Po no solo, podendo ser mineralizado (GATIBONI et al., 2007, 2008b).

Vale ressaltar que o menor teor de P_{OBIC} em todo o experimento foi verificado em solos tratados com MAP+torta seis meses após o plantio da cana ($3,7 \text{ mg kg}^{-1}$), enquanto nos outros tratamentos esses valores foram superiores a 14 mg kg^{-1} de P. Sabe-se que os maiores teores de P_{OBIC} no solo são atribuídos a um aumento da atividade biológica das plantas e da biomassa microbiana (TIECHER; RHEINHEIMER; CALEGARI, 2012). Isso novamente revela indícios favoráveis do processo de mineralização em decorrência da aplicação de MAP com a torta de filtro nos solos, levando ao aumento da imobilização do P devido a sua rápida liberação no solo aos dois e quatro meses. Desse modo, no sexto mês, ocorre a diminuição da atividade biológica em decorrência do rápido esgotamento da fração de P_{OBIC} e a limitação espacial dos vasos. Essa hipótese pode ser confirmada se for considerado que os micro-organismos presentes no solo também utilizam as formas inorgânicas de fósforo para sintetizar compostos orgânicos fosfatados (BÜNEMANN et al., 2008), sendo os teores de P_{iRTA} e P_{iBIC} do sexto mês mais altos do que os do quarto mês em tratamentos com MAP+torta.

c) P orgânico e inorgânico extraído por NaOH 0,1 mol L⁻¹ ($P_{oNaOH-0,1}$ e $P_{iNaOH-0,1}$)

Quanto as frações extraídas por NaOH 0,1 mol L⁻¹ ($P_{iNaOH-0,1}$ e $P_{oNaOH-0,1}$) e NaOH 0,5 mol L⁻¹ ($P_{iNaOH-0,5}$ e $P_{oNaOH-0,5}$), representam, no geral, o fósforo inorgânico com energia de ligação intermediária (ligado aos óxidos de Fe e Al e às argilas silicatadas) e o fósforo orgânico moderadamente lábil (CROSS; SCHLESSINGER, 1995). Isso foi atribuído a mudança na ordem de extração das frações correspondentes ao P protegido nos intra-agregados do solo, sendo considerada moderadamente lábil apenas em caso de exaurimento das formas mais lábeis (CONDRON et al., 1985).

Os resultados mostraram que, dentre as frações de mobilidade moderada, os teores de $Pi_{NaOH-0,1}$ nos tratamentos o com MAP e SFT foram predominantemente mais altos durante todo o experimento, principalmente quando aplicados juntos a torta de filtro. Isso mostra que as fontes de P com maior solubilidade podem passar mais facilmente para as frações de menor labilidade, consistindo no P moderadamente lábil ligado aos oxi-hidróxidos de Fe e Al, podendo formar ligações mono e bidentadas com a fração coloidal do solo (HEDLEY; STEWART; CHAUHAN, 1982; CROSS; SCHLESSINGER, 1995).

Observando apenas os solos testemunha, pode-se explicar que a predominância dos teores de $P_{ONaOH-0,1}$, onde foi aplicada a torta de filtro, sobre as testemunhas absolutas deve-se ao fato de que a torta contribui com a maior parte da formação dos fosfatos monoésteres, que pode ser extraído pela hidrólise parcial dos compostos orgânicos (GATIBONI, 2013). Esses compostos possuem alta afinidade com os coloides do solo, porém maior parte da microbiota do solo não consegue acessá-lo (RHEINHEIMER; ANGHINONI; FLORES, 2002).

Diante desses fatos, vale afirmar que a fração de P com menor estado de labilidade é uma importante fonte para manutenção das plantas, atuando tanto como fonte quanto como dreno para solução do solo (HEDLEY; STEWART; CHAUHAN, 1982), dependendo da sua composição mineralógica, manejo e adubações do solo, entre outros (CALEGARI, 2013; TIECHER; RHEINHEIMER; CALEGARI, 2012). Além disso, muitos estudos relatam que a passagem dessas formas de P, orgânicas e inorgânicas, para frações mais lábeis do solo é frequentemente mediada pela atividade dos micro-organismos do solo (MENDES; JUNIOR, 2003; RICHARDSON, 2003; MOHAPATRA et al., 2013, WU et al., 2005).

d) P inorgânico extraído por HCl 1,0 mol L^{-1} (Pi_{HCl})

Quanto a fração de Pi_{HCl} , de acordo com Cross e Schlessinger (1995), o P extraído com HCl 1,0 mol L^{-1} também pode ser considerado de labilidade moderada, correspondendo a fração de P ligado ao Ca e fortemente adsorvido aos coloides do solo, podendo ser proveniente de minerais primários. Isso explica o fato dos tratamentos com fosfato natural reativo apresentarem os maiores teores de Pi_{HCl} , pois consistem em fontes minerais, principalmente do grupo das apatitas, que contém P ligado ao Ca na sua composição, podendo ser uma potencial fonte para a disponibilização de P no solo (KELLER et al., 2012, MOHAPATRA et al., 2013).

Foi observado que as concentrações iniciais de Pi_{HCl} , em tratamentos com fosfato natural reativo, são relativamente baixas no segundo mês e vão aumentando com o tempo,

principalmente quando junto a torta de filtro. De algum modo, a torta de filtro parece causar rápida incorporação do P ligado ao Ca no sistema, fato especialmente observado no sexto mês (NAT+torta), onde os teores de Pi_{HCl} foram equivalentes a mais de 137 mg kg^{-1} , sendo esse valor maior do que qualquer outra quantificação de P dentre todas as frações extraídas no sexto mês. Esse efeito pode estar correlacionado ao fato da torta de filtro estimular a atividade dos micro-organismos do solo, podendo melhorar a disponibilização do P oriundo de fontes menos solúveis (RASUL et al., 2008).

Além disso, a adição da torta de filtro também pode estimular o desenvolvimento da comunidade de fungos, tendo em vista que esses são mais beneficiados do que as bactérias pela adição de resíduos com maior relação C:N no solo (VARGAS et al., 2004). Dentre esses, os gêneros de fungos como *Aspergillus* e *Penicillium* podem se associar às plantas de cana-de-açúcar aumentando a disponibilidade de P (VERMA et al., 2001). Tais benefícios podem ser explicados pela produção de quelatizantes e complexantes por esses micro-organismos, reduzindo o P fixado no solo e mantendo a sua biodisponibilidade às plantas (DINARDO-MIRANDA et al., 2010).

Com relação ao fosfato natural reativo, vale salientar que, embora apresente baixa disponibilidade imediata, têm menor custo por massa equivalente (RENNER, 2008), podendo ser mais adequado desde que a menor reatividade não restrinja o processo de difusão no sistema solo-dreno, assegurando o suprimento de P às plantas (NOVAIS; SMYTH, 1999).

e) P orgânico e inorgânico extraído por NaOH 0,5 mol L⁻¹ ($Po_{NaOH-0,5}$ e $Pi_{NaOH-0,5}$)

Quanto as frações extraídas por NaOH 0,5 mol L⁻¹ ($Pi_{NaOH-0,5}$ e $Po_{NaOH-0,5}$), são fortemente protegidas nos intra-agregados do solo lidadas aos oxi-hidróxidos de Fe e Al, sendo consideradas frações não lábeis (CONDRON et al., 1985). No presente estudo, as frações de $Pi_{NaOH-0,5}$ tenderam a aumentar aos seis meses, enquanto as de $Po_{NaOH-0,5}$ apresentaram pouca variação. Ceretta e colaboradores (2010), mostraram que a adição continuada de dejetos líquidos de suínos (DLS) à lanço em Argissolo Vermelho arenoso, sob sistema de plantio direto, aumentou os teores de $Po_{NaOH-0,5}$. Porém, mesmo em altas doses de DLS, as frações de $Pi_{NaOH-0,5}$ predominaram sobre $Po_{NaOH-0,5}$. Resultado semelhante foi observado por BUSATO et al. (2005) em Cambissolo Háplico, cultivado com cana-de-açúcar e tratado com $120 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ de vinhaça. Os valores de $Po_{NaOH-0,5}$ do nosso estudo variaram entre 25 a 60 mg kg^{-1} de P, sendo próximos aos encontrados por Santos et al. (2008) em Argissolo Vermelho distrófico cultivado com milho, tratados com 180 kg ha^{-1} de P_2O_5 a partir de diferentes fontes de P com distintos

modos de aplicação. No mesmo estudo, os teores de $P_{NaOH-0,5}$ foram menores que os de $P_{NaOH-0,5}$, sendo essa uma situação mais comum.

No geral, em nosso estudo, houve uma condição especialmente oposta onde as frações não lábeis orgânicas superaram significativamente as inorgânicas. Vale ressaltar que, diferente dos demais trabalhos, nosso estudo coletou amostras de solos rizosféricos. Essa região possui uma alta atividade metabólica, havendo intensa exsudação de inúmeros compostos orgânicos e atividade da biomassa microbiana (DINARDO-MIRANDA et al., 2010; MOHAPATRA et al., 2013). Essas características da rizosfera podem explicar a superioridade das frações orgânicas extraídas por NaOH 0,5 mol L⁻¹ nesse micro-habitat, uma vez que essas frações podem estar associadas aos compostos húmicos (HEDLEY et al., 1982, SANTOS et al., 2008) que, por sua vez, formam rizodepósitos que influenciam a estrutura da comunidade microbiana do solo (PUGLISI et al., 2013). Contudo, nosso trabalho é o primeiro a quantificar as diferentes frações de fósforo da rizosfera de cana-de-açúcar adubada com diferentes fontes de P pelo método proposto por Hedley, Stewart e Chauhan, 1982.

f) P residual (P_{resid})

Com relação as digestões com H₂SO₄ e H₂O₂, são as responsáveis pela extração de formas insolúveis de Pi e mais estáveis de Po, representando o P ocluso (P residual) retido na estrutura dos minerais que, devido à grande recalcitrância, só é transferido para a fração mais lábil apenas em condições de extrema deficiência de fósforo no solo (GATIBONI et al., 2005). Nessas condições, Gatiboni et al. (2007) relataram que o provável aumento do P extraído por NaOH 0,5 mol L⁻¹ em um Latossolo Vermelho distroférrico, submetido a diferentes doses de P₂O₅ durante seis anos, seria provocado pela transferência da fração residual após a aplicação de calcário. Esse fenômeno também foi relatado por Beck e Sanches (1994) em uma área de floresta amazônica substituída por sistema de plantio direto rotacionado entre milho, soja e arroz durante 18 anos. Além disso, esses autores relataram que a liberação de OH⁻ pela reação do calcário no solo compete com o Pi residual nos sítios de troca dos coloides, diminuindo a adsorção do fosfato. Nesse caso, a aplicação de calcário pode elevar o pH do solo e estimula a atividade de micro-organismos responsáveis pela mineralização do fósforo orgânico residual.

Entre outros fatores, a adição da torta de filtro no solo também pode exercer influência indireta sobre a fração de P residual. Em experimento conduzido por Dee, Haynes e Graham (2003), a torta de filtro, em microcosmos cultivados com milho, elevou o pH do meio, reduziu

as concentrações de Al trocável no solo e melhorando o desenvolvimento das culturas. Como resultado, a torta também pode aumentar a atividade das fosfatases ácidas e alcalinas direcionando P das frações menos lábeis para a solução do solo (TARAFDAR; YADAV; MEENA, 2001).

Diante do exposto, a baixa variação nos teores de P residual indicam a estabilidade do experimento devido, possivelmente, as correções prévias do solo com calcário dolomítico. Além disso, se pode formular a hipótese de que os baixos teores de P residual estejam relacionados aos elevados teores de P_o extraído por NaOH 0,5 mol L⁻¹ em todos os tratamentos, semelhante ao observado por Gatiboni et al. (2007).

g) P total (P_{total})

Com relação ao P total, a redução dos seus teores na rizosfera ao longo do tempo, em tratamentos sem a torta de filtro, mostra claramente o seu aproveitamento pelas plantas, não havendo fontes adicionais de P_o nesses tratamentos. Já nos tratamentos com torta de filtro, essa dinâmica foi mais complexa, com os teores de P total sendo maiores. Em todos os tratamentos e épocas, com exceção do SFT+torta aos 2 meses (365 mg P kg⁻¹) e do NAT+torta aos seis meses (436 mg P kg⁻¹), os teores de P total variaram entre 100 a 250 mg kg⁻¹. Esses valores foram inferiores ao encontrados por Santos et al. (2008) em Argissolo Vermelho plantado com milho e adubado com 180 kg ha⁻¹ de P₂O₅ usando superfosfato triplo, termofosfato magnesiano, fosfato natural reativo de Arad e de Araxá aplicados em superfície.

Vale ressaltar que a aplicação das fontes fosfatadas na superfície do solo, naturalmente, leva a uma disponibilização mais lenta do P na zona de coleta (rizosfera) devido a gradativa dissolução dessas fontes. Nessas condições, considerando o Latossolo vermelho-amarelo utilizado, tipicamente pobre em P total, sabe-se que a maior parte do conteúdo de P é rapidamente imobilizado no solo. Busato e colaboradores (2005) mostraram isso em um Cambissolo Háplico cultivado por longo tempo com cana-de-açúcar, onde mais de 55% do P total correspondia ao P não lábil e residual em solos tratados com vinhaça. Desse modo, solos com maior histórico de adubações fosfatadas tenderiam a apresentar os maiores teores de P_{total}. Considerando o baixo conteúdo de P_{total} do solo utilizado no presente estudo, pode-se supor que este foi pouco explorado do ponto de vista agrônômico e que os 6 meses de observação não foram suficientes para a total dissolução do P das fontes minerais e da torta de filtro aplicados superficialmente. As fontes utilizadas continuarão a abastecer gradativamente os compartimentos de P no solo, porém as raízes constituem um constante dreno de P,

influenciando dinamicamente no balanço desse elemento no solo.

5.4.3. Considerações quanto ao estado de labilidade e origem orgânica das frações

Quanto a classificação da origem orgânica das frações de fósforo, proposta por Cross e Schlesinger (1995), a predominância de P geoquímico sobre o P biológico corroboraram os resultados encontrados por outros trabalhos que usaram a metodologia de fracionamento de Hedley, Stewart e Chauhan, 1982 (BUSATO et al., 2005; CERETTA et al., 2010). Entretanto, as proporções de P geoquímico do presente estudo foram bem menores do que as dos trabalhos citados, principalmente o P ocluso na fração residual.

Gatiboni et al. (2008a), Galvão e Salcedo (2009) mostraram que, em solos submetidos a aplicação de dejetos orgânicos, o acúmulo de P é mais pronunciado nas frações inorgânicas. Uma explicação para isso pode ser dada através de Cassol et al. (2001), que estudando a eficiência de estrumes como adubos fosfatados concluíram que mais de 60% do P desses materiais podem estar contidos na fração inorgânica ligada a Ca, sendo essa extraída com HCl 0,1 mol L⁻¹. Isso também explica a grande concentração de Pi moderadamente lábil extraído dos solos tratados com NAT+torta, rico em Ca, após os seis meses de cultivo.

Diante dessas considerações, pode-se afirmar que a torta de filtro é uma importante fonte tanto de P orgânico como inorgânico, contribuindo com o acúmulo de fósforo tanto nas frações lábeis como nas moderadamente lábeis. Essas contribuições podem ser significativas no início do cultivo, junto com fontes mais solúveis de P, principalmente se a fonte for rica em nitrogênio, como o fosfato monoamônico (10% de N). Por outro lado, em estádios fenológicos mais tardios, pode ocorrer tanto a mineralização da matéria orgânica da torta de filtro (50,4% M.O.) quanto a maior solubilização do fosfato natural reativo (20% P₂O₅). Isso pode contribuir com os aumentos do P moderadamente lábil que, como já foi discutido, pode ser gradualmente disponibilizado às plantas (KELLER et al., 2012, MOHAPATRA et al., 2013). Nessas condições, o nosso trabalho revelou que as plantas de cana-de-açúcar responderam significativamente ao uso conjunto da torta de filtro e do fosfato natural reativo num estágio mais tardio (180 dias de desenvolvimento). Vale ressaltar que, nesse período, as raízes expandiram ocupando um maior volume dos vasos (limitação espacial), o que pode intensificar a liberação de P ligado ao Ca em função da redução do pH na rizosfera pela extrusão de ácidos orgânicos com liberação de H⁺ ou de HCO³⁻ (SOUZA et al., 2010).

5.4.4. Relações entre desenvolvimento vegetal, teores nutricionais e frações de P

As análises de interações entre desenvolvimento vegetal, teores nutricionais e as frações de fósforo na rizosfera resumiram boa parte dos resultados já discutidos. Foi clara a resposta das plantas aos teores de P_{IRTA} seguidos pelos de P_{IBIC} , e pelo conteúdo de P foliar e da massa seca foliar em todos os meses observados.

Outro fato foi que, apesar da sua importância no sistema, os teores foliares de N e de P_{IBIC} se correlacionaram negativamente com os teores de P foliar, massa seca, P_{IRTA} e P_{IBIC} em todos os tempos estudados (**Figura 3**). Nessas condições, o uso do MAP e SFT, principalmente com a torta no sexto mês, revela importante contribuição no aumento dos teores de P_{IRTA} e P_{IBIC} na rizosfera, servindo como fontes principais de P às plantas (RHEINHEIMER et al., 2008).

Já em solos com menores concentrações de P, condição presente na aplicação de fosfato natural reativo e nas testemunhas, as frações orgânicas de P, principalmente P_{OBIC} , $P_{NaOH-0,1}$ e $P_{NaOH-0,5}$, são as que mais contribuem com os teores de P total nesses solos, se correlacionando positivamente com os teores de N foliar. Isso pode ser explicado pelo fato de que, em solos com menores concentrações de P inorgânico, ocorre maior dependência das formas orgânicas que são armazenadas na biomassa microbiana (GATIBONI et al., 2008b).

Essas informações juntas ajudam a explicar a correlação negativa do N foliar com MAP (**Figura 3**), que é proporcional ao N do solo (Malavolta et al., 1997), com P foliar, massa seca, P_{IRTA} e P_{IBIC} . Nessas condições, os aumentos dos teores de N provavelmente estão relacionados ao aumento da biomassa microbiana nas rizosferas com MAP, aumentando a imobilização de P, como demonstrado por Vargas et al. (2004) em solos cultivados com milho sob adubação nitrogenada. Entretanto, o P imobilizado pela microbiota permanece biodisponível às plantas (CONTE; ANGHINONI; RHEINHEIMER, 2002; GATIBONI et al., 2008b), formando um importante reservatório de P no solo ao longo dos cultivos sucessivos.

5.5. Conclusões

1. A torta de filtro, além de incrementar as frações orgânicas de P, contribui principalmente com o aumento das frações inorgânicas de P na rizosfera da cana-de-açúcar.
2. O teor de P-lábil no tecido foliar é diretamente proporcional às suas concentrações na zona rizosférica, mas com o desenvolvimento das plantas ocorre a diluição gradual desse elemento nos seus tecidos.
3. A combinação da torta de filtro com as fontes mais solúveis de P (MAP e SFT), no geral, resultou nos maiores teores de P-lábil na rizosfera e ganhos de massa foliar.

4. A combinação da torta de filtro com o fosfato natural (Gafsa) resultou no aumento dos teores de P moderadamente-lábil após os 180 dias de cultivo das plantas, o que aumentou também os teores de P-lábil, mostrando o benefício dessa combinação a longo prazo.

5. As interações da torta de filtro com o MAP e com o NAT demonstraram fortes indícios dos processos de mineralização da MO e da solubilização do P ligado ao Ca na zona rizosférica, respectivamente. Isso corrobora com a literatura que cita a torta de filtro como um importante estimulante da microbiota benéfica do solo, resultando em melhorias das características do solo e no desenvolvimento das plantas em geral.

Referências

AGUIAR, A.T.E.; GONÇALVES, C.; PATERNIANI, M.E.A.; TUCI, M.L.S.; CASTRO, C.E.F. **Boletim IAC: Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, n. 200, 7ª ed. rev. e atual, 2014, 452 p.

ALEXANDER, A.G. Evaluation of sugar-enzyme relationships among twelve Puerto Rico sugarcane varieties. **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v. 51, n. 1, p. 29-38, 1967.

AZZIZ, G.; BAJSA, N.; HAGJOU, T.; TAULÉ, C.; VALVERDE, A.; IGUAL, J.M.; ARIAS, A. Abundance, diversity and prospecting of culturable phosphate solubilizing bacteria on soils under crop–pasture rotations in a no-tillage regime in Uruguay. **G. Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 61, p. 320-326, 2012.

BECK, M.A.; SANCHES, P.A. Soil phosphorus fraction dynamics during 18 years of cultivation on a Typic Paleudult. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 34, p. 1424-1431, 1994.

BITTENCOURT, V. C.; STRINI, A. C.; CESARIM, L. G. et al. Torta de filtro enriquecida. **Idea News**, Ribeirão Preto, v. 6, n. 63, p. 2-6, 2006.

BODDEY, R.M.; POLIDORO, J.C.; RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. Use of the ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to sugar cane and other grasses. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 28, p. 1-7, 2001.

BÜNEMANN, E.K.; SMERNIK, R.J.; MARSCHNER, P.; MCNEILL, A.M. Microbial synthesis of organic and condensed forms of phosphorus in acid and calcareous soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 932-946, 2008.

BUSATO, J.G.; CANELLAS, L.P.; VELLOSO, A.C.X. Fósforo num Cambissolo Cultivado com Cana-de-Açúcar por Longo Tempo. I - Fracionamento Sequencial. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 29, p. 935-944, 2005.

CALEGARI, A.; TIECHER, T.; HARGROVE, W.L.; RALISCH, R.; TESSIER, D.;

TOURDONNET, S. DE; GUIMARÃES, M.F.; RHEINHEIMER, D.S. Long-term effect of different soil management systems and winter crops on soil acidity and vertical distribution of nutrients in a Brazilian Oxisol. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 133, p. 32-39, 2013.

CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (Ed.) **Cana-de-açúcar: Recomendação de adubação e calagem para o estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1996. 143 p.

CASSOL, P.C.; GIANELLO, C.; COSTA, V.E.U. Frações de fósforo em estrumes e sua eficiência como adubo fosfatado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, p. 635-644, 2001.

CERETTA, C.A.; LORENSINI, F.; BRUNETTO, G.; GIROTTO, E.; GATIBONI, L.C.; LOURENZI, C.R.; TIECHER, T.L.; CONTI, L.D.; TRENTIN, G.; MIOTTO, A. Frações de fósforo no solo após sucessivas aplicações de dejetos de suínos em plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 6, p. 593-602, 2010.

CHEN, C.R.; CONDRON, L.M.; DAVIS, M.R.; SHERLOCK, R.R. Phosphorus dynamics in the rhizosphere of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and radiata pine (*Pinus radiata* D. Don.). **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 34, p. 487-499, 2002.

CLARKE, K.R., GREEN, R.H. Statistical design and analysis for a “biological effects” study. **Marine Ecology Progress Series**, Amelinghamusen, v. 46, p. 213-226, 1988.

CLARKE, K.R.; GORLEY, R.N. **PRIMER v5: User manual/tutorial**, PRIMERE. Plymouth, UK, 2001, 91 p.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**, v.2 – safra 2015/16, n.3 – Terceiro levantamento. Brasília, DF, dez. 2015. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_12_17_09_03_29_boletim_cana_portugues_-_3o_lev_-_15-16.pdf; Acesso em: 15 de ago. 2016.

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. **European Journal of Soil Science**, New Jersey, v. 36, p. 199-207, 1985.

CONDRON, L.M.; NEWMAN, S. Revisiting the fundamentals of phosphorus fractionation of sediments and soils. **Journal of Soils and Sediments**, Heidelberg, v. 11, p. 830-840, 2011.

CONTE, E.; ANGHINONI, I.; RHEINHEIMER, D.S. Fósforo da biomassa microbiana e atividade de fosfatase ácida após aplicação de fosfato em solo no sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 26, p. 925-930, 2002.

CORRÊA, R. M.; NASCIMENTO, C. W. A.; FREIRE, F. J.; SOUZA, S. K. S. C.; FERRAZ, G. B. Disponibilidade e níveis críticos de fósforo em milho e solos fertilizados com fontes fosfatadas. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Viçosa, v. 3, p. 218-224, 2008.

COSTA, J. P. V.; BARROS, N. F.; ALBUQUERQUE, A. W.; MOURA FILHO G.; SANTOS, J. R. Fluxo difusivo de fósforo em função de doses e da umidade do solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 10, n. 4, p. 828-835, 2006.

COURTNEY K.C.; BAINARD, L.D.; SIKES, B.A.; KOCH, A.M.; MAHERALI, H.;

KLIRONOMOS, J.N.; HART, M.M. Determining a minimum detection threshold in terminal restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 88, p. 14-18, 2012.

CREWS, T. E.; PEOPLES, M. B. Can the synchrony of nitrogen supply and crop demand be improved in legume and fertilizer-based agroecosystems. **Nutrient cycling in Agroecosystems**, Berlim, v. 72, p. 101-120, 2005.

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**, Amsterdam, v. 64, p. 197-214, 1995.

DEE, B.M.; HAYNES, R.J.; GRAHAM, M.H. Changes in soil acidity and the size and activity of the microbial biomass in response to the addition of sugar mill wastes. **Biology and Fertility Soils**, New York, v. 37, p. 47-54, 2003.

DICK, W.A.; TABATABAI, M.A. Determination of orthophosphate in aqueous-solutions containing labile organic and inorganic phosphorus-compounds. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 6, n. 1, p. 82-85, 1977.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, G.A. (Org.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2010. 882 p.

FERREIRA, E. S.; ZOTARELLI, E. M. M.; SALVIATI, L. Efeitos da utilização da torta de filtro na produtividade da cana-de-açúcar. In: SEMINÁRIO DE TECNOLOGIA AGRÔNOMICA, 4., 1986, **Piracicaba: Anais Copersucar**, p. 321-331, 1986.

FOX, T. R. MILLER, B. W.; RUBILAR, R. STAPE, J. L.; ALBAUGH, T. J. Phosphorus nutrition of forest plantations: the role of inorganic and organic phosphorus. **Phosphorus in Action**, Berlim, 2011, 338 p.

GALVÃO, S.R. Da S.; SALCEDO, I.H. Soil phosphorus fractions in Sandy soil amended with cattle manure for long periods. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, p. 613-622, 2009.

GATIBONI, L. C.; BRUNETTO, G.; RHEINHEIMER, D. S.; KAMINSKI, J. Fracionamento químico das formas de fósforo do solo: usos e limitações. **Tópicos em Ciência do Solo**, Viçosa, v. 8, p. 141-187, 2013.

GATIBONI, L. C.; KAMINSKI, J.; RHEINHEIMER, D. DOS S.; FLORES, J. P. C. Biodisponibilidade de formas de fósforo acumuladas em solo sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 691-699, 2007.

GATIBONI, L.C.; BRUNETTO, G.; KAMINSKI, J.; RHEINHEIMER, D. DOS S.; CERETTA, C.A.; BASSO, C.J. Formas de fósforo no solo após sucessivas adições de dejetos líquidos de suínos em pastagem natural. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1753-1761, 2008a.

GATIBONI, L.C.; BRUNETTO, G.; RHEINHEIMER, D.S.; KAMINSKI, J. Fracionamento químico das formas de fósforo no solo: usos e limitações. In: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. **Tópicos em ciência do solo**, Viçosa, v. 8, p. 141-187, 2013.

GATIBONI, L.C.; KAMINSKI, J.; RHEINHEIMER, D.D.S.; FLORES, J. P. C. Biodisponibilidade de formas de fósforo acumuladas em solo sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 691-699, 2007,

GATIBONI, L.C.; RHEINHEIMER, D.S.; BRUNETTO, G.B. Fósforo da biomassa microbiana e atividade de fosfatases ácidas durante a diminuição do fósforo disponível no solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.8, p. 1085-1091, 2008b.

GONÇALVES, J.L.M.; FIRME, D.J.; NOVAIS, R.F.; RIBEIRO, A.C. Cinética de adsorção de fósforo em solos de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 9, p. 107-111, 1985.

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**, Madison, v. 46, n. 5, p. 970-976, 1982.

INUI-KISHI, R.N.; KISHI, L.T.; PICCHI, S.C.; BARBOSA, J.C.; LEMOS, M.T.O.; MARCONDES, J.; LEMOS, E.G.M. Phosphorus solubilizing and iaa production activities in plant growth promoting rhizobacteria from brazilian soils under sugarcane cultivation. **ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences**, Ipswich (USA), v. 7, p. 1446-1454, 2012.

KELLER, M.; OBERSON, A.; KATHRIN E. A.; TAMBURINI, F., MÄDER, P.; MAYER, J.; FROSSARD, E.; BÜNEMANN, E.K. Phosphorus forms and enzymatic hydrolyzability of organic phosphorus in soils after 30 years of organic and conventional farming. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 175, p. 385-393, 2012.

LINQUIST, B.A.; SINGLETON, P.W.; CASSMAN, K.G. Inorganic and organic phosphorus dynamics during a build-up decline of available phosphorus in an ultisol. **Soil Science**, Baltimore, v. 162, p. 254-264, 1997.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**, 2, ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319 p.

MAULE, R. F.; MAZZA, J.A.; MARTHA JUNIOR, G. B. Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita, **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, n. 2, p. 295-301, 2001.

MENDES, I.C.; JUNIOR, F.B.R. **Micro-organismos e disponibilidade de fósforo (P) nos solos: uma análise crítica**. Embrapa Cerrados, Brasília, 2003. 26 p.

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

MISHRA, J.S; KURCHANIA, S.P. Nutrient content in mustard and associated weeds as influenced by nitrogen levels, planting geometry and weed control methods. **Indian Journal Plant Physiology**, New Delhi, v. 6, n. 4, p. 386-389, 2001.

MOHAPATRA, B.; VERMA, D. K.; SEN, A.; PANDA, B.B.; ASTHIR, B. Biofertilizers- A Gateway to Sustainable Agriculture. **Popular Kheti**, West Bengal, v. 1, n. 4, p. 97-106, 2013.

MURPHY, J.; RILEY, J.P. A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 26, n. 1, p. 31-36, 1962.

NOVAIS, R. F. Efeito do tempo de incubação do fosfato de araxá em solos sobre o fósforo disponível. **Revista Brasileira de Ciências de Solo**, Viçosa, v. 4, n. 1, p. 153-155, 1980.

NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V.; V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. **Fertilidade do solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, 2007. 1017 p.

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

OLSEN, S.R.; SOMMERS, L.E. PHOSPHORUS. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENE, Y.Q.R. (Ed.). Methods of soil analysis. 2nd ed. **Soil Science Society of America**, Madison, pt. 2: Chemical and microbiological properties, p. 403-430, 1982.

OTTO, R.; FRANCO, H.C.J.; FARONI, C.E.; VITTI, A.C.; TRIVELIN, P.C.O. Fitomassa de raízes e da parte aérea da cana-de-açúcar relacionada à adubação nitrogenada de plantio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 398-405, 2009.

PUGLISI, E.; PASCAZIO, S.; SUCIU, N.; CATTANI, I.; FAIT, G.; SPACCINI, R.; CRECCHIO, C.; PICCOLO, A.; TREVISAN, M. Rhizosphere microbial diversity as influenced by humic substance amendments and chemical composition of rhizodeposits. **Journal of Geochemical Exploration**, Amsterdam, v. 129, p. 82-94, 2013.

RAIJ, B.V.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo: Boletim Técnico N. 100**, 2ª edição. Campinas: Instituto Agrônomo & Fundação IAC, 1996. 285 p.

RASUL, G.; KHAN, K.S.; MÜLLER, T.; JOERGENSEN, R.G. Soil-microbial response to sugarcane filter cake and biogenic waste compost. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 171, p. 355-360, 2008.

REIS, M.R.; SILVA, A.A.; GUIMARÃES, A.A.; KHOURI, C.R.; FERREIRA, E.A.; FERREIRA, F.A. FREITAS, M.A.M. Dinâmica de Nutrientes em Tecidos Foliares de Cana-de-Açúcar Após Aplicação de Herbicidas. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n. 1, p. 175-184, 2008.

RENNER, R. Fertilizer phosphate demands could corrode water safety. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 42, p. 7030, 2008.

RHEINHEIMER, D.S.; ANGHINONI, I. Distribuição do fósforo inorgânico em sistemas de manejo de solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, p. 151-160, 2001.

RHEINHEIMER, D.S.; ANGHINONI, I.; FLORES, A.F. Organic and inorganic phosphorus as characterized by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance in subtropical soils under management systems. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 33, n. 11/12, p. 1853-1871, 2002.

RICHARDSON, A.E. Making microorganism mobilize soil phosphorus. In VELÁZQUEZ, E.; RODRÍGUEZ-BARRUECO, C. **First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization**, Dordrecht, p. 85-90, 2003.

SANTOS, D.H.; SILVA, M.A.; TIRITAN, C.S.; CRUSCIOL, C.A.C. The effect of filter cakes enriched with soluble phosphorus used as a fertilizer on the sugarcane ratoons. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 36, n. 3, p. 365-372, 2014.

SANTOS, D.H.; SILVA, M.A.; TIRITAN, C.S.; FOLONI, J.S.S. ECHER, F.R. Qualidade tecnológica da cana-de-açúcar sob adubação com torta de filtro enriquecida com fosfato solúvel. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, Campina Grande, v.15, n.5, p.443-449, 2011.

SANTOS, J.Z.L.; NETO, A.E.F.; RESENDE, A.V.; CURI, N. CARNEIRO, L.F. ANDRADE-COSTA, S.E.V.G. Frações de fósforo em solo adubado com fosfatos em diferentes modos de aplicação e cultivado com milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 705-714, 2008.

SANTOS, V.R.; FILHO, G.M.; ALBUQUERQUE, A.W.; COSTA, J.P.V.; SANTOS, C.G.; SANTOS, A.C.I. Crescimento e produtividade agrícola de cana-de-açúcar em diferentes fontes de fósforo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 13, n. 4, p. 389-396, 2009.

SCHÜTTE, U.M.E.; ALDO, Z.; BENT, S.J.; WILLIAMS, C.J., SHNEIDER, G.M.; SOLHEIM, B.; FORNEY, L.F. Bacterial succession in a glacier foreland of the high Arctic. **The Isme Journal**, Washington, v. 3, p. 1258-1268, 2009.

SEGATO, S.V.; PINTO, A.S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J.C.M. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**, Piracicaba, Gráfica Prol, 2006. 415 p.

SIMÕES NETO, D.E.; OLIVEIRA1, A.C.; FREIRE, F.J.; FREIRE, M.B.G.S.; NASCIMENTO, C.W.A. ROCHA, A.T. Extração de fósforo em solos cultivados com cana-de-açúcar e suas relações com a capacidade tampão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 13, p. 840-848, 2009.

SOUZA, L.H.; NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.H.; VILLANI, E.M.A. Efeito do pH do solo rizosférico e não rizosférico de plantas de soja inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* na absorção de boro, cobre, ferro, manganês e zinco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, n. 5, 2010.

TARAFDAR, J.C; YADAV, R.S; MEENA, S.C. Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 164, p. 79-282, 2001.

TIECHER, T.; RHEINHEIMER, D.S.; CALEGARI, A. Soil organic phosphorus forms under different soil management systems and winter crops, in a long term experiment. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 36, p. 271-281, 2012.

TIESSEN, H.; MOIR, J.O. Characterization of available P by sequential extraction. In: Carter, M.R. (ed) Soil sampling and methods of analysis. **Canadian Society of Soil Science (Lewis**

Publishers), Boca Raton, p. 75-86, 1993.

TIESSEN, H.; STEWART, W.B.; COLE, C.V. Pathways of phosphorus transformations in soils of differing pedogenesis. **Soil Science Society of American Journal**, Madison, v. 48, p. 853-858, 1984.

TOMAZ, H.V.Q. **Fontes, doses e formas de aplicação de fósforo na cana-de-açúcar**, Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2009. 93 p.

TRIVELIN, P.C.O.; VITTI, A.C.; OLIVEIRA, M.W.; GAVA, G.J.C.; SARRIÉS, G.A. Utilização de nitrogênio e produtividade da cana-de-açúcar (cana-planta) em solo arenoso com incorporação de resíduos da cultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 26, n. 3, p. 636-646, 2002.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S.; BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 56, p. 105-114, 1992.

URQUIAGA, S.; LIMA, R.M.; XAVIER, R.P.; RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. Avaliação da eficiência do processo de fixação biológica de nitrogênio em diferentes variedades de cana-de-açúcar. **Agronomia**, Garça, v. 37, p. 55-58, 2003.

VARGAS, L.K.; SELBACH, P.A.; SÁ, E.L.S. Alterações microbianas no solo durante o ciclo do milho nos sistemas plantio direto e convencional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 8, p. 749-755, 2004.

VERMA S.C.; LADHA J.K.; TRIPATHI, A.K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of entophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, p. 127-141, 2001.

WU, S. C., CAO, Z. H., LI, Z. G., CHEUNG, K. C., WONG, M. H. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. **Geoderma**, Amsterdam, v. 125, p. 155-166, 2005.

6. EFEITO DA ADUBAÇÃO FOSFATADA SOBRE A DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS RIZOSFÉRICAS DA CANA-DE-AÇÚCAR

Resumo

A maioria dos trabalhos sobre fertilização fosfatada na cana-de-açúcar tem focado nos efeitos das dosagens e modos de aplicação sobre a produtividade, enquanto outros estudos têm relatado a viabilidade dos fosfatos de rocha e da torta de filtro sobre o aumento da sustentabilidade do sistema de produção. A dinâmica dessas fontes é complexa, principalmente quanto a disponibilização do P e sua imobilização nas frações do solo e na biomassa microbiana. A torta pode estimular a atividade dessa biomassa e, caso exerça influência na rizosfera, pode beneficiar bactérias associadas à cana-de-açúcar. Isso pode aumentar o P lábil no solo através da secreção de ácidos orgânicos e enzimas de origem microbiana. O objetivo desse trabalho foi estudar a diversidade de bactérias rizosféricas de cana-de-açúcar em resposta à torta de filtro e às fontes minerais de P (MAP, SFT e fosfato natural reativo - NAT). Essas comunidades foram acessadas por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA e os dados moleculares foram correlacionados com as frações de P das rizosferas. Os maiores teores de P lábil nas rizosferas ocorreram aos dois meses, estando correlacionados com as grandes abundâncias de Bacilli, Chloracidobacteria, e a divisão Halophaga/Acidobacterium (copiotróficos). Aos quatro meses, o P lábil diminuiu junto com a diversidade bacteriana, resultando no aumento da abundância de Actinobacteria e de Proteobacterias (oligotróficos). As β -Proteobacteria apresentaram maior correlação com a liberação de P em MAP+torta, possivelmente pelo aumento da mineralização, além de serem potenciais solubilizadoras de P-Ca juntamente com outras Proteobacteria em solos com NAT+torta, revelando a estimulação da comunidade microbiana pela torta de filtro.

Palavras-chave: *Saccharum* spp.; P lábil; Torta de filtro; Fertilizantes minerais; Diversidade bacteriana

Abstract

Most search on P fertilization in sugarcane have focused on the effects of dosages and application methods on productivity, while other studies have reported the feasibility of rock phosphates and the filter cake on the increased sustainability of production system. The dynamics of these sources is complex, especially as the availability and immobilization of P in soil fractions and microbial biomass. The filtercake can stimulate the activity of this biomass and, if he exercises influence in the rhizosphere, can benefit bacteria associated with sugarcane. This can increase the labile P in the soil by secreting organic acids and enzymes of microbial origin. The objective of this work was to study the diversity of rhizospheric bacteria of sugarcane in response to filtercake and mineral sources of P (phosphate: monoammonium - MAP; triple - SFT, and rock phosphate - NAT). These communities were accessed through the 16S rRNA gene, and molecular data were correlated with the P fractions of rhizosphere soil. The highest P leaving the rhizosphere occurred at two months, being correlated with the abundance of Bacilli, Chloracidobacteria classes, and the division Halophaga/Acidobacterium (copiotrophic). At four months, there was an overall reduction in labile P content and bacterial diversity, being correlated with increases in abundance of Actinobacteria and Proteobacteria in general (oligotrophic). The β -Proteobacteria showed a higher correlation with the P release in MAP+filtercake, possibly by increasing the mineralization, besides being potentially solubilizing P-Ca with other Proteobacteria in soils with NAT+filtercake, revealing the stimulation of the microbial community by the filter cake.

Keywords: *Saccharum* spp.; Labile P; Filtercake; Mineral fertilizers; Bacterial diversity

6.1. Introdução

O P é um dos elementos químicos mais importantes na transferência energética (ATP), na atividade enzimática e na síntese de ácidos nucleicos e de fosfolipídios em praticamente todas as formas de vida dos ecossistemas (MADIGAN et al., 2010). As concentrações e estados químicos desse elemento no solo podem variar com o material de origem, grau de intemperização, teores de Fe^{3+} e Al^{3+} e com a atividade da biomassa microbiana do solo (MOHAPATRA et al., 2013, XU et al., 2015). O conhecimento desses mecanismos é fundamental para assegurar a produtividade das culturas em solos onde há intensa fixação do P em frações orgânicas e inorgânicas (CALEGARI et al., 2013 TIECHER et al., 2012).

A fixação do P nos solos brasileiros e a expansão da cana-de-açúcar resultaram numa grande demanda de fertilizantes solúveis com disponibilidade limitada (CHILDERS et al., 2011). Portanto, se faz necessária a busca de fontes alternativas, como os biofertilizantes a base de rochas fosfáticas (DE BOLLE et al., 2013; KAUR & REDDY, 2015), e de substratos orgânicos, como a torta de filtro (SANTOS et al., 2014). Essas fontes podem estimular a atividade dos micro-organismos do solo (SANTOS et al., 2011) e elevar os teores de P orgânico lábil, beneficiando às plantas (TIECHER; RHEINHEIMER; CALEGARI, 2012).

De modo geral, a biomassa microbiana do solo constitui um importante reservatório de P imobilizado que, por não ser adsorvidos aos coloides do solo, permanece biodisponível às plantas (MORAIS & GATIBONI, 2015). A adição de materiais orgânicos e de fontes minerais ao solo pode estimular a mineralização do P por hidrólização de enzimas expressas por certos micro-organismos (KELLER et al., 2012). Dentre essas enzimas, as fitases e as fosfatases são as mais ativas em solos com baixos teores de P (MILLER et al., 2010). Essas podem ser sintetizadas por plantas, entretanto, as de origem microbiana são mais eficientes por apresentarem maior afinidade por compostos fosfatados (TARAFDAR et al. 2001). Os micro-organismos também podem solubilizar os fosfatos adsorvidos em rochas e às estruturas dos argilominerais, principalmente do fosfato de cálcio (KELLER et al., 2012; KAUR et al., 2015; LIU et al., 2015; WU et al., 2005). Esse mecanismo se deve a síntese de ácidos orgânicos e à liberação de íons H^+ no solo, solubilizado as formas mais recalcitrantes de P presentes no solo (RODRÍGUEZ et al., 2006 MOHAPATRA et al., 2013).

O número de micro-organismos capazes de expressar esses mecanismos é vasto e muitos gêneros podem se associar às plantas de cana-de-açúcar promovendo o seu desenvolvimento, como: *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* (INUI-KISHI et al., 2012; MIZRA et al., 2001; VERMA et al., 2001). Vários

trabalhos têm explorado o potencial de algumas dessas espécies para produção de inoculantes e de biofertilizantes associados com fontes minerais e às rochas fosfáticas (CHANG & YANG, 2009; KAUR & REDDY, 2015).

Apesar da compreensão desses mecanismos, pouco se sabe sobre o impacto da adubação fosfatada no arranjo das comunidades microbianas do solo, se destacando a zona rizosférica por ser submetida a intensa atividade metabólica das raízes e da biomassa microbiana (MOHAPATRA et al., 2013; TARAFDAR; YADAV; MEENA, 2001). Do mesmo modo, também é escasso o conhecimento sobre a aplicação de fontes orgânicas no solo, como a torta de filtro, que é amplamente utilizada como adubação de cobertura em cultivos comerciais de cana-de-açúcar (SANTOS et al., 2014). Entretanto, sabe-se que a torta estimula a atividade da biomassa microbiana do solo como um todo (RASUL et al., 2008).

Diante do exposto, o principal objetivo do presente estudo foi determinar a diversidade de bactérias associadas à rizosfera de cana-de-açúcar e o efeito temporal de diferentes fontes fosfatadas, na ausência e presença da torta de filtro, sobre a composição e diversidade microbiana deste micro-hábitat. Para tanto, o DNA total do solo rizosférico foi extraído para obtenção de *amplicons* da região conservada V6 do gene 16S rRNA, sendo posteriormente empregadas as técnicas moleculares de TRFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) (COURTNEY et al., 2012) e a análise dos dados de sequenciamento na plataforma de larga escala IonTorrent™.

6.2. Material e métodos

6.2.1. Descrição do estudo

O presente estudo foi baseado nas análises moleculares do material genético extraído do solo rizosférico coletado no estudo anterior (Capítulo 1). Desse modo, o mesmo delineamento experimental foi utilizado, considerando todas as amostras de solo rizosférico dos controles e dos tratamentos com fosfato natural reativo de Gafsa (NAT), com fosfato monoamônico (MAP) e com o superfosfato triplo, ambos com (+torta) ou sem (-torta) a torta de filtro. Os dados da massa seca (Ms), do N, P foliar e das diferentes frações de P na rizosfera foram correlacionados com os dados moleculares obtidos das rizosferas aos dois (60 dias), quatro (120 dias) e seis meses (180 dias) de desenvolvimento.

6.2.2. Extrações de DNA total do solo rizosférico

A extração e purificação do DNA total foi feita com 0,4 g de solo rizosférico utilizando o kit “PowerSoil” (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras com DNA purificado foram diluídas em 100 µL de solução C6 (vide protocolo Power Soil-MoBio) e estocadas a -80 °C. O DNA purificado foi quantificado com o kit comercial “Quant-iT PicoGreen”, Molecular Probes/Invitrogen - Carlsbad, CA, USA (SINGER et al., 1997).

6.2.3. Análise da estrutura microbiana por TRFLP

A estrutura da comunidade bacteriana foi avaliada por meio da técnica de TRFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*), em que o DNA extraído foi amplificado com os primers 926R (5'-CCG.TCA.ATT.CCT.TTR.AGT.TT-3') e 8fm-FAM (5'-AGA.GTT.TGA.TCM.TGG.CTC.AG-3'), referentes à região V6 do gene 16S rDNA (SCHÜTTE et al., 2009). O MIX de cada reação conteve 1 µL das amostras de suspensão de DNA (~50 ng), 3,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP (A, C, T e G), 0,2 pmol de cada primer, 2,5 U de Taq DNA polimerase e 5 µL PCR buffer (10X), completando o volume para 50 µL com água ultrapura autoclavada. As reações foram feitas no equipamento GENE Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) e as condições de reação foram: desnaturação inicial a 95 °C por 4 minutos seguida de 30 ciclos desnaturação a 95 °C (30”), anelamento a 57 °C (30”), extensão a 72 °C (45”) e extensão final a 72 °C (10”).

Os produtos foram precipitados em placas de 96 poços (MicroAmp, AppliedBiosystems) com a adição de 200 µL de isopropanol (100%) por amostra, seguido de incubação por 2 horas à temperatura de -20 °C e centrifugação a 4000 rpm por 90 minutos (centrífuga Allegra™ 25R, Beckman Coulter™). O sobrenadante foi descartado o produto remanescente foi acrescido de 250 µL de solução de etanol (70%) gelado. As amostras foram novamente centrifugadas por 90 minutos e o sobrenadante descartado novamente. As placas foram secas a 45 °C por aproximadamente 30 minutos e o produto ressuspendido em 25 µL de água ultrapura autoclavada.

Após as precipitações, 10 µL dos produtos de PCR foram utilizados para o preparo da reação de digestão, adicionando-se 7,5 µL de água ultrapura autoclavada, 5,0 U da endonuclease HhaI e 10 µL de 10X BufferR (Fermentas™, São Paulo, Brasil). Os produtos foram mantidos a 37 °C durante 3 horas e o procedimento de purificação com isopropanol foi repetido. O material purificado foi finalmente ressuspendido em formamida HiDi e analisado

em sequenciador automático ABI Life 3500 (Applied Biosystems), utilizando matriz azul e o marcador padrão GS1200LIZ. Os dados de TRFLP foram analisados no software Gene Mapper® 4,1 pelo método AFLP na escala de azul, considerando os parâmetros de alelos, alturas, distâncias, áreas dos picos e threshold entre 50 a 1200 pb. As matrizes de TRFs foram importadas e os valores X transformados na escala Log (X+1).

6.2.4. Sequenciamento da região V6 do gene 16S rDNA

Os amplicons da região V6 do gene 16S rDNA foram obtidos por meio dos *primers* 967F (5'-CAA CGC GAA GAA CCT TAC C-3'), combinado com diferentes tags de 5 nucleotídeos, e 1046R (5'-CGA CAG CCA TGC ANC ACC T-3') (SOGIN et al. 2006). A reação de amplificação foi feita em 2,5 µL de tampão de PCR (1X) acrescentando 3,0 mM de MgCl₂, 200,0 µM de dNTP, 0,2 µM de cada primer e 1,0 U de Taq DNA polimerase (Fermentas, São Paulo, Brasil), ajustando para um volume final de 50 µL com água ultrapura autoclavada.

Os amplicons foram purificados com o kit ChargeSwitch® PCR Clean-Up Kit (Life Technologies) e quantificados com Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies). O processo de sequenciamento foi realizado no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna, SP) no equipamento PGM IonTorrent™ usando o Ion 316™ Chip v.2 (Ion Sequencing Kit User Guide v.2.0, Life Technologies, EUA), de acordo com Kavamura et al. (2013).

6.2.5. Análises estatísticas multivariadas e de bioinformática

As análises de dissimilaridades dos perfis bacterianos, oriundos das matrizes de Log (TRFs+1), foram feitas no software R usando a análise de coordenadas principais (PCoA) com base no algoritmo de Bray-Curtis (RAMETTE et al., 2007). Essas análises foram conduzidas com auxílio do pacote 'vegan' (OKSANEN et al., 2011). A análise de ANOSIM foi utilizada para o estudo dos efeitos biológicos dos tratamentos sobre a separação das comunidades microbianas, refletindo a diferença na classificação das similaridades entre e dentro os grupos *a priori* por meio de uma correlação R (CLARKE & GREEN, 1988). Deste modo, Clarke e Gorley (2001), as comunidades foram classificadas em: a) distanciadas ($R > 0,7$); b) distanciadas com sobreposições ($0,5 < R < 0,7$); c) aproximadas ($R < 0,5$).

Os dados do sequenciamento foram analisados no software QIIME (*Quantitative Insights*

Into Microbial Ecology) (CAPORASO et al., 2010). A remoção das sequências de baixa qualidade (50 pb), dos primers e dos barcodes foi feita com o comando *split_libraries.py*. As sequências de alta qualidade foram classificadas em UTOs pelo método UCLUST usando o limiar de 97% de identidade de nucleotídeos (EDGAR, 2010). Para minimizar os efeitos de amostragem a tabela de UTOs foi rarefeita para 8.000 sequências por amostra (menor número encontrado em uma amostra). As sequências representativas para cada UTO foram submetidas as análises filogenéticas com o algoritmo de alinhamento *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) com referência na coleção de UTOs do Greengenes 13.8 (97%) (MCDONALD et al., 2012).

Todas as análises descritivas e multivariadas dos dados tratados no QIIME foram computadas na plataforma R 3.2.5 (R Development Core Team - 2016). Os dados das UTOs encontradas foram usados para gerar as matrizes de distância pelo algoritmo de Bray-Curtis (weighted/unweighted UniFrac distance) e as métricas de alpha e beta-diversidade (*Shannon-Weaver diversity index*) (BRAY & CURTIS 1957; LOZUPONE & KNIGHT, 2007). As matrizes com as frequências dos táxons também foram utilizadas para se avaliar o distanciamento de grupos dentro dos filos e das classes em cada amostra.

As análises de coordenadas principais (PCoA) foram feitas com recursos do pacote ‘vegan’ (OKSANEN et al., 2011) e os índices de alfa e beta-diversidade e as análises de network foram estimados através do pacote ‘phyloseq’, possuindo dependência dos pacotes ‘scales’, ‘ggplot2’ e ‘grid’. As contribuições das principais classes para a variação entre os tratamentos foram analisadas pelo teste de percentagem de dissimilaridade (SIMPER) no software PAST 3.12 (HAMMER et al., 2001). Por fim, os pacotes ‘pathview’ e ‘Tax4Fun’ foram utilizados para predições metagenômica com base no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, tendo como referência o banco de dados SILVA 119 (ABHAUER et al., 2015).

6.3. Resultados

6.3.1. Efeitos das fontes de P sobre a estrutura bacteriana da rizosfera

Os resultados revelaram que tanto a torta de filtro como as fontes minerais de P exerceram mudanças na composição das comunidades bacterianas da rizosfera (**Figura 4**). O efeito da torta de filtro sobre as comunidades foi mais intenso em solos com fontes minerais e menos variável nos solos controle. As avaliações dos eletroferogramas da técnica de TRFLP (por ANOSIM) revelaram diversas separações entre os tratamentos (**Tabela 4**)

Figura 4 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA) mostrando diferenciações entre as comunidades de bactérias rizosféricas de cana-de-açúcar aos 2 (A), 4 (B) e 6 meses (C) após plantio com os tratamentos: sem fontes minerais (Testemunha); fosfato monoamônico (MAP); superfosfato triplo (SFT); e fosfato natural reativo (NAT) - sem (ST) e com torta de filtro (CT). Dados baseados na análise de TRFLP.

Tabela 4 - Distância das comunidades bacterianas rizosféricas da cana-de-açúcar aos 2, 4 e 6 meses sob ausência (ST) e a presença (CT) da torta de filtro em microcosmos sem fontes minerais (sem); com fosfato natural reativo (NAT); fosfato monoamônico (MAP); e superfosfato triplo (SFT). Os valores representam as correlações de ANOSIM obtidas com base nas matrizes de distância Bray-Curtis para os eletroferogramas dos fragmentos de restrição terminal (TRFLP).

		CT				ST			
		MAP	SFT	NAT	sem	MAP	SFT	NAT	sem
		0	0	0	0	0	0	0	0
2 meses	CT	MAP	0.81	0.44	1.00	0.19	0.89	0.37	1.00
		SFT	0	0.37	0.85	0.70	0.33	-0.11	0.63
		NAT		0	1.00	0.85	0.48	0.26	1.00
		sem			0	1.00	0.93	0.11	0.56
	ST	MAP				0	0.85	0.48	1.00
		SFT					0	0.33	0.63
		NAT						0	0.37
		sem							0
4 meses	CT	MAP	0	0.85	0.74	0.37	0.11	0.48	0.56
		SFT	-0.04	0.78	1.00	0.89	-0.11	0.48	0.37
		NAT		0	1.00	0.96	0.78	0.37	0.22
		sem			0	0.11	1.00	1.00	0.96
	ST	MAP				0	0.89	0.89	0.74
		SFT					0	0.41	0.41
		NAT						0	0.30
		sem							0
6 meses	CT	MAP	0	0.59	1.00	0.67	1.00	0.96	0.85
		SFT	-0.11	0.04	0.48	0.11	0.59	-0.04	0.81
		NAT		0	1.00	1.00	1.00	0.96	0.96
		sem			0	0.63	0.44	0.52	0.30
	ST	MAP				0	0.85	0.48	0.63
		SFT					0	0.93	0.04
		NAT						0	0.59
		sem							0

* Intervalos: 0.5<R - sem separação; 0.5<R<0.7 - separação com sobreposição; R>0.7 separação sem sobreposição (realçados).

A análise de coordenadas principais (PCoA) mostrou, com uma explicação de 68% da variação total, que as comunidades bacterianas das rizosferas com MAP aos 2 meses foram as mais alteradas, principalmente quando este foi aplicado junto à torta de filtro. Essas comunidades se distanciaram sem sobreposições em comunidades de bactérias das rizosferas sem fontes minerais (Testemunhas) e com SFT ($R_{ANOSIM} > 0,7$) (Figura 4.A; Tabela 4).

A PCoA dos dados dos quatro meses demonstrou (explicação de 54%) que as comunidades de solos com fontes mais solúveis de P (SFT e MAP) tenderam a se diferenciar mais das comunidades de solos sem fontes de P-mineral e com NAT (tracejado em vermelho). Ainda foi observado que a adição apenas da torta de filtro ao solo ocasionou mudanças na comunidade bacteriana ($R_{ANOSIM} = 0,96$). Nesse período, as comunidades em MAP+torta também se distanciaram de NAT+torta ($R = 0,85$), de testemunha+torta ($R = 0,74$) e de testemunha-torta ($R = 0,56$, sobreposição). As comunidades de MAP-torta também se distanciaram de SFT-torta ($R = 0,89$), NAT-torta ($R = 0,89$) e testemunha-torta ($R = 0,74$), revelando um efeito diferenciado do MAP sobre a estrutura microbiana da rizosfera (**Figura 4.B; Tabela 4**).

No sexto mês a PCoA demonstrou, com uma explicação de 41%, que as comunidades de solos tratados simultaneamente com fontes minerais e torta de filtro se distanciaram das demais (tracejado em vermelho). Foi visto ainda que a estrutura da comunidade bacteriana dos solos tratados com NAT+torta representou a maior mudança observada, se distanciando da testemunha absoluta e de todos os outros tratamentos sem a torta de filtro ($R_{ANOSIM} > 0,7$) (**Figura 4.C; Tabela 4**). Em seguida, as maiores mudanças ocorreram nos solos tratados com MAP+torta e SFT+torta, ambos se distanciaram da testemunha absoluta ($R > 0,7$). Vale ressaltar que, no sexto mês, MAP+torta também se distanciou sem sobreposições de SFT-torta, de NAT-torta, de MAP-torta (com sobreposição) e da testemunha (com ausência e presença da torta de filtro), revelando grande influência da torta de filtro sobre o MAP para modificar a estrutura das comunidades bacterianas da rizosfera. Além disso, as comunidades não se distanciaram significativamente entre os microcosmos testemunha com e sem torta ($R_{ANOSIM} = 0,3$).

De modo geral, observando todos os períodos, as combinações da torta de filtro com MAP ou NAT levaram as maiores mudanças na estrutura bacteriana da rizosfera das plantas de cana-de-açúcar. A estrutura das comunidades do segundo e do sexto mês foram semelhantes, com efeitos mais nítidos do MAP, SFT e NAT quando aplicados com a torta de filtro. Isso sugere a ocorrência de um processo de readaptação ou seleção de novos grupos bacterianos em função das alterações químicas que ocorreram gradualmente nas rizosferas.

6.3.2. Diversidade microbiana por inferência do gene 16S rDNA

Os dados de sequenciamento obtidos por sequenciamento no IonTorrentTM foram recuperados de 72 diferentes amostras (*Ion tags*) retornando um total de 2.937.563 sequências

brutas com tamanho médio de 230 pb. Após o tratamento com o comando *split_libraries.py*, 1.836.510 sequências com tamanho médio de 187 pb foram anotadas, eliminando amostras com menos de 8 mil sequências (rarefação), restando 67 amostras (93% do total). As sequências das rizosferas tratadas com superfosfato triplo sem torta de filtro (SFT-torta) aos dois meses foram todas desconsideradas por apresentarem baixa quantidade de informações (< 150 sequências).

Com base nas sequências tratadas, os índices de diversidade de Shannon-Weaver (H') revelaram uma composição mais diversificada de espécies nas rizosferas do segundo e sexto mês, com valores H' entre 6,5 e 7,0. No quarto mês, com exceção das rizosferas com SFT+torta, houve uma redução geral da diversidade bacteriana, com valores H' predominantemente menores do que 6,5 (**Figura 5**).

Figura 5 - Alteração da Alfa-diversidade na rizosfera da cana-de-açúcar aos 2 (A), 4 (B) e 6 (C) meses após plantio em resposta aos tratamentos: sem fontes minerais (Control ou T); fosfato monoamônico (MAP); superfosfato triplo (SFT); e fosfato natural reativo (NAT) - sem (ST) e com torta de filtro (CT). A diversidade foi quantificada pelo índice de Shannon (H') com base nas UTOs encontradas a 97% de similaridade.

Aos dois meses, estudando cada fonte mineral de P isoladamente, não houve grande variação da diversidade em função da aplicação da torta de filtro nos microcosmos (**Figura 5.A**). Neste caso, aos dois meses, os valores médios gerais de H' para os microcosmos testemunha, com NAT, MAP e SFT foram 6,74, 6,71, 6,84 e 6,84, respectivamente. Esses valores foram os maiores índices de diversidade registrados em todo o experimento. Assim, cada microcosmo apresentou a mediana dos valores H' superior ao seu correspondente no quarto e sexto mês. No geral, isso significa que no segundo mês mais de 50% das rizosferas

acessadas apresentaram diversidade superior as que foram encontradas no sexto e, principalmente, no quarto mês.

No quarto mês foi observado que mais de 75% das comunidades acessadas nos microcosmos com NAT+torta tiveram valores de H' entre 5,0 a 6,15 (**Figura 5.B**). Esses foram os menores índices de todo experimento, com média igual a 5,78. Já o microcosmo NAT-torta apresentou 100% das suas comunidades com índices H' acima desses valores, apresentando uma média igual a 6,28. O microcosmo SFT+torta foi o que apresentou maior diversidade aos dois meses ($H' = 6,57$), seguido por MAP+torta ($H' = 6,43$) e MAP-torta ($H' = 6,40$).

Aos seis meses, foi observada a menor variabilidade na diversidade bacteriana entre os microcosmos no geral, com os valores H' predominantemente entre 6.5 e 6.8 (**Figura 5.C**). Isso sugere a estabilização temporal na estrutura das comunidades bacterianas em resposta à adição de diferentes fontes minerais de P e da torta de filtro, havendo maiores mudanças provocadas pelos tratamentos no quarto mês após o plantio.

6.3.3. Abundâncias dos principais grupos bacterianos em função do tempo

Em todos os casos, a estrutura das comunidades bacterianas foi modulada, principalmente, pela variação na abundância de UTOs atribuídas aos filos Acidobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi, Firmicutes, Proteobacteria e Verrucomicrobia (**Figura 6**).

Os resultados revelaram interações mais complexas nas estruturas das comunidades bacterianas em rizosferas do segundo (**Figura 6.A**) e sexto mês (**Figura 6.C**), em comparação com as do quarto mês (**Figura 6.B**). No quarto mês, devido à menor diversidade de grupos distintos houve o predomínio específico de membros pertencentes aos filos Proteobacteria, Acidobacteria e Verrucomicrobia. Nos gráficos de network também é possível se observar que o segundo e o sexto mês têm em comum uma grande abundância de organismos do filo Firmicutes, pertencentes principalmente a classe Bacilli.

No geral, a ordem de predominância dos filos bacterianos diferiu entre os estádios fenológicos da cultura. Aos dois meses, os principais filos predominantes em ordem decrescente foram Proteobacteria (39,1%), Acidobacteria (14,2%), Firmicutes (14,0%), Actinobacteria (11,9%), Verrucomicrobia (7,4%) e Chloroflexi (5,4%). Dentre esses foram predominantes as classes Alphaproteobacteria (17,4%), Bacilli (12,5%), Betaproteobacteria (10,5%), Actinobacteria (9,0%), Deltaproteobacteria (8,2%), Acidobacteria (3,9%) e Spartobacteria (3,7%).

Figura 6 - Composição geral das comunidades bacterianas na rizosfera aos 2 (A), 4 (B) e 6 (C) meses após os plantios das mudas de cana-de-açúcar. A estruturas em network referentes aos 2 e 4 meses refletem uma maior complexidade de interações em virtude da maior diversidade de grupos existentes em comparação a estrutura do quarto mês.

Aos quatro meses, foram predominantes os filos Proteobacteria (33.3%), Acidobacteria (20.5%), Verrucomicrobia (16.6%), Actinobacteria (11.9%), Firmicutes (9.2%) e Chloroflexi (2.5%). Dentre esses foram predominantes as classes Alphaproteobacteria (13,9%), Betaproteobacteria (11,6%), Acidobacteriia (10,4%), Spartobacteria (9,7%), Actinobacteria (9,1%), Bacilli (8,1%) e Pedosphaerae (6,0%).

Aos seis meses, foram predominantes os filos Proteobacteria (30,4%), Firmicutes (18,8%), Actinobacteria (14,6%), Acidobacteria (12,7%), Chloroflexi (7,2%) e Verrucomicrobia (6,4%). As classes em destaque foram Bacilli (17,2%), Alphaproteobacteria (16,6%), Actinobacteria (16,4%), Deltaproteobacteria (12,3%), Betaproteobacteria (13,0%), Anaerolineae (10,2%) e Acidobacteria-6 (9,2%).

6.3.4. Abundâncias dos grupos bacterianos em função dos tratamentos

Aos dois meses, houve a predominância absoluta de micro-organismos do filo Firmicutes na rizosfera de cana-de-açúcar, em todos os microcosmos estudados (**Figura 7.A**).

Figura 7 - Abundância total das principais classes bacterianas associadas às rizosféricas de cana-de-açúcar aos 2 (A), 4 (B) e 6 meses (C) após o plantio e tratamentos com: fosfato monoamônico (MAP); superfosfato triplo (SFT); fosfato natural reativo (NAT); e testemunha (Control ou T); ambos testados com (CT) e sem (ST) a torta de filtro. *Valores nos eixos das ordenadas estão em número absoluto (UTOs).

Dentre as classes pertencentes a esse filo, Bacilli foi a predominante enquanto Clostridia, abundante em ambientes rizosféricos, não foi igualmente expressiva. Ainda aos dois meses, a

população de Bacilli foi predominante nos microcosmos controle e com fosfato natural reativo (NAT) e menos expressiva em microcosmos com as fontes minerais mais solúveis (MAP e SFT), evidenciando uma influência mais direta das fontes de P sobre as comunidades bacterianas. A torta de filtro não demonstrou nitidamente as mesmas influências nesse período.

Ainda aos dois meses, independentemente da aplicação da torta de filtro, nas rizosferas de microcosmos com MAP foram encontradas as maiores abundâncias de Acidobacteria, se destacando as classes Chloracidobacteria e Sva0725 (divisão Halophaga/Acidobacterium). Essas rizosferas com MAP foram as únicas onde a população de Acidobacteria foi maior do que a de Proteobacteria. Os microcosmos com superfosfato triplo (SFT) foram os que apresentaram a maior população de Proteobacteria, predominando α -Proteobacteria, diferente dos microcosmos controle (**Figura 7.A**).

Aos quatro meses, ainda foram observadas as maiores mudanças na estrutura e composição das comunidades de bactérias em microcosmos com fontes minerais de P. Nesse período, com relação ao segundo mês, houve um aumento da abundância das classes Acidobacteriia e Acidobacteria-5 em praticamente todos os microcosmos. No geral, as populações de Acidobacteria e de Proteobacteria deixaram de ser as mais abundantes, passando a predominar as espécies do filo Verrucomicrobia, em especial as das classes Pedosphaerae e Spartobacteria, com exceção dos microcosmos NAT+torta e MAP+torta (**Figura 7.B**).

Nos microcosmos com NAT+torta a abundância de β -Proteobacteria foi maior do que a de todas as outras classes bacterianas juntas no quarto mês. Nesse caso também, a população de Firmicutes foi a menor encontrada, contrastando com as demais rizosferas. Resposta semelhante foi observada nas comunidades de microcosmos com MAP+torta, se tratando do microcosmo com a segunda maior população de Proteobacteria e a segunda menor população de Firmicutes depois de NAT+torta, ambos ainda no quarto mês. Nesse período, a terceira maior população de Proteobacteria foi encontrada no microcosmo SFT+torta, revelando que a torta de filtro beneficia o crescimento dessas bactérias, principalmente β -Proteobacteria, que no geral apresentou baixa abundância em rizosferas sem torta.

No quarto mês também foram observadas as maiores abundâncias de Actinobacterias de todos os períodos avaliados, em especial nos microcosmos com NAT e MAP sem torta de filtro. Por outro lado, nos microcosmos com NAT+torta e MAP+torta a abundância de Actinobacterais foi a menor registrada para o quarto mês. As abundâncias de Actinobacterias também foram altas em microcosmos controle do quarto mês, mas não apresentaram grandes

variações em função da adição da torta de filtro, indicando maior efeito dessa fonte com os adubos fosfatados.

Aos seis meses, a população de Bacilli foi a mais abundante dentre as classes em todos os microcosmos e a composição das comunidades microbianas se assemelharam às encontradas no segundo mês (**Figura 7.C**). Outra semelhança com o segundo mês foi na abundância das classes de Acidobacteriais Sva0725 e Chloracidobacteria, que foram menores do quarto mês.

Analisando as 20 classes mais abundantes, foram confirmadas as semelhanças entre estrutura e composição das comunidades bacterianas do segundo com as do sexto mês (**Figura 8**). Essas, inclusive, demonstraram semelhanças com a composição da comunidade do solo utilizado no experimento antes da adição da torta de filtro e das fontes minerais (*Bulk Soil*).

Figura 8 - Abundância relativa das 20 principais classes bacterianas encontradas na rizosfera de cana-de-açúcar aos 2, 4 e 6 meses após plantio. A mudança na composição das classes foi comparada com o *Bulk Soil* (esquerda) - solo antes dos tratamentos com as fontes de fósforo: fosfato monoamônico MAP); superfosfato triplo (SFT); fosfato natural reativo (NAT); testemunha (Control ou T); COM torta de filtro (CT); e SEM torta de filtro (ST).

Com relação ao quarto mês, vários contrastes foram observados: **1º)** A composição das comunidades bacterianas em microcosmos controle variaram pouco em função da adição da torta de filtro; **2º)** A abundância de Acidobacterias aumentou e a de Bacilli, δ -Proteobacteria, Anaerolineae e Acidimicrobiia diminuíram em todos os microcosmos do quarto mês, com relação ao segundo e sexto mês; **3º)** A torta de filtro aumentou a abundância de β -Proteobacteria e δ -Proteobacteria nos microcosmos NAT e MAP; **4º)** A torta de filtro reduziu a abundância de Spartobacteria, Pedosphaerae e Sva0725 nos microcosmos NAT e MAP.

6.3.5. Relações dos grupos bacterianos com o desenvolvimento das plantas

Aos dois meses, os teores de N, P e massa seca foliar (Ms) apresentaram correlações diretas com as classes β -Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteriia e α -Proteobacteria, estando esses grupos mais diretamente associados aos microcosmos com MAP+torta e NAT+torta (**Figura 9.A**).

Por outro lado, as classes Clostridia Spartobacteria, Pedosphaerae, Chloracidobacteria e Bacilli se correlacionaram negativamente às variáveis N, P e Ms, sendo mais abundantes em microcosmos sem a torta de filtro.

Aos quatro meses, os teores de P foliar e o ganho de massa vegetal se correlacionaram positivamente com as classes β -Proteobacteria, γ -Proteobacteria, δ -Proteobacteria e Acidobacteria-6, estando mais associadas aos microcosmos com fontes minerais mais solúveis (MAP e SFT) (**Figura 9.B**). Um fenômeno único do quarto mês foi o fato das variáveis P e Ms se correlacionarem negativamente com o incremento de N foliar. Este, por sua vez, apresentou correlações positivas com as classes Bacilli, Clostridia, Spartobacteria, Acidimicrobia, α -Proteobacteria e Actinobacteria, com associações mais próximas a microcosmos controle e com fosfato natural reativo.

Aos seis meses, as variáveis N, P e Ms se correlacionaram positivamente com um número maior de classes, se destacando Actinobacteria, Acidobacteria-6, Thermoleophilia, δ -Proteobacteria e Sva072 (**Figura 9.C**). Neste caso, os teores de N, P foliar e o ganho de massa voltaram a se correlacionar positivamente. Essas classes juntamente com as variáveis N, P e Ms se correlacionaram negativamente com os microcosmos testemunha sem torta de filtro, onde houve predomínio das classes β -Proteobacteria, γ -Proteobacteria, Clostridia e Bacilli.

Figura 9 - Análise de Correlações Canônicas (CCA) da massa seca (Ms) e dos teores nitrogênio (N) e fósforo (P) foliar com as classes bacterianas mais abundantes na rizosfera de cana-de-açúcar aos 2 (A), 4 (B) e 6 (C) meses após plantio. Tratamentos: fosfato monoamônico (MAP); superfosfato triplo (SFT); fosfato Natural Reativo (NAT); e testemunha (T); COM (CT) e sem (ST) torta de filtro.

Os resultados ainda revelaram que a classe Bacilli foi a mais alterada em função das diferentes fontes minerais aplicadas ao solo (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Contribuição das principais classes bacterianas na rizosfera de cana-de-açúcar cultivada em microcosmos com diferentes adubos fosfatados COM e SEM a torta de filtro após **2, 4 e 6 meses**. Ausência e presença da torta de filtro foram testadas em cada um dos seguintes microcosmos: controle (T, SEM fontes minerais); com fosfato natural reativo de Gafsa (NAT); com fosfato monoamônico (MAP); e com superfosfato triplo (SFT). A contribuição geral é dada em ordem decrescente pela Dissimilaridade Média (DM%) e a contribuição dentro de cada grupo pela Abundância Média (%), de acordo com os resultados da análise de SIMPER.

Classes	DM %*	Cumulativo %	Abundância Média %			
			Control	NAT	MAP	SFT
2 meses - COM torta de filtro						
Bacilli	20.8	20.8	13.4	16.1	10.5	8.7
Betaproteobacteria	11.4	32.2	9.9	8.9	9.1	13.7
Alphaproteobacteria	7.4	39.7	17.6	15.4	15.1	17.3
Actinobacteria	6.1	45.7	8.3	9.6	8.6	8.9
Deltaproteobacteria	5.5	51.2	7.1	7.8	9.2	9.2
Sva0725	3.8	55.1	1.3	2.5	3.3	2.3
2 meses - SEM torta de filtro						
Bacilli	15.4	15.4	12.0	15.6	11.3	10.0
Alphaproteobacteria	10.1	25.4	20.7	15.7	15.9	18.0
Actinobacteria	9.9	35.4	11.0	9.7	7.2	7.1
Betaproteobacteria	8.6	44.0	8.7	9.0	10.2	12.2
Spartobacteria	4.1	48.2	3.9	4.9	3.6	3.8
Chloracidobacteria	3.9	52.0	2.5	2.2	3.0	3.4
Sva0725	3.8	55.8	1.5	1.8	3.5	1.8
4 meses - COM torta de filtro						
Bacilli	31.1	31.1	3.9	36.6	22.1	12.5
Betaproteobacteria	10.0	41.1	12.3	2.8	4.4	8.4
Alphaproteobacteria	6.7	47.7	14.8	10.2	11.6	12.3
Actinobacteria	5.4	53.2	6.8	2.0	2.6	5.8
Deltaproteobacteria	5.3	58.5	11.3	5.5	9.8	9.3
Sva0725	5.0	63.5	9.4	10.4	6.2	7.2
4 meses - SEM torta de filtro						
Bacilli	12.4	12.4	10.7	5.8	6.5	OBS
Alphaproteobacteria	11.3	23.7	15.3	13.7	15.2	-
Actinobacteria	11.3	34.9	13.7	12.6	9.7	-
Betaproteobacteria	9.9	44.8	6.0	9.3	7.3	-
Spartobacteria	8.5	53.3	8.0	9.2	10.8	-
Chloracidobacteria	5.5	58.8	11.8	10.1	11.4	-
Sva0725	5.3	64.1	3.2	4.5	4.8	-
6 meses - COM torta de filtro						
Bacilli	9.6	9.6	17.6	17.4	17.6	19.6
Betaproteobacteria	8.4	17.9	11.9	10.0	11.0	10.6
Alphaproteobacteria	7.1	25.0	3.3	6.3	5.1	4.1
Actinobacteria	6.1	31.1	2.9	2.9	3.1	3.0
Deltaproteobacteria	5.6	36.7	13.6	12.7	11.5	12.9
Sva0725	5.2	41.9	5.1	5.9	5.7	5.6
Chloracidobacteria	4.2	46.1	0.6	1.1	2.4	2.3
6 meses - SEM torta de filtro						
Bacilli	12.8	12.8	12.5	5.8	5.5	5.1
Alphaproteobacteria	8.5	21.3	16.8	14.0	14.6	16.3
Actinobacteria	8.4	29.7	8.6	12.9	10.6	12.5
Betaproteobacteria	7.0	36.7	12.0	14.9	15.5	14.0
Spartobacteria	5.3	42.0	3.1	3.4	5.3	4.3
Chloracidobacteria	4.6	46.6	1.4	1.8	1.9	2.3

*DM - Dissimilaridade Média % (Contribuição de variabilidade).

OBS: Esses valores não foram recuperados devido as sequências não passarem pelo teste de qualidade, de acordo com pipeline seguido no QIIME software.

Aos dois meses, na presença da torta de filtro, foi possível observar a contribuição da classe Bacilli nos microcosmos controle (13%) e com fosfato natural (16%) enquanto para MAP e SFT representaram apenas 10,5% e 8,7%, respectivamente. O mesmo foi observado na ausência da torta: controle – 12%; NAT – 15,6%; MAP - 11,3%; SFT – 10,0%.

Aos quatro meses, foram observados valores de abundância de Bacilli contrastantes entre os microcosmos com e sem torta de filtro. Na presença da torta de filtro as contribuições de espécies de Bacilli em NAT (37%) e MAP (22%) foram superiores as rizosferas controle (3,9%) e com SFT (12,5%). Nesse período, 4 meses com torta de filtro, foi observada a maior abundância de Bacilli de todo o experimento, contribuindo com 31% do total de espécies. Em contraste, nos microcosmos sem torta de filtro (quarto mês) as contribuições de espécies de Bacilli estiveram entre as menores observadas em todo o experimento: controle – 10,7%; NAT – 5,8%; MAP – 6,5%.

Aos seis meses, nas rizosferas com torta de filtro, Bacilli contribui com 9,6% do total de classes. Essa contribuição se destacou principalmente nas rizosferas com SFT+torta (20%) em contraste com controle, NAT e MAP, que apresentaram contribuições equivalentes (~17%). Na ausência da torta de filtro, a contribuição da classe Bacilli no quarto e sexto mês foram semelhantes entre si (~12%).

Além das contribuições da classe Bacilli, os resultados revelaram que a torta de filtro variou, principalmente, a participação de espécies da classe β -Proteobacteria de modo semelhante em todos os períodos. No geral, em microcosmos com torta de filtro a contribuição de β -Proteobacteria foi maior na ausência de fontes minerais de P (controle). Em rizosferas sem a torta de filtro esse quadro se inverteu e houve uma maior contribuição de β -Proteobacteria em todos os microcosmos com fontes minerais (**Tabela 5**).

Diante desses resultados, em todos os períodos estudados, o perfil dos principais grupos afetados pelas mudanças nas fontes minerais em solos com a torta de filtro foi: Bacilli (20%), β -Proteobacteria (10%), α -Proteobacteria (7%), Actinobacteria (6%), δ -Proteobacteria (5,5%) e Sva0725 (4,7%); e em solos sem a torta de filtro foi: Bacilli (13%), α -Proteobacteria (10%), Actinobacteria (9,8%), β -Proteobacteria (8,5%), Spartobacteria (6%) e Chloracidobacteria (4,7%).

6.3.6. Correlações dos grupos bacterianos com as frações de P na rizosfera

Aos dois meses, foi possível observar correlações positivas das β -Proteobacteria e δ -Proteobacteria com a principal fração de P lábil nos solos (P_{IRTA}) (**Figura 10.A**).

Figura 10 - Análises de Correlações Canônicas (CCA) entre as frações orgânicas (Po) e inorgânicas (Pi) de P com as classes bacterianas mais abundantes nas rizosferas de cana-de-açúcar aos 2 (A), 4 (B) e 6 (C) meses após o plantio com diferentes fontes de P: fosfato monoamônico (MAP); superfosfato triplo (SFT); fosfato Natural Reativo (NAT); e testemunha; COM (CT) e sem (ST) torta de filtro. Frações de P com diferentes estados de labilidade foram acessadas pelo uso sequencial de reagentes com poder extrator crescente: 1) P-lábil - Resina de Troca de Ânions (RTA) e NaHCO_3 (BIC); 2) P-moderadamente-lábil - NaOH 0,1 mol L^{-1} (NaOH.01) e HCl 0,1 mol L^{-1} (HCL); 3) P-não-lábil - NaOH 0,5 mol L^{-1} (NaOH.05) e $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ (P residual - PRES).

Isso revela um maior desenvolvimento desses grupos em rizosfera com mais P disponível na solução do solo, comum nos microcosmos com MAP e SFT aos dois meses. Essas classes se distanciaram da classe Actinobacteria, que não demonstrou dependência direta das fontes lábeis de P no solo. A classe Bacilli se distanciou de todas as outras e, juntamente com Actinobacteria, apresentou maior correlação com o P moderadamente lábil ligado ao Ca (extraído com HCl - P_{iHCL}), sendo mais abundantes em microcosmos com fosfato natural reativo (rico em Ca).

Aos quatro meses, foi observada nítida separação das comunidades de microcosmos com torta de filtro mais fontes minerais de P (NAT, MAP e SFT) dos demais (**Figura 10.B**). As classes β -Proteobacteria e δ -Proteobacteria continuam a ser mais abundantes nesses microcosmos devido aos maiores teores de P_{IRTA} encontrados. Além disso, β -Proteobacteria foi a mais correlacionada com os teores de P_{iHCL} e, conseqüentemente, com o fosfato natural reativo junto com a torta de filtro. Com as abundâncias se correlacionando negativamente com as das Proteobacterias mencionadas, as classes Clostridia, Bacilli, Spartobacteria, Pedosphaerae e Acidobacteria-5 foram mais predominantes em microcosmos sem torta de filtro, onde os teores de frações orgânicas não lábeis de P foram maiores (P_{RES} , $P_{ONaOH.05}$, $P_{ONaOH.05}$) e os de P_{IRTA} foram menores.

Aos seis meses, as frações inorgânicas de P lábil e moderadamente lábil (P_{IRTA} , P_{iBIC} e P_{iHCL}) estiveram mais correlacionadas com a torta de filtro e beneficiaram mais o desenvolvimento de espécies pertencentes as classes δ -Proteobacteria, clostridia, Bacilli, Thermophila e Chloracidobacteria (**Figura 10.B**). Ao contrário do segundo e quarto mês, a classe β -Proteobacteria apresentou maior correlação com microcosmos sem fontes de P (controle), também estando mais correlacionada as frações de P com menor estado de labilidade.

6.3.7. Predições metagenômicas com base no gene 16S rRNA

As predições metagenômicas com base no gene 16S rRNA evidenciaram alterações nos perfis metagenômicos das comunidades bacterianas da rizosfera (**Figura 11**). No segundo mês, não foram observadas grandes mudanças nos perfis metagenômicos das comunidades, a não ser o agrupamento entre tratamentos com superfosfato triplo, apontando para um maior efeito das fontes minerais de P nesse período (**Figura 11.A**). No quarto mês, as predições apontaram para uma forte mudança no perfil metagenômico das rizosferas, havendo forte influência tanto da torta de filtro quanto das fontes minerais de P (**Figura 11.B**). Entretanto, os tratamentos

controle com e sem torta de filtro não se distanciaram entre si. Aos seis meses, os perfis metagenômicos de tratamentos com e sem torta de filtro, inclusive nos controles, demonstraram separações (**Figura 11.C**). Nesse período (6 meses), as aproximações entre os diferentes tratamentos minerais evidenciaram menor contribuição desses para a diferenciação dos perfis metagenômicos preditos.

Figura 11 - Análise de Escalonamento Multim dimensional Não Métrico (NMDS) mostrando diferenças nos perfis funcionais das comunidades bacterianas da rizosfera de cana-de-açúcar aos 2 (A), 4 (B) e 6 meses (C) após plantio com os tratamentos: sem fontes minerais (Testemunha); fosfato monoamônico (MAP); superfosfato triplo (SFT); e fosfato natural reativo (NAT) - sem (ST) e com torta de filtro (CT). Os valores de estresse indicam a precisão no ajuste da ordenação: $0,1 \leq \text{Stress} \leq 0,2$ - razoável; $0,05 \leq \text{Stress} \leq 0,1$ - bom; $\text{Stress} < 0,5$ - excelente. Baseados na análise de predição dos perfis funcionais de 16S rRNA.

A comparação entre as principais classes com os respectivos perfis metagenômicos mais abundantes demonstrou correlações mais altas no quarto mês (**Figura 12**). No segundo mês, as classes β -Proteobacteria, γ -Proteobacteria apresentaram maiores correlações com as predições relacionadas aos processos de identificação de certos elementos por bactérias Gram-negativas, estando mais relacionados com o transporte de Fe^{3+} por sideróforos (K02014), a resistência a altas concentrações de Co^{2+} , Zn^{2+} e Cd^{2+} (K15726) e a síntese de proteínas quimiotáticas aceptoras de metil (MCP), que funcionam como detectores das concentrações de moléculas na matriz extracelular (K03406) (**Figura 12.A; Tabela 6.E**).

No quarto mês, as β -Proteobacteria apresentaram altas correlações com as predições relacionadas ao metabolismo do carbono, destacando a descarboxilação do Piruvato com a liberação de CO_2 e acetil-CoA no citosol das células em condições aeróbias (K00163 e K07516). Embora menores, as classes Gemmatimonadetes e δ -Proteobacteria mostraram correlações com as predições de modo semelhante a β -Proteobacteria. Distanciando-se dessas classes, ainda aos quatro meses, representantes dos filos Firmicutes, Actinobacteria, Acidobacteria e Verrucomicrobia tiveram uma maior aproximação entre si quanto o perfil das principais funções preditas. Nesse caso, esses filos mostraram maiores correlações com transportadores ABC (ATP Binding Cassette - **Tabela 6.A**) e transferência de açúcares para

obtenção de energia (**Tabela 6.D**). De modo geral, as maiores correlações das classes bacterianas com as mesmas entradas apontam para uma possível redundância dos perfis metagenômicos preditos para as comunidades bacterianas da rizosfera.

Figura 12 - Correlações da abundância de classes com os principais processos preditos para as rizosferas aos 2 (A), 4 (B) e 6 (C) meses de desenvolvimento das plantas de cana-de-açúcar, com base na anotação KO (KEGG Orthology). Valores mais positivos (em amarelo) correspondem a correlações positivas mais fortes. O índice adotado foi o de correlação de Pearson (ρ). Detalhes sobre cada processo (KO) foram descritos na tabela 6.

Tabela 6 - Anotações ortólogas (KO) dos principais processos identificados por predições metagenômicas com base no gene 16S rRNA. As 50 funções abaixo corresponderam a mais de 10% do total de sequências associadas aos genes preditos (mais de 6400 KO distintas).

	KO	Definições
A *	K01997	Branched-chain amino acid transport system permease protein
	K01999	LivK; branched-chain amino acid transport system substrate-binding protein
	K02004	Putative ABC transport system permease protein
	K02015	Iron complex transport system permease protein
	K02031	ABC.PE.A; peptide/nickel transport system ATP-binding protein
	K02032	ABC.PE.A1; peptide/nickel transport system ATP-binding protein
	K02033	ABC.PE.P; peptide/nickel transport system permease protein
	K02034	ABC.PE.P1; peptide/nickel transport system permease protein
	K02035	ABC.PE.S; peptide/nickel transport system substrate-binding protein
	K06147	ABCB-BAC; ATP-binding cassette, subfamily B, bacterial
	K09687	ABC-2 type transport system ATP-binding protein
B	K00161	PDHA, PDHA, pdhA; Pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit [EC:1.2.4.1]
	K00162	Pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit [EC:1.2.4.1]
	K00163	Pyruvate dehydrogenase E1 component [EC:1.2.4.1]
	K00627	Pyruvate dehydrogenase E2 component (dihydrolipoamide acetyltransferase) [EC:2.3.1.12]
	K01006	Pyruvate, orthophosphate dikinase [EC:2.7.9.1]
	K03388	hdrA; heterodisulfide reductase subunit A [EC:1.8.98.1]
	K07516	fadN; 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [EC:1.1.1.35]
C	K00123	fdoG, fdhH; Formate dehydrogenase major subunit [EC:1.2.1.2]
	K00936	Phosphotransferases with a N group as acceptor E2.7.3.- [EC:2.7.3.-]-Enzymes
	K01190	Beta-galactosidase [EC:3.2.1.23]
	K01209	Alpha-N-arabinofuranosidase [EC:3.2.1.55]
	K05349	bglX; beta-glucosidase [EC:3.2.1.21]
	K07749	rc; formyl-CoA transferase [EC:2.8.3.16]
	K08884	serine/threonine protein kinase, bacterial [EC:2.7.11.1]
	K13688	chvB, cgs, ndvB; cyclic beta-1,2-glucan synthetase [EC:2.4.1.-]
D	K02025	ABC.MS.P1; multiple sugar transport system permease protein
	K02026	ABC.MS.P1; multiple sugar transport system permease protein
	K02027	ABC.MS.S; multiple sugar transport system substrate-binding protein
	K02056	ABC.SS.A; simple sugar transport system ATP-binding protein [EC:3.6.3.17]
	K02057	ABC.SS.P; simple sugar transport system permease protein
E	K02014	Iron complex outermembrane receptor protein Transporters[BR:ko0200]
	K03406	mcp; methyl-accepting chemotaxis protein
	K07497	IS2 transposase TnpB
	K15726	czcA; cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcA
F	K00059	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase [EC:1.1.1.100]
	K01897	Long-chain acyl-CoA synthetase [EC:6.2.1.3]
G	K01473	N-methylhydantoinase A [EC:3.5.2.14]
H	K00257	Metabolism of terpenoids and polyketides
	K00970	pcnB; poly(A) polymerase [EC:2.7.7.19]
	K02519	infB, MTIF2; translation initiation factor IF-infB, MTIF2 IF-2-[BR:ko03012]
	K02529	lacI, galR; LacI family transcriptional regulator
	K03088	SIG3.2, rpoE; RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily
	K03296	hydrophobic/amphiphilic exporter-1 (mainly G- bacteria), HAE1 family
	K03407	cheA; two-component system, chemotaxis family, sensor kinase CheA [EC:2.7.13.3]
	K06994	putative drug exporter of the RND superfamily
	K08300	rne; ribonuclease E [EC:3.1.26.12]
	K15125	fhaB; filamentous hemagglutinin

*Pathways: A – transportes ABC; B – Metabolismo do carbono; C – Enzimas; D – Metabolismo de açúcares; E – Outros transportes; F – Metabolismo de ácidos graxos; G – metabolismo de aminoácidos; H – Outros genes.

Aos seis meses, foi observada uma redução geral das correlações entre as classes e as funções preditas (**Figura 12C**). Isso está associado ao aumento da diversidade de bactérias nesse período, pois diversos grupos menos abundantes no 4º mês aumentaram nas rizosferas do 6º mês. Isso se deve ao fato de que as funções preditas com base no gene 16S rRNA são proporcionais a diversidade de táxons encontrados pela metodologia de sequenciamento, o que resultou numa menor redundância de perfis metagenômicos preditos no sexto mês. Ainda nesse período, as predições metagenômicas aproximaram as classes β -Proteobacteria, γ -Proteobacteria e δ -Proteobacteria entre si. Ao mesmo tempo, ambas se afastaram de α -Proteobacteria, Bacilli, Actinobacteria e, em menor grau, das classes pertencentes aos filos Acidobacteria e Verrucomicrobia.

Devido ao efeito da torta de filtro sobre a composição e diversidade das comunidades bacterianas em solos com MAP e fosfato natural reativo no quarto mês, as rotas metabólicas do nitrogênio e os processos relacionados a presença de fosfatases ácidas e alcalinas foram traçados (**Figura 13**). Predominaram os grupos bacterianos relacionados a produção de nitrato-redutases (EC:1.7.99.4) e nitrito-oxidoreduções (EC: 1.7.5.1), entre outras enzimas, nas rizosferas com MAP+torta. Desse modo, tanto o processo de nitrificação quanto a fixação de carbono podem estar garantindo a entrada de N e C no sistema a partir da mineralização da torta de filtro na presença do MAP no quarto mês. Também foi forte a presença de bactérias relacionadas a produção de amônia monooxigenase (amoA) nessas rizosferas (EC: 1.14.99.39) (**Figura 13.A**). No caso dos solos com NAT, a torta de filtro estimulou a predominância de grupos bacterianos relacionados à produção de fosfatase alcalina em todos os meses (EC: 3.1.3.1) e de fosfatase ácida no quarto mês (EC: 3.1.3.2). Vale ressaltar que no quarto mês foram encontradas as mais baixas concentrações de P-lábil nas rizosferas com NAT, com ou sem torta (**Figura 13.B**).

A

B

Figura 13 - Mapas com perfis metabólicos representando o efeito da torta de filtro sobre os processos do metabolismo do nitrogênio, em rizosferas tratadas com fosfato monoamônio (A), e sobre as atividades de fosfatases em rizosferas tratadas com fosfato natural reativo (B). As enzimas (retângulos) podem exibir três perfis de cores referentes a atividade das mesmas nos diferentes estádios fenológicos das plantas: 2 meses (esquerda); 4 meses (centro); e 6 meses (direita). Quanto mais próximo ao vermelho maior é a correlação da torta de filtro como perfil metagenômico predito.

6.4. Discussão

No geral, os índices de Shannon encontrados em nosso estudo revelaram uma menor diversidade de bactérias se comparados aos relatados por Costa et al. (2014) em rizosferas de cana-soca (variedade RB86-7515) cultivada em Latossolos de área comercial no estado de São Paulo ($H' \sim 11,0$); e por Souza et al. (2016) na rizosfera da variedade SP80-3280 cultivada durante três ciclos de corte, também em solos do estado de São Paulo ($H' = 10,0 - 11,0$) (**Figura 5**). Essas fontes revelam que em estádios mais avançados da cultura, principalmente na cana-soca, o recrutamento de novas espécies de bactérias pode ser intensificado, aumentando a diversidade original na rizosfera. Desse modo, a comunidade microbiana da rizosfera tenderia a se suavizar com a do *Bulk Soil* com o tempo de desenvolvimento das plantas. Reforçando essa hipótese, Rachid et al. (2013) relataram, através do índice Shannon, valores de diversidade entre 5,9 e 6,1 para comunidades bacterianas da rizosfera de cana-de-açúcar com seis meses de idade, cultivada em Latossolo Vermelho no estado de Goiás, demonstrando uma diversidade muito próxima da que foi descrita no presente estudo.

De acordo com os resultados do presente estudo, as mudanças na estrutura, composição e diversidade do microbioma rizosférico da cana-de-açúcar estão mais correlacionadas tanto às concentrações das frações lábeis de fósforo quanto ao crescimento das plantas. Desse modo, mudanças na adsorção do P ao solo e na sua absorção pelas plantas causariam respostas proporcionais nas comunidades bacterianas da rizosfera. Isso ficou mais claro no quarto mês, quando houve redução da diversidade em todos os tratamentos, inclusive nas testemunhas, por conta das variações dos teores de P lábil na rizosfera.

A diminuição da diversidade bacteriana no quarto mês pode ser explicada pelo desenvolvimento do sistema radicular, que atua recrutando grupos de micro-organismos do *Bulk Soil* que possuem maior afinidade com a rizosfera (MENDES et al., 2014; PHILIPPOT et al., 2013). Essa seletividade das raízes se deve, principalmente, a liberação de exsudatos que influenciam a comunidade microbiana e alteram a química do solo (BAUDOIN et al., 2001; RICHARDSON et al., 2009). Além de servirem como fontes de carbono para os micro-organismos, esses exsudatos podem auxiliar na adaptação das plantas ao déficit de P no solo, variando com o genótipo e a idade das mesmas (LI et al., 2004).

A seleção de bactérias pela rizosfera no quarto mês pode consistir num importante processo de adaptação das plantas à redução nos teores de P lábil devido à sua imobilização no solo, pois mudanças na composição da comunidade rizosférica também podem aumentar a disponibilidade de P às plantas (MARSCHNER et al., 2006). Além da ação das raízes, o acúmulo da matéria orgânica e as mudanças nos teores de P, N e C no solo também alteram a

comunidade microbiana da rizosfera (SCHLATTER et al., 2014), explicando as variações proporcionadas pela torta de filtro sobre as comunidades bacterianas em solos contendo fontes de P mineral com diferentes graus de solubilidade.

Diante do exposto, as rizosferas aos quatro meses proporcionaram um bom modelo para se estudar os processos de seleção de bactérias em função das mudanças da fertilidade do solo por adição de diferentes fontes fosfatadas com ou sem a torta de filtro. Por sua vez, embora menos variável, o aumento geral da diversidade no sexto mês pode estar diretamente correlacionado aos metabólitos secretados pelas raízes. Isso pode ser explicado pela limitação espacial dos microcosmos no sexto mês, o que resultaria no aumento gradual das concentrações de exsudados radiculares, que seriam os principais provedores de carbono dentro do solo (GANS et al., 2005; ROESCH et al., 2007).

O déficit de P e de outros nutrientes na rizosfera também pode alterar quantitativa e qualitativamente a liberação de metabólitos secundários, aumentando ou diminuindo as taxas de crescimento microbiano e mantendo uma fração das comunidades em fase estacionária (MARSCHNER et al., 2011). De modo geral, as mudanças nos teores de nutrientes do solo podem alterar diretamente a estrutura e a composição das comunidades microbianas (FIERER et al., 2007; SINGH et al., 2010). Isso é ainda mais complexo com o P, devido a sua alta reatividade no solo e incorporação na biomassa microbiana (XU et al., 2015).

Esses fatos ajudam a explicar o que ocasionou a redução nos teores de N foliar da cana-de-açúcar tratada com MAP+torta no quarto mês (**Tabela 2**). Essas fontes liberaram NH_4^+ na superfície do solo que, por ter sido previamente corrigido com calcário, pode ter favorecido o deslocamento dessa espécie química para NH_3 (volátil) em função do aumento da concentração de OH^- ($>\text{pH}$) (WHITEHEAD & RAISTRICK, 1999). Além disso, Dee et al. (2003) relataram que a torta de filtro pode aumentar o pH do solo, o que também elevaria as perdas de N nas aplicações de MAP em superfície, o que sugere a incorporação dessas fontes ao solo para melhores rendimentos. Isso poderia levar a menores detecções de N nos tecidos foliares aos quatro meses pois, com o rápido crescimento das plantas e o esgotamento das reservas de N e P lábil no solo, o MAP não seria suficiente para suprir as exigências das plantas num curto período.

Apesar das possíveis perdas de N por volatilização, o estímulo conjunto do MAP e da torta de filtro sobre as mudanças na estrutura e diversidade microbianas, no quarto mês, sugerem a ativa participação de grupos bacterianos no metabolismo desses substratos. Isso se explica pelo fato das mudanças na composição do nicho rizosférico poder refletir iguais alterações nas atividades metabólicas predominantes (AZEVEDO et al., 2015).

Diante dessas considerações, aos quatro meses, a grande mudança na estrutura e diversidade bacteriana na rizosfera com torta de filtro e MAP provavelmente se deu em função do aumento da taxa de mineralização da matéria orgânica. Isso é explicado pelo fato do MAP ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) possuir cerca de 10% de N na sua composição, o que teria diminuído gradualmente a relação C/N sobre a torta de filtro (torta: 24,7% de C orgânico; e 2,2% de N) e estimulado a sua mineralização. Entretanto, apesar da torta de filtro aumentar a atividade metabólica dos micro-organismos do solo, a sua aplicação também pode aumentar o acúmulo de C e a imobilização do N mineral na biomassa (DEE et al., 2003; RASUL et al., 2008).

Os dados de fracionamento apresentados no Capítulo 1 desse estudo podem esclarecer essa dinâmica das diferentes fontes fosfatadas no solo (**Figura 2.B**). Comparando os teores de P lábil nas rizosferas, mesmo com o MAP (48%) e o SFT (45%) possuindo teores de P_2O_5 solúvel semelhantes, o SFT apresentou os maiores teores de P lábil inorgânico nas rizosferas aos dois meses. Isso pode indicar uma redução da liberação do MAP no solo (geralmente mais rápida) quando aplicado com a torta de filtro na superfície. A liberação gradativa do P no solo, por parte das fontes, é importante pois pode minimizar as perdas por adsorção no solo e aumentar a eficiência de aproveitamento pelas plantas (DOMINGUES et al., 2014).

Nessas condições, corroborando os trabalhos de Dee et al. (2003) e Rasul et al. (2008), a imobilização do P na biomassa microbiana de solos tratados com MAP+torta pode minimizar tais perdas, ao mesmo tempo que mantém um estoque de P biodisponível às plantas ao longo do desenvolvimento vegetativo (CONTE; ANGHINONI; RHEINHEIMER, 2002). Tal hipótese pode ser reforçada quando observamos o desenvolvimento da cana-de-açúcar cultivada com MAP+torta aos seis meses, quando as plantas apresentaram ganho de massa significativamente superior as tratadas com SFT+torta e aos outros tratamentos (**Tabela 2**), inclusive apresentando os maiores teores de P lábil na rizosfera (**Tabela 3**). Essa dinâmica na liberação de P e N no segundo mês pode ter sido a principal responsável pelas mudanças na estrutura e na composição das comunidades bacterianas do quarto mês.

Diante dessa dinâmica e considerando a abundância da matéria orgânica, das formas de P e das espécies químicas de N disponíveis nos solos que contêm torta de filtro e MAP, os processos envolvendo tanto a oxidação de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ quanto a nitrificação das formas mais oxidadas podem estar acontecendo. Isso justifica a grande abundância da classe β -Proteobacteria nas rizosferas com MAP+torta, pois esse grupo aborda as principais espécies de bactérias oxidadoras de amônio (amoB) em nitrito (NO_2^-), se destacando os gêneros *Nitrosomonas* sp., *Nitrosovibrio* sp., *Nitrosococcus* sp., *Nitrosolobus* sp. e *Nitrospira* sp. (KOUKI et al., 2011). Além disso, a grande abundância também de α -Proteobacteria nas

rizosferas com MAP+torta sugeriu o complemento do processo oxidativo a partir da NH_3 , pois essa classe tem um grande número de espécies capazes de realizar a nitrificação, converter o NO_2^- em NO_3^- (assimilável às plantas), se destacando o gênero *Nitrobacter* sp. De acordo com Nogueira & Melo (2006), a abundância de *Nitrobacter* sp. no solo está associada a maior presença de recursos e que, durante a escassez de nutrientes, competem com *Nitrospira* sp., que passa a prosperar. Dentre as α -Proteobacteria também se destacam os gêneros *Rhizobium* sp. e *Bradyrhizobium* sp. por realizarem a fixação biológica do N_2 atmosférico e também produzirem fosfatases alcalinas (SMART et al., 1984), o que é especialmente notado caso a torta de filtro eleve o pH do solo, de acordo com o que foi observado por Dee et al. (2003).

Reforçando nossa hipótese de que a torta de filtro pode estimular os processos metabólicos relacionados ao N no solo, os dados de predição metagenômica encontraram uma predominância do número de sequências de 16S rRNA associadas à produção de Amônia-monooxygenase [EC 1.14.99.39, AMO]. Essa enzima é encontrada em espécies de *Nitrosomonas* sp. e é responsável por catalisar a oxidação da amônia em Hidroxilamina (NH_2OH) (GILCH, MEYER & SCHMIDT, 2009). A Hidroxilamina, por sua vez, pode ser convertida a nitrito pela enzima Hidroxilamina-dehidrogenase [EC:1.7.2.6]; e o nitrito a nitrato pela enzima Nrito-oxidoreductase [EC:1.7.99.4, NOR], sendo o último passo no processo de oxidação aeróbia da amônia, muito comum em espécies do filo Nitrospira (PESTER et al., 2014). Todas essas enzimas apresentaram alta associação com as sequências de 16S rRNA da rizosfera com NAP+torta no quarto mês, enquanto algumas sequer foram encontradas nos outros meses.

Essas referências também podem explicar a abundância de α e β -Proteobacteria sobre outros grupos na rizosfera com NAT+torta no quarto mês, assim como foi no MAP+torta, sendo o NAT (fosfato natural reativo de Gafsa) um derivado de apatita, que é um mineral rico em P ligado ao Ca [fórmula geral: $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH}, \text{F}, \text{Cl})$] (KELLER et al., 2012; MOHAPATRA et al., 2013). Como apresentado nos resultados, houve maior abundância de β -Proteobacteria nos tratamentos NAT+torta no quarto mês. Diferente de MAP+torta, no NAT+torta a única fonte de N e Ca adicionais capazes de estimular essas classes de bactérias provém da torta de filtro. Entretanto, devido a mineralização da torta acontecer de modo mais lento na ausência de fontes nitrogenadas, a disponibilização de seus nutrientes no solo deve acontecer mais tardiamente.

No geral, no quarto mês, todos os tratamentos com torta de filtro e alguma fonte mineral de P tiveram uma abundância de β -Proteobacteria maior do que nas rizosferas das testemunhas, o que prova a grande influência benéfica da torta de filtro sobre a classe β -Proteobacteria, com α -Proteobacteria predominando apenas caso não haja torta de filtro no solo. No geral, várias

espécies do filo Proteobacteria podem beneficiar às plantas através da secreção de ácidos orgânicos que podem solubilizar o P ligado ao Ca, se destacando: α -Proteobacteria (*Azospirillum* sp., *Rhizobium* sp. e *Bradyrhizobium* sp.); β -Proteobacteria (*Burkholderia* sp.); e γ -Proteobacteria (*Acinetobacter* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp., *Azotobacter* sp e *Klebsiella* sp.) (AHEMAD & KIBRET, 2014; AZZIZ et al., 2012; KAUR & REDDY, 2015).

Com relação as alterações químicas no solo, Pisa et al. (2011) demonstraram que a adubação nitrogenada não exerce grande diferença sobre a abundância dos filos Proteobacteria (29.6%), Acidobacteria (23.4%), Bacteroidetes (12.1%), Firmicutes (10.2%) e Actinobacteria (5.6%) na rizosfera de cana-de-açúcar cultivada no estado do Paraná (variedade RB72454), mas uma maior diversidade geral foi encontrada em solos N-fertilizados (120 kg ha⁻¹). Semelhante ao nosso estudo até os quatro meses, o trabalho de Pisa et al. (2011) apresentou a predominância dos filos Proteobacteria e Acidobacteria, além da predominância de Bacilli sobre as outras classes. Além disso, aos seis meses, os filos Proteobacteria, Acidobacteria, e Actinobacteria foram os mais abundantes em nosso estudo, em geral, semelhante ao que foi observado por Rachid et al. (2013) em Latossolo Vermelho cultivado com cana-de-açúcar no estado de Goiás sob diferentes sistemas de manejo.

A alta abundância relativa de Acidobacteria nas rizosferas de plantas com quatro meses (**Figura 8**) pode ser associada aos menores teores de gerais de P disponível no solo nesse período (**Tabela 2**). Isso, provavelmente, se deve ao fato da grande parte desses organismos terem um estilo de vida oligotrófico em solos com poucos nutrientes, o que é relacionado com a alta afinidade por substrato reportados previamente por esse filo (FIERER et al., 2007). Entretanto, Acidobacteria-6 sempre teve correlações positivas com os teores de P foliar (**Figura 9**) e, juntamente com Chloracidobacteria, tiveram correlações sempre positiva com os teores de P lábil extraído por resina na rizosfera (**Figura 10**). Isso evidencia que nem todas as classes do filo Acidobacteria se desenvolvem melhor em ambientes pobres em nutrientes, podendo se adaptarem as mais diversas mudanças na composição do solo. Outro exemplo é o caso da Sva0725, que corresponde a divisão Halophaga Acidobacterium (conhecida apenas através da amplificação de DNA ambiental). Essa classe se destacou dentre as Acidobacterias no sexto mês, apresentando correlações positivas com os teores foliares de P e N, embora o P lábil no solo tenha diminuído nesse período, no geral. Juntamente com Chloracidobacteria, Sva0725 permaneceu entre as seis principais classes responsáveis pelas maiores variações em função dos diferentes tipos de tratamentos em todos os períodos avaliados (**Tabela 5**). Isso ressalta a importância de identificar o papel de novos grupos que possam representar efetivamente as

mudanças na diversidade bacteriana da rizosfera.

A grande abundância de β -Proteobacteria em MAP+torta, no segundo mês, também reforça a hipótese desse ambiente ter um predomínio de micro-organismos r-estratégias, sendo um solo com alta concentração de substrato, tendo em vista que muitas espécies de β -Proteobacteria apresentam um habito copiotrófico e correlações positivas com a mineralização do carbono no solo (FIERER et al., 2007).

A respeito do filo Actinobacteria, também sempre esteve correlacionado positivamente com os teores de N foliar, que por sua vez é considerada uma quantificação indireta desse nutriente no solo (MALAVOLTA al., 1997). Essas considerações sugerem que o papel dos grupos bacterianos pode ser melhor compreendido com base nos princípios da mineralização da torta de filtro presente no solo. Isso se deve a rica composição desse substrato tanto em macro quanto em micronutrientes (FERREIRA et al., 1986; NUNES JÚNIOR, 2008). Isso inclui o P, que pode ser gradativamente liberado junto ao nitrogênio através da mineralização da matéria orgânica e da atividade dos micro-organismos (SANTOS et al., 2011).

O estudo de Minhoni et al. (1991) reforça a hipóteses de que a torta de filtro auxilia na disponibilização de P moderadamente lábil às plantas, pois demonstrou que a adição de diferentes fontes de matéria orgânica aumentou a solubilização microbiana de fosfato de rocha aplicado ao solo. Dessa forma, o aumento da abundância de certas espécies de β -Proteobacteria pode elevar ainda mais a disponibilização de P no solo através da secreção de ácidos orgânicos, como por exemplo o ácido glucônico liberado por estirpes de *Burkholderia cepacia* (SONG et al., 2008). Além disso, os altos teores de P ligado a Ca extraídos nos solos com NAT+torta, no sexto mês, sugerem que a torta de filtro estimule o deslocamento dessas frações de P da superfície do solo para a rizosfera. Uma possível explicação é que a torta de filtro aumentou a solubilidade do NAT na superfície e que parte desse P solubilizado pode ter voltado a se ligar ao Ca presente na rizosfera, já que os solos foram corrigidos com calcário dolomítico no início do plantio. No geral, isso resultou em benefício às plantas, pois a alta concentração de ácidos orgânicos nessa região pode solubilizar essas fontes disponibilizando P lábil às raízes (MOHAPATRA et al., 2013; RICHARDSON, 2003), o que pode explicar o aumento dos teores de P_{RTA} em rizosferas de solos tratados com NAT+torta no sexto mês (**Tabela 3**).

O estudo de González et al. (2014) também comprovou o aumento da comunidade de micro-organismos solubilizadores de fosfato natural enriquecido com a torta de filtro. Nessas condições, o uso da torta de filtro poderia abranger mais formas de uso dos fosfatos de rocha, mesmo após correção do pH do solo, pois normalmente os fosfatos naturais necessitam de acidez para a maior eficiência da sua solubilização com o passar do tempo (STAMFORD et al.,

2003). Desse modo, o uso combinado do fosfato natural reativo de Gafsa com a torta de filtro, embora não atenda à demanda de P nos primeiros meses da cultura, mostra ser uma alternativa viável para adubação da cultura de cana-de-açúcar em estádios fenológicos mais avançados, revelando importante papel da microbiota do solo na solubilização dessa fonte.

As predições metagenômicas também mostraram que, aos quatro meses, um grande número de sequências de 16S rRNA, representando as classes mais abundantes de bactérias, foram associadas a um grande número de processos relacionados ao metabolismo do carbono, se destacando a descarboxilação do Piruvato em aerobiose (K00163 e K07516), que resulta na liberação de CO₂, e ao transporte de açúcares para obtenção de energia, estando relacionados a produção da glicose-6-fosfato desidrogenase (GDH) (NEWMAN et al., 2016). Essa enzima é a principal responsável pela oxidação da glicose em ácido glicólico em bactérias Gram-negativas, que é um dos principais processos responsáveis pela solubilização do P insolúvel no solo (RODRÍGUEZ et al., 2006). Entretanto, a GDH é dependente do cofator pirroloquilonina quinona (*PQQ*), sendo que a expressão de genes que codifiquem esse cofator um forte indicativo do processo de solubilização do P no solo, além de outros que identifiquem a produção de ácidos orgânicos (PÉREZ et al., 2007; SHEN et al., 2012; MILLER et al., 2010).

Considerando que a maior parte dos processos relacionados a glicólise, como predito em nosso estudo, estiveram associados com a classe β -Proteobacteria e que esse grupo, por sua vez, teve sua abundância aumentada pela adição da torta de filtro, podemos inferir que a torta de filtro atua, indiretamente, como potencial agente da solubilização de fosfato ligado a Ca ou outras formas menos lábeis de P. Dessa forma, o aumento no metabolismo de carboidratos poderia explicar os fenômenos observados em nosso estudo, além dos relatos na literatura sobre a torta de filtro e outras fontes de matéria orgânica estimularem a solubilização do P no solo.

Além de estimular a proliferação de micro-organismos solubilizadores de fosfato no solo, Dee et al. (2003) demonstraram que a adição da torta de filtro também induz a seleção grupos bacterianos produtores de arilsulfatase e fosfatases ácida e alcalina em solos cultivados com plantas de milho. O trabalho de Kapri, et al. (2010) mostrou que a expressão dessas enzimas se deve às mudanças em fatores ambientais, principalmente a deficiência de P inorgânico. Nessas condições, a torta de filtro seria um rico substrato, contribuindo com a maior parte dos fosfatos monoésteres do solo, fonte de P moderadamente lábil extraível pela hidrólise parcial dos compostos orgânicos da torta (GATIBONI, 2013). Entretanto, esses compostos possuem alta afinidade em sítios do solo onde a maior parte dos micro-organismos não consegue acessar (RHEINHEIMER; ANGHINONI; FLORES, 2002). Isso também ajuda a explicar a redução da diversidade e distinta composição dos solos tratados com fosfato

monoamônico e natural reativo na presença da torta de filtro no quarto mês.

De forma semelhante, essas fontes também ajudam a entender a predominância das frações mais recalcitrantes de P orgânico (Po) sobre o inorgânico (Pi) extraídas por NaOH 0,5 mol L⁻¹ em todas as rizosferas do presente estudo, pois esses extratos de Po estão frequentemente associados aos compostos húmicos (HEDLEY et al., 1982). Desse modo, são formados rizodepósitos que influenciam a estrutura das comunidades microbianas do solo (PUGLISI et al., 2013).

Reforçando nossa discussão, os dados de predição metagenômica retornaram um grande número de sequências, em rizosferas com NAT+torta, associadas à fosfatase ácida [EC 3.1.3.2] e alcalina [EC:3.1.3.2], que podem transformar P orgânico em inorgânico solúvel (ANAND & SRIVASTAVA, 2012), sendo essas enzimas amplamente distribuídas em plantas, células animais e em micro-organismos (PALACIOS et al., 2005).

Diante do que foi exposto, vale ressaltar que a predição metagenômica com base no gene 16S rRNA pode explicar, antecipadamente, boa parte dos processos envolvidos nas mudanças da estrutura e composição das comunidades bacterianas nos ecossistemas. Isso ocorre principalmente nos solos, devido à grande aproximação dessas explicações com as metodologias metagenômicas propriamente ditas (ABHAUER et al., 2015).

Contudo, o uso conjunto da torta de filtro com fontes minerais de P estimula o desenvolvimento de micro-organismos nativos do solo, podendo ser uma alternativa viável para o aumento da produtividade da cana-de-açúcar. Isso se deve, principalmente, pelo fato do ambiente rizosférico ser rico em número de espécies que podem promover o desenvolvimento vegetal dessa cultura através de diversos mecanismos bioquímicos (VERMA et al., 2001; INUI-KISHI et al., 2012).

6.5. Conclusões

1. O estágio fenológico das plantas de cana-de-açúcar foi o principal responsável pela seleção e mudanças na diversidade e composição das comunidades bacterianas da rizosfera, sendo seguido pelo teor de P-lábil que, por sua vez, no geral é aumentado pela torta de filtro.
2. A torta de filtro influenciou na seleção e no desenvolvimento de grupos bacterianos específicos na rizosfera, principalmente quando utilizada junto ao NAT e ao MAP, apresentando grande abundância de grupos que são citados na literatura como capazes de solubilizar o P e oxidar a amônia (amoA), respectivamente.
3. A torta de filtro estimulou, principalmente, o desenvolvimento de β -Proteobacteria em solos

com fontes adicionais de P solúvel, estando essas associações fortemente relacionadas ao desenvolvimento das plantas de cana-de-açúcar até os 120 dias. Em contrapartida, a ausência da torta de filtro beneficia o desenvolvimento de α -Proteobacteria mais que o de β -Proteobacteria.

4. No geral, aumentos sutis nos teores de P-lábil na rizosfera levaram a maior abundância de Bacilli, Chloracidobacteria e a divisão Halophaga/Acidobacterium (copiotróficos). Já nas rizosferas com menos P-lábil, foram mais abundantes as classes Actinobacteria, Acidobacterria, Spartobacteria e boa parte das Proteobacterias (oligotróficos).

5. O uso da torta de filtro como estimulante de rizobactérias associadas à cana-de-açúcar pode otimizar a eficiência dos fosfatos de rocha em disponibilizar P às plantas, incentivando a reprodução de experimentos nas condições de campo para respostas mais conclusivas.

Referências

AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective Munees. **Journal of King Saud University - Science**, Riade, v. 26, p. 1-20, 2014.

ANAND, A.; SRIVASTAVA, P.K. A Molecular Description of Acid Phosphatase. **Applied Biochem Biotechnol**, New York, v. 167, n. 8, p. 2174-2197, 2012.

AßHAUER, K.P.; WEMHEUER, B.; DANIEL, R.; MEINICKE, P. Tax4Fun: predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 31, n. 17, p. 2882-2884, 2015.

AZEVEDO, L.C.B.; MORAIS, M.; SDiversity and Bacterial Community Structure in Sugarcane under Two Harvest Management Systems. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 39, p. 701-713, 2015.

AZZIZ, G.; BAJSA, N.; HAGJOU, T.; TAULÉ, C.; VALVERDE, A.; IGUAL, J.M.; ARIAS, A. Abundance, diversity and prospecting of culturable phosphate solubilizing bacteria on soils under crop–pasture rotations in a no-tillage regime in Uruguay. **G. Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 61, p. 320-326, 2012.

BAUDOIN, E.; BENIZRI, E.; GUCKERT, A. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, v.35, p.1183-1192, 2003.

BRAY, R.J.; CURTIS, J.T. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. **Ecological Monographs**, Washington, v. 27, p. 325-349, 1957.

CALEGARI, A.; TIECHER, T.; HARGROVE, W.L.; RALISCH, R.; TESSIER, D.; TOURDONNET, S. de; GUIMARÃES, M.F.; RHEINHEIMER, D.S. Long-term effect of

different soil management systems and winter crops on soil acidity and vertical distribution of nutrients in a Brazilian Oxisol. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 133, p. 32-39, 2013.

CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (Ed.) **Recomendação de adubação e calagem para o estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1996. 143 p.

CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; COSTELLO, E.K.; FIERER, N.; GONZALEZ, A.; GOODRICH, J.K.; GORDON, J.I.; et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, London, v. 7, p. 335–336, 2010.

CHANG, C.H; YANG, S.S. Thermo-tolerant phosphate-solubilizing microbes for multi-functional biofertilizer preparation. **Bioresource Technol**, Amsterdam, v. 100, p. 1648-1658, 2009.

CLARKE, K.R., GREEN, R.H. Statistical design and analysis for a “biological effects” study. **Marine Ecology Progress Series**, Amelinghausen, v. 46, p. 213-226, 1988.

CLARKE, K.R.; GORLEY, R.N. **PRIMER v5**: User manual/tutorial, PRIMERE. Plymouth, UK, 2001. 91 p.

CONTE, E.; ANGHINONI, I.; RHEINHEIMER, D.S. Fósforo da biomassa microbiana e atividade de fosfatase ácida após aplicação de fosfato em solo no sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 26, p. 925-930, 2002.

COSTA, D.P.; DIAS, A.C.F.; DURRER, A.; ANDRADE, P.A.M.; GUMIERE, T.; ANDREOTE, F.D. Composição diferencial das comunidades bacterianas na rizosfera de variedades de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 38, p. 1694-1702, 2014.

DE BOLLE, S.; GEBREMIKAEL, M. T.; MAERVOET, V.; DE NEVE, S. Performance of phosphate-solubilizing bacteria in soil under high phosphorus conditions. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 49, p. 705-714, 2013.

DEE, B.M.; HAYNES, R.J.; GRAHAM, M.H. Changes in soil acidity and the size and activity of the microbial biomass in response to the addition of sugar mill wastes. **Biology and Fertility Soils**, New York, v. 37, p. 47-54, 2003.

DOMINGUES, M.T.; BUENOA, C.C.; WATANABEA, C.H.; FRACETO, L.F.; LOYOLA-LICEAC, C.J.; CROWLEYB, D.; ROSAA, A.H. Polymeric Alginate Microspheres Containing Biochar to Immobilize Phosphate Ions. **Chemical Engineering Transactions**, Milano, v. 37, p. 109-114, 2014.

EDGAR, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, n. 19, p. 2460-2461, 2010.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004, 510 p.

FERREIRA, E. S.; ZOTARELLI, E. M. M.; SALVIATI, L. Efeitos da utilização da torta de filtro na produtividade da cana-de-açúcar. In: SEMINÁRIO DE TECNOLOGIA

AGRONÔMICA, 4, **Anais Copersucar**, Piracicaba, p. 321-331, 1986.

FIERER, N., BRADFORD, M. A., & JACKSON, R. B. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, Brooklyn, v. 88, p. 1354-1364, 2007.

GANS J., WOLINSKY M., DUNBAR J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. **Science**, Washington, v. 309, p. 1387-1390, 2005.

GATIBONI, L. C.; BRUNETTO, G.; RHEINHEIMER, D. S.; KAMINSKI, J. Fracionamento químico das formas de fósforo do solo: usos e limitações. **Tópicos em Ciência do Solo**, Viçosa, v.8, p.141-187, 2013.

GILCH, S.; MEYER, O.; & SCHMIDT, I. A soluble form of ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. **Biological Chemistry**, Baltimore, v. 390, p. 863-873, 2009.

GONZÁLEZ, L.C.; PRADO, R.M.; HERNÁNDEZ, A.R.; CAIONE, G.; SELVA, E.P. Uso de torta de filtro enriquecida com fosfato natural e biofertilizantes em Latossolo Vermelho distrófico. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 44, n. 2, p. 135-141, 2014.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistics software package for education and analysis. **Palaeontologia Electronica**, Galway, v. 4, n. 1, 2001, 9 p.

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**, Madison, v. 46, n. 5, p. 970-976, 1982.

INUI-KISHI, R.N.; KISHI, L.T.; PICCHI, S.C.; BARBOSA, J.C.; LEMOS, M.T.O.; MARCONDES, J.; LEMOS, E.G.M. Phosphorus solubilizing and iaa production activities in plant growth promoting rhizobacteria from brazilian soils under sugarcane cultivation. **ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences**, Ipswich (USA), v. 7, p. 1446-1454, 2012.

KAPRI, A. TEWARI, L., Phosphate Solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 3, 2010. 9p.

KAUR, G., & REDDY, M.S. Effects of phosphate-solubilizing bacteria, rock phosphate and chemical fertilizers on maize-wheat cropping cycle and economics. **Pedosphere**, Beijing, v. 25, n. 3, p. 428-437, 2015.

KAVAMURA V.N.; TAKETANI, R.G.; LANÇONI, M.D.; ANDREOTE, F.D.; MENDES, R.; MELO, I.S. Water Regime Influences Bulk Soil and Rhizosphere of *Cereus jamacaru* Bacterial Communities in the Brazilian Caatinga Biome. **PLoS ONE**, Berkeley, v. 8, n. 9, p. 1-10, 2013.

KELLER, M.; OBERSON, A.; KATHRIN E. A.; TAMBURINI, F., MÄDER, P.; MAYER, J.; FROSSARD, E.; BÜNEMANN, E. K. Phosphorus forms and enzymatic hydrolyzability of organic phosphorus in soils after 30 years of organic and conventional farming. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 175, p. 385-393, 2012.

KOUKI, S.; SAIDI, N.; M'HIRI, F.; NASR, H.; CHERIF, H.; OUZARI, H.; HASSEN, A. Isolation and characterization of facultative mixotrophic ammonia-oxidizing bacteria from constructed wetlands. **Journal of Environmental Sciences**, Madison, v. 23, n. 10, p. 1699-1708, 2011.

LI, Q.C.; ALLEN, H.L.; WOLLUM, A.G. Microbial biomass and bacterial functional diversity in forest soils: effects of organic matter removal, compaction, and vegetation control. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.36, p.571-579, 2004.

LIU, Z., LI, Y. C., ZHANG, S., FU, Y., FAN, X., PATEL, J. S., & ZHANG, M. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 96, p. 217-224, 2015.

LOZUPONE, C.A. & KNIGHT. Global patterns in bacterial diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**, Boston, v. 104, p. 11436-11440, 2007.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; STAHL, D.A.; CLARCK, D.P. Brock Biology of Microorganisms (13th Edition). **Pearson Benjamin Cummings**, São Francisco, 2010, 1152 p.

MARSCHNER, P.; SOLAIMAN, Z.; RENGEL, Z. Rhizosphere properties of Poaceae genotypes under P-limiting conditions. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.283, p. 11-24, 2006.

MCDONALD. D.; PRICE, M.N.; GOODRICH, J.; NAWROCKI, E.P.; DESANTIS, T.Z.; PROBST, A.; ANDERSEN, G.L.; KNIGHT, R. HUGENHOLTZ, P. An improved greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. **The ISME Journal**, New York, v. 6, n. 3, p. 610-618, 2012.

MENDES, L.W.; KURAMAE, E.E.; NAVARRETE, A.A.; VAN VEEN, J.A.; TSAI, S.M. Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. **ISME Journal**, New York, v. 8, p. 1577–1587, 2014.

MILLER SH, BROWNE P, PRIGENT-COMBARET C, COMBES-MEYNET E, MORRISSEY JP, O’GARA F. Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species. **Environmental Microbiology Reports**, Oxford, v. 2, p. 403-411, 2010.

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

MINHONI, M.T.A.; CARDOSO, E.J.B.N.; EIRA, A.F. Efeito de cinco tipos de matéria orgânica na solubilização microbiana de fosfato de rocha. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.15, p.29-35, 1991.

MIRZA, M.S.; AHMAD, W.; LATIF, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; MALIK, K.A. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 237, p. 47-54, 2001.

MOHAPATRA, B., VERMA, D. K., SEN, A., PANDA, B. B., ASTHIR, B. Biofertilizers- A Gateway to Sustainable Agriculture. **Popular Kheti**, West Bengal, v. 1, n. 4, p. 97-106, 2013.

MOHAPATRA, B.; VERMA, D. K.; SEN, A.; PANDA, B.B.; ASTHIR, B. Biofertilizers- A Gateway to Sustainable Agriculture. **Popular Kheti**, West Bengal, v. 1, n. 4, p. 97-106, 2013.

MORAIS, F.A. & GATIBONI, L.C. Phosphorus availability and microbial immobilization in a Nitisol with the application of mineral and organo-mineral fertilizers. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**. Rio de Janeiro, v. 87, n. 4, p. 2289-2299, 2015.

NEWMAN, M.M.; LORENZ, N.; HOILETT, N.; LEE, N.R.; DICK, R.P.; LILES, M.R.; RAMSIER, C.; KLOEPPER, J.W. Changes in rhizosphere bacterial gene expression following glyphosate treatment. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 553, p. 32-41, 2016.

NOGUEIRA, R.; MELO, L.F. Competition Between *Nitrospira* spp. and *Nitrobacter* spp. in Nitrite-Oxidizing Bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, Nova Jersey, v. 95, n. 1, p. 169-175, 2006.

NOVAIS, R. F., SMYTH, T. J., NUNES, F. N. **Fósforo**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, DPS, p. 471-550, 2007.

NUNES JÚNIOR, D. Torta de filtro: de resíduo a produto nobre. **Idea News**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 92, p. 22-30, 2008.

OKSANEN, J. et al. **Vegan: community ecology**. R Package version 1,17-11, 2011, Disponível em: [Http://CRAN.R-project.org/package=vegan](http://CRAN.R-project.org/package=vegan); Acesso em: 10 de jul. 2016.

PALACIOS, M.C., HAROS, M., ROSELL, C.M., SAN, Y. Characterization of an acid phosphatase from *Lactobacillus pentosus*: regulation and biochemical properties. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 98, p. 229-237, 2005.

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

PESTER, M.; MAIXNER, F.; BERRY, D.; RATTEI, T.; KOCH, H.; LÜCKER, S.; NOWKA, B.; RICHTER, A.; SPIECK, E.; LEBEDEVA, E.; LOY, A.; WAGNER, M.; DAIMS, H.; NxrB encoding the beta subunit of nitrite oxidoreductase as functional and phylogenetic marker for nitrite-oxidizing *Nitrospira*. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 16, n. 10, p. 3055-3071, 2014.

PHILIPPOT, L.; RAAIJMAKERS, J.; LEMANCEAU, P. & van der PUTTEN, W.H. Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, London, 11:789-799, 2013.

PISA, G.; MAGNANI, G.S.; WEBER, H.; SOUZA, E.M.; FAORO, H.; MONTEIRO, R.A.; DAROS, E.; BAURA, V.; BESPALHOK, J.P.; PEDROSA, F.O.; CRUZ, L.M. Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 44, n. 12, p. 1215-1221, 2011.

PUGLISI, E.; PASCAZIO, S.; SUCIU, N.; CATTANI, I.; FAIT, G.; SPACCINI, R.; CRECCHIO, C.; PICCOLO, A.; TREVISAN, M. Rhizosphere microbial diversity as influenced by humic substance amendments and chemical composition of rhizodeposits. **Journal of Geochemical Exploration**, Amsterdam, v. 129, p. 82-94, 2013.

RACHID, C.T.; SANTOS, A.L.; PICCOLO, M.C.; BALIEIRO, F.C.; COUTINHO, H.L.C.; PEIXOTO, R.S.; et al. Effect of sugarcane burning or green harvest methods on the Brazilian

cerrado soil bacterial community structure. **PLoS ONE**, Berkeley, v. 8, n.3 p. 1-8, 2013.

RAIJ, B.VAN; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. Boletim Técnico N.º 100**, 2ª edição. Campinas: Instituto Agrônomo & Fundação IAC. 1996. 285 p.

RAMETTE, A.; TIEDJE, J.M. Biogeography: an emerging cornerstone for understanding prokaryotic diversity, ecology, and evolution. **Microbial Ecology**, New York, v. 53, p. 197-207, 2007.

RASUL, G.; KHAN, K.S.; MÜLLER, T.; JOERGENSEN, R.G. Soil-microbial response to sugarcane filter cake and biogenic waste compost. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 171, p. 355-360, 2008.

RHEINHEIMER, D.S.; ANGHINONI, I.; FLORES, A.F. Organic and inorganic phosphorus as characterized by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance in subtropical soils under management systems. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 33, n. 11/12, p. 1853-1871, 2002.

RICHARDSON, A.E. Making microorganism mobilize soil phosphorus. In VELÁZQUEZ, E.; RODRÍGUEZ-BARRUECO, C. **First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization**, Dordrecht, p. 85-90, 2003.

RICHARDSON, A.E.; BAREA, J.-M.; MCNEILL, A.M.; PRIGENT-COMBARET, C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 321, p. 305-339, 2009.

RODRÍGUEZ, H. & FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, Amesterdã, v. 17: p. 319-339, 1999.

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

ROESCH L. F. W., CAMARGO F. A. O., BENTO F. M., TRIPLETT E. W. Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 302, p. 91-104, 2007.

SANTOS, D.H. et al. Qualidade tecnológica da cana-de-açúcar sob adubação com torta de filtro enriquecida com fosfato solúvel. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, Campina Grande, v.15, n.5, p. 443-449, 2011.

SANTOS, D.H.; SILVA, M.A.; TIRITAN, C.S.; CRUSCIOL, C.A.C. The effect of filter cakes enriched with soluble phosphorus used as a fertilizer on the sugarcane ratoons. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 36, n. 3, p. 365-372, 2014.

SANTOS, D.H.; SILVA, M.A.; TIRITAN, C.S.; FOLONI, J.S.S.; ECHE, F.R. Qualidade tecnológica da cana-de-açúcar sob adubação com torta de filtro enriquecida com fosfato solúvel. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, Campina Grande, PB, v. 15, n. 5, p. 443-449, 2011.

SCHLATTER, D.C.; BAKKER, M.G.; BRADEEN, J.M. KINKE, L.O.L. Plant community richness and microbial interactions structure bacterial communities in soil. **Ecology**, Washington, v. 96, p. 134-142, 2014.

SHEN, Y-Q., BONNOT, F., IMSAND, E.M., ROSEFIGURA, J.M., SJÖLANDER, K., KLINMAN, J.P. Distribution and properties of the genes encoding the biosynthesis of the bacterial cofactor, pyrroloquinoline quinone. **Biochemistry: American Chemical Society**, Washington, v. 51, p. 2265-2275, 2012.

SINGER, V.L.; JONES, L.J.; YUE, S.T.; HAUGLAND, R.P. Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 249, n. 2, p. 228-238, 1997.

SINGH, B. K., BARDGETT, R. D., SMITH, P., & REAY, D. S. Microorganisms and climate change: terrestrial feedbacks and mitigation options. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 8, p. 779-790, 2010.

SMART, J.B.; DILWORTH, M.J.; ROBSON, A.D. Effect of phosphorus supply on phosphate uptake and alkaline phosphatase activity in Rhizobia. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v.14, p.281-286, 1984.

SOGIN, M.L.; MORRISON, H.G.; HUBER, J.A.; WELCH, D.M.; HUSE, S.M.; NEAL, P.R.; ARRIETA, J.M.; HERNDL, G.J. Microbial Diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". **Proceedings of National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 103, p. 12115-12120, 2006.

SONG, O.; LEE, S.; LEE, Y.; LEE, S.; KIM, K.; CHOI, Y. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by Burkholderia cepacia da23 isolated from cultivated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39: p. 151-156, 2008.

SOUZA, R.S.C.; OKURA, V.K.; ARMANHI, J.S.L.; JORRÍN, B.; LOZANO, N.; SILVA, J.M.; GONZÁLEZ-GUERRERO, M.; ARAÚJO, M.L; VERZA, N.C.; BAGHERI, H.C.; IMPERIAL, J.; ARRUDA, P. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. **Scientific Reports**, London, v. 6, n. 28774, p. 1-15, 2016.

STAMFORD, N.P.; SANTOS, P.R.; FREIRE DE MOURA, A.M.M.; SILVA SANTOS, C.E.R.; SANTIAGO DE FREITAS, A.D. Biofertilizers with natural phosphate, sulphur and Acidithiobacillus in a soil with low available-P. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 4, 2003.

TARAFDAR, J.C; YADAV, R.S; MEENA, S.C. Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 164, p. 79-282, 2001.

TIECHER, T.; RHEINHEIMER, D.S; CALEGARI, A. Soil organic phosphorus forms under different soil management systems and winter crops, in a long term experiment. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 36, p. 271-281, 2012.

VERMA S.C.; LADHA J.K.; TRIPATHI, A.K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of entophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, p. 127-141, 2001.

WHITEHEAD, D.C. & RAISTRICK, N. Ammonia volatilization from five nitrogen

compounds used as fertilizers following surface application to soils. **Journal of Soil Science**, New Jersey, v. 41, p. 387-394, 1990.

XU, X.; HUI, D.; KING, A.W.; SONG, X.; THORNTON, P. E.; & ZHANG, L. Convergence of microbial assimilations of soil carbon, nitrogen, phosphorus, and sulfur in terrestrial ecosystems. **Scientific Reports**, London, v. 5, n. 17445, p. 1-8, 2015.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O P-lábil da solução do solo é a principal fração desse elemento responsável pela seleção de grupos bacterianos específicos na rizosfera da cana-de-açúcar. Além disso, a torta de filtro colabora com parte desse P-lábil, estimulando a biomassa microbiana do solo, principalmente quando aplicada às fontes mais solúveis de P como o MAP e o SFT. Esse estímulo aumenta a atividade dos micro-organismos da rizosfera resultando em maior acúmulo de P na biomassa microbiana. Isso é vantajoso para a cultura a longo prazo, já que o P da biomassa microbiana permanece biodisponível às plantas, sendo liberado gradualmente durante os estádios fenológicos mais tardios ou em cultivos futuros.

O presente estudo revelou que, com o desenvolvimento das plantas e do sistema radicular, a diversidade da rizosfera tende a se suavizar com a do *Bulk Soil*, evidenciando uma forte influência das plantas sobre a estrutura e a diversidade bacteriana do solo. Nesse meio, a rizosfera exerce um seletivo recrutamento de uma fração das espécies bacterianas nativas. Desse modo, ao longo do tempo com a redução nos teores de P-lábil no solo, a diversidade tende a retornar para o estado original de antes dos tratamentos fosfatados.

A torta de filtro beneficia mais alguns grupos de bactérias rizosféricas do que outros, destacando os pertencentes ao filo Proteobacteria. A esse filo é atribuída a maior parte das espécies promotoras de desenvolvimento vegetal associada à cana-de-açúcar. Isso mostra que além de ser rica em macro e micronutrientes, a torta de filtro estimula o desenvolvimento de sistemas no solo que melhoram o aproveitamento desses elementos pelas plantas, como a solubilização do P, a mineralização da MO e o metabolismo do N.

Diante dessas considerações, o presente estudo propõe a identificação e o isolamento de espécies bacterianas pertencentes às principais classes mencionadas, principalmente as classes α e β -Proteobacteria. A recomendação final seria a experimentação em campo desses grupos na forma de inoculantes. Isso permitiria avaliar o potencial de solubilização do fosfato de rocha ou o de acelerar a mineralização de fontes orgânicas aplicadas conjuntamente.