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

**Efeito da inoculação de bactérias mobilizadoras de fósforo na compostagem
e no desenvolvimento da cana-de-açúcar**

German Andres Estrada Bonilla

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

**Piracicaba
2015**

German Andres Estrada Bonilla
Microbiologista Industrial

Efeito da inoculação de bactérias mobilizadoras de fósforo na compostagem e no desenvolvimento da cana-de-açúcar

Versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2015

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

Estrada Bonilla, German Andres

Efeito da inoculação de bactérias mobilizadoras de fósforo na compostagem e no desenvolvimento da cana-de-açúcar / German Andres Estrada Bonilla. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.
122 p. : il.

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

1. Cana-de-açúcar 2. Composto 3. PGPR 4. Bactérias mobilizadoras de fósforo
5. Diversidade bacteriana 6. 16S DNAr 7. *T-RFLP* 8. Sequenciamento 9. Sistema MiSeq™
Illumina I. Título

CDD 633.61
E82e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

A mi mamá, Ruth Rebeca Bonilla Buitrago

A mi papá, Horacio Antonio Estrada Jaramillo

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde e pelas pessoas que apareceram neste “mundo” científico.

À Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP/ESALQ), pela acolhida e oportunidade de desenvolver o estudo.

À minha orientadora Dra. Elke Cardoso por sua orientação, confiança, apoio, sugestões, e principalmente por me acolher como um membro da família. Sempre soube que podia contar com a senhora.

À empresa BARAÚNA (Roberto Malimpence) pelo suporte técnico, financeiro, bolsa e por suas idéias no desenvolvimento da pesquisa.

À FINEP pela ajuda financeira no desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço a meus avós: Emperatriz Buitrago e Antonio Bonilla por me ensinarem que tudo o que me propor a fazer posso conseguir.

À meus pais Ruth Bonilla e Horacio Estrada por seu exemplo, apoio, estímulo e por sempre acreditarem em mim. Tudo o que sou hoje é graças ao esforço de vocês.

À meu irmão Boris por fazer parte de minha vida.

À meus tios Bethoven, Walter, Gade e Yuri por seu apoio e exemplo.

À minha noiva Paula de Almeida Carvalho pela paciência, compreensão nos momentos difíceis e por sua inspiração para lutar por um futuro melhor.

Ao Prof. Fernando Dini Andreote e Dr. Ademir Bigaton pela amizade, convivência, sugestões e colaboração no desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos Fernandinho (Fernando Baldesin) e Denise Mescolotti pela prontidão em me ajudar sempre que precisei.

Aos Professores. Godofredo Vitti e Rafael Otto pelo apoio no desenvolvimento do projeto.

À minha colega de projeto Cintia pela colaboração e parceria no desenvolvimento do projeto.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Carlos Clemente Cerri e Paulo Sergio Pavinato por suas correções e recomendações na continuação do projeto.

Aos meus colegas de laboratório, Joice, Tâmara, Cristiane, Marina, Rafael, Daniel, Paulinho, Jamil, Arthur, Mauricio, Maiele, Pedro, Diogo, Polé, Simone, Lucas, Fabio, Mylenne, Sonia, Doroteia, Joelma, Julia, Lucas, Juliana, Dani, Armando, Michele, por fazer

nosso ambiente de trabalho muito agradável, especialmente à Nicolle pela sua participação e dedicação ao trabalho.

A todos os demais familiares e amigos que sempre me apoiaram e incentivaram durante minha caminhada acadêmica.

“Los límites del hombre los impone su cabeza”

Maestro Jose Antonio Bonilla

SUMÁRIO

RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	16
LISTA DE FIGURA.....	18
LISTA DE TABELAS.....	22
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ÍMBOLO.....	24
1 INTRODUÇÃO.....	26
2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	28
2.1 Panorama da cana-de-açúcar no Brasil.....	28
2.2 Resíduos gerados durante a produção de açúcar e álcool.....	28
2.3 O processo de compostagem.....	29
2.4 Comunidades microbianas durante o processo de compostagem.....	30
2.5 O fósforo e sua importância na agricultura.....	31
2.6 Micro-organismos e disponibilidade de P.....	33
2.6.1 Solubilização de P.....	34
2.6.2 Mineralização de P.....	35
2.6.3 Inoculação de bactérias para aumentar a disponibilidade de P.....	36
2.7 Hipótese.....	38
2.8 Objetivo geral.....	38
2.9 Objetivos específicos.....	38
Referências.....	38
3 SUCESSÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA DURANTE A COMPOSTAGEM DE RESÍDUOS DA INDÚSTRIA SUCROENERGÉTICA E EFEITO DA ADIÇÃO DE BACTÉRIAS MOBILIZADORAS DE FÓSFORO.....	45
Resumo.....	45
Abstract.....	45
3.1 Introdução:.....	46
3.2 Material e métodos.....	47
3.2.1 Montagem e condução das leiras de compostagem.....	47
3.2.2 Estirpes e preparo do inoculante.....	49
3.2.3 Coleta de amostras, quantificação da temperatura e umidade durante a compostagem.....	50
3.2.4 Solubilização, mineralização de fosfato das estirpes usadas no inoculante.....	51
3.2.4.1 Reativação das estirpes.....	51

3.2.4.2 Determinação da capacidade de solubilizar P em meio de cultura líquido.....	51
3.2.4.3 Produção de enzimas fosfatases alcalina e ácida.....	52
3.2.5 Caracterização molecular das estirpes.....	52
3.2.5.1 Extração do DNA.....	52
3.2.5.2 Amplificação do gene 16S DNAr.....	52
3.2.5.3 Sequenciamento dos fragmentos e análise de similaridade.....	53
3.2.6 Avaliação da atividade das enzimas desidrogenase e fosfatases ácida e alcalina durante o processo de compostagem.....	53
3.2.6.1 Determinação da atividade enzimática da desidrogenase.....	53
3.2.6.2 Determinação da atividade enzimática das fosfatases ácida e alcalina.....	54
3.2.7 Análise das comunidades bacterianas durante a compostagem.....	54
3.2.7.1 Extração do DNA total.....	54
3.2.7.2 Análise da estrutura bacteriana por meio da técnica <i>T-RFLP</i>	54
3.2.7.3 Análise da diversidade filogenética bacteriana pelo sistema MiSeq™ (Illumina).....	55
3.2.7.4 Procedimentos de bioinformática para avaliação dos dados do sequenciamento.....	56
3.2.7.5 Análise estatística dos dados obtidos.....	57
3.2.8 Quantificação das comunidades bacterianas durante a compostagem.....	58
3.2.9 Análises químicas do material durante a compostagem.....	58
3.3 Resultados e discussão.....	58
3.3.1 Capacidade de mobilizar fosfato das estirpes e caracterização molecular das estirpes usadas no inoculante.....	58
3.3.2 Parâmetros químicos e bioquímicos durante a compostagem.....	62
3.3.3 Efeito da compostagem sobre o fósforo ligado ao cálcio.....	67
3.3.4 Sucessões das comunides bacterianas durante a compostagem.....	68
3.4 Conclusões.....	73
Referências.....	73
4 EFEITO DA APLICAÇÃO DE BACTÉRIAS MOBILIZADORAS DE FÓSFORO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA CANA-DE-AÇÚCAR E SOBRE AS COMUNIDADES BACTERIANAS DO SOLO.....	79
Resumo.....	79
Abstract.....	80
4.1 Introdução.....	81
4.2 Material e métodos.....	82
4.2.1 Potencial para mobilizar fósforo das estirpes usadas no inoculante.....	82

4.2.1.1 Determinação da capacidade de solubilizar fosfato em meio de cultura líquido.....	83
4.2.1.2 Determinação da produção de enzimas fosfatases alcalina e ácida pelas estirpes	83
4.2.1.3 Avaliação da produção de Auxinas.....	84
4.2.2 Caracterização molecular das estirpes.....	84
4.2.2.1 Extração do DNA.....	84
4.2.2.2 Amplificação do gene 16S DNAr.....	84
4.2.2.3 Sequenciamento dos fragmentos e análise de similaridade.....	85
4.2.3 Instalação do experimento com bactérias mobilizadoras de fósforo em plantas de cana-de-açúcar em casa de vegetação.....	85
4.2.3.1 Preparo do inoculante.....	85
4.2.3.2 Caracterização da rocha fosfática, composto, solo e cultivar de cana-de-açúcar.....	86
4.2.3.3 Produção das mudas, Plantio e delineamento experimental.....	87
4.2.3.4 Coleta de amostras.....	89
4.2.4 Determinação da atividade enzimática das fosfatases ácida e alcalina.....	90
4.2.5 Análise das comunidades bacterianas no solo.....	90
4.2.5.1 Procedimentos de bioinformática para avaliação dos dados do sequenciamento	91
4.2.5.2 Análise estatística dos dados obtidos.....	92
4.2.6 Análise química do material vegetal e do solo.....	92
4.2.7 Análise estatística dos dados.....	93
4.3 Resultados e discussão.....	93
4.3.1 Caracterização molecular e potencial para mobilizar fósforo das estirpes usadas no inoculante.....	93
4.3.2 Capacidade para mobilizar P pelas estirpes usadas nos inoculantes.....	95
4.3.3 Efeito da inoculação de bactérias mobilizadoras de fosforo sobre plantas de cana-de-açúcar.....	97
4.3.4 Efeito da inoculação de bactérias mobilizadoras de P sobre as comunidades bacterianas presentes no solo.....	103
4.4 Conclusões.....	108
Referências.....	109
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	116
ANEXOS.....	118

RESUMO

Efeito da inoculação de bactérias mobilizadoras de fósforo na compostagem e no desenvolvimento da cana-de-açúcar

A indústria sucroenergética gera grande quantidade de resíduos, sendo a torta de filtro e as cinzas os principais resíduos sólidos. Uma das tecnologias desenvolvidas para o manejo destes resíduos é a compostagem. A aplicação do composto tem mostrado efeitos positivos na cultura da cana-de-açúcar no que diz respeito à fertilização fosfatada. Os objetivos do presente trabalho foram: I. Observar o comportamento das comunidades bacterianas durante a compostagem e o efeito da inoculação de estirpes bacterianas mobilizadoras de fósforo sobre a disponibilidade de fósforo no composto final; II. Avaliar o efeito da aplicação de diferentes fontes de P e de bactérias mobilizadoras de fósforo no desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar e o efeito sobre as comunidades bacterianas do solo. Nesse sentido, pilhas de compostagem foram instaladas na Usina São José da Estiva em Novo Horizonte, SP. Os tratamentos consistiram de pilhas com e sem rocha fosfática; e pilhas com e sem a inoculação das estirpes *Pseudomonas aeruginosa* PSBR12 e *Bacillus* sp. BACBR1. Amostragens foram realizadas quinzenalmente durante 60 dias. Adicionalmente determinou-se a atividade enzimática, e parâmetros químicos do composto. A comunidade bacteriana foi acessada por meio da técnica independente de cultivo T-RFLP (restriction fragment length polymorphism) e sequenciado por meio da plataforma de nova geração MiSeq™ System (Illumina). Com o objetivo de avaliar o efeito do composto e da inoculação de bactérias mobilizadoras de P no desenvolvimento da cana-de-açúcar foi instalado um experimento em casa de vegetação com plantas de cana de açúcar, utilizando-se composto, rocha fosfática e super fosfato triplo como fontes de P, além da inoculação dos seguintes: Inoculante 1: *Pseudomonas* sp. PSBR10, *Azotobacter* sp. AZTBR19, *Rhizobium* sp. RIZBR01; e o Inoculante 2: *Bacillus simplex* BACBR04, *Bacillus* sp. BACBR06, *Rhizobium* sp. RIZBR01. O experimento foi conduzido durante 75 dias. Ao fim do experimento foram analisados os seguintes parâmetros: biomassa seca, acúmulo de P, N, e K na parte aérea, e fosfatases no solo. A estrutura das comunidades bacterianas no solo foram avaliadas por meio do sequenciamento na plataforma Illumina. A aplicação de bactérias mobilizadoras de P durante a compostagem diminuiu o P ligado ao Ca. A mudança nas comunidades bacterianas durante a compostagem foi temporal, no início dominaram membros da ordem Lactobacillales, após 15 dias as ordens Bacillales e Clostridiales passaram a dominar o processo. As comunidades bacterianas são influenciadas principalmente pelos parâmetros pH, temperatura e umidade. Quanto ao experimento em casa de vegetação, o uso dos inoculantes (principalmente o inoculante 2) aumentou o acúmulo de P, N e K na parte aérea nos tratamentos que receberam composto e super fosfato triplo como fonte de P. A aplicação dos inoculantes e a adição do composto modificou a estrutura das comunidades bacterianas do solo; essa alteração quando os inoculantes são aplicados pode estar relacionada com o incremento no acúmulo de nutrientes. O uso de bactérias mobilizadoras de P é uma tecnologia potencial para o uso na agricultura, tanto na compostagem de resíduos da indústria sucroenergética com rocha fosfática, como no aumento da eficiência da fertilização fosfatada na cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; Composto; PGPR; Bactérias mobilizadoras de fósforo; Diversidade bacteriana; 16S DNAr; T-RFLP; Sequenciamento; Sistema MiSeq™ Illumina

ABSTRACT

Inoculation effect of phosphorus mobilizing bacteria in the compost and on the development of sugarcane

Sugarcane industry generates large amounts of waste, filter cake and ashes being the main solid wastes. One of the technologies developed for the management of this waste is composting. The application of compost has shown positive effects on the sugarcane culture with regard to phosphorus fertilization. The objectives of this study are: I. To study the diversity of bacterial communities during composting and the effect of inoculation of phosphorus mobilizing bacterial strains on the phosphorus availability in the final compost; II. To evaluate and compare the effects of the application of different sources of phosphorus and P mobilizing bacteria on the development of sugarcane and the effect on soil bacterial communities. Therefore, compost piles were installed at Usina São José da Estiva in Novo Horizonte, Brazil. Treatments consisted of piles with and without rock phosphate and with and without inoculation of *Pseudomonas aeruginosa* PSBR12 and *Bacillus* sp. BACBR1 strains. Samples were taken every two weeks for 60 days. In addition, the enzymatic and chemical composition of the compost was determined. The bacterial community was assessed through T-RFLP (restriction fragment length polymorphism) and was sequenced through the new generation platform MiSeq™ System (Illumina). The abundance of bacteria was evaluated by qPCR. In order to evaluate the effect of compost and of inoculating P mobilizing bacteria on sugarcane development, a greenhouse experiment was installed with sugarcane using compost, rock phosphate and triple superphosphate as P sources, besides inoculations, as follows: Inoculant 1: *Pseudomonas* sp. (PSBR10) *Azotobacter* sp. (AZTBR19), *Rhizobium* sp. (RIZBR01); and Inoculant 2: *Bacillus simplex* (BACBR04), *Bacillus* sp. (BACBR06), *Rhizobium* sp. (RIZBR01). The experiment was conducted during 75 days. At the end of the experiment the following parameters were analyzed: dry plant biomass, accumulation of P, N, and K in the shoot, and phosphatases in soil. Bacterial soil communities were sequenced through the new generation Illumina. The application of P mobilizing bacteria during composting decreased the Ca-linked P. Changes of the bacterial communities during composting were temporal. In the beginning, members of the order Lactobacillales were dominant and after 15 days a succession of bacterial communities occurred, when Bacillales and Clostridiales began to dominate. Bacterial communities are mostly influenced by the parameters pH, temperature and humidity. Moreover, in the greenhouse experiment, the use of inoculants (mainly inoculant 2) increased the accumulation of P, N and K in shoots in the treatments that received compost and triple superphosphate as P source. Inoculant application and compost addition modified soil bacterial community structures. Changes in the soil microbiome when inoculant was applied may be related to the increase in nutrients accumulation. The use of P mobilizing bacteria is a potential technology for use in agriculture, when composting waste from the sugarcane industry with rock phosphate or when increasing P fertilization efficiency in sugarcane in the field.

Keywords: Sugarcane; Composting; PGPR; Phosphorus mobilizing bacteria; Bacterial diversity; 16S rDNA; T-RFLP; Sequencing; Illumina system MiSeq™

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 - Representação da importância dos micro-organismos na disponibilidade do fósforo no solo. Os micro-organismos podem aumentar a disponibilidade de fósforo no solo através de reações de solubilização e mineralização.....34
- Figura 3.1 - Instalação do experimento de compostagem na usina São José da Estiva.....49
- Figura 3.2 - Instalação das pilhas e os diferentes níveis (1, 2, 3, 4, 5), onde foram coletadas as amostras.....50
- Figura 3.3 - Solubilização de rocha fosfática de Araxá, associada com a alteração de pH e a população bacteriana durante 15 dias de crescimento. A. *Pseudomonas aeruginosa* PSBR12; B. *Bacillus* sp. BACBR01. As barras indicam o erro padrão para três repetições.....59
- Figura 3.4 - Árvore filogenética baseada nas sequências parciais do gene 16S rRNA, incluindo as sequências das estirpes mobilizadoras de P utilizadas no inoculante. A árvore foi gerada pelo método *neighbour-joining*. Os números mostrados nas conexões indicam os valores de bootstrap (percentual de 1000 repetições). A barra de escala indica a taxa de substituição por base. Os números após a espécie indicam a sequência de acesso do banco de dados NCBI.....62
- Figura 3.5 - Mudança na temperatura (A) e na umidade (B), durante 60 dias de compostagem de resíduos da indústria sucroenergética. As barras indicam o erro padrão de três repetições.....63
- Figura 3.6 - Comportamento do pH (A) e atividade da enzima desidrogenase (B), durante 60 dias de compostagem de resíduos da indústria sucroenergética. As barras indicam o erro padrão de três repetições.....65
- Figura 3.7 - Atividade no tempo das fosfatases alcalina (A) e ácida (B), durante 60 dias de compostagem de resíduos da indústria sucroenergética. Média de 3 repetições. Letras iguais diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....67
- Figura 3.8 - Análise de redundância (RDA) mostrando a relação entre a estrutura da comunidade bacteriana e parâmetros ambientais durante o período da compostagem. A. RDA realizada usando os perfis do TRFLP. B. RDA realizada usando as UTOs obtidas usando a plataforma Illumina. * Parâmetros significativos pelo teste de Monte Carlo a 5% de probabilidade.....69

- Figura 3.9 - Abundância de bactérias durante a compostagem. Letras iguais não diferem entre si, comparação dos tratamentos no tempo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias de três repetições.....70
- Figura 3.10 - Dinâmica da estrutura bacteriana (nível de ordem) durante a compostagem de resíduos da indústria sucroenergética..... 72
- Figura 4.1 - Plantio e seleção das mudas usadas no experimento.....88
- Figura 4.2 - Árvore filogenética baseada nas sequências parciais do gene 16S RNAr, incluindo as sequências das estirpes mobilizadoras de P utilizadas nos inoculantes. A árvore foi gerada pelo método *neighbour-joining*. Os números mostrados nas conexões indicam os valores..... 94
- Figura 4.3 - Acúmulo de Fósforo na parte aérea de plantas de cana-de-açúcar, variedade RB 85-5453, coletadas 75 dias após o plantio. Inoculante 1: *Pseudomonas* sp. PSBR10, *Azotobacter* sp. AZTBR19, *Rhizobium* sp. RIZBR01; Inoculante 2: *Bacillus simplex* BACBR04, *Bacillus* sp. BACBR06, *Rhizobium* sp. RIZBR01. SPT: Super fosfato triplo. Letras iguais maiúsculas para fontes de P não diferem entre si pelo teste Tukey a 10% de probabilidade. * Indica diferença significativa em relação ao tratamento sem inoculante.....98
- Figura 4.4 - Efeito do inoculante 2 sobre plantas de cana-de-açúcar da variedade IR42 40 dias após o plantio. Inoculante 2: *Bacillus simplex* BACBR04, *Bacillus* sp. BACBR06, *Rhizobium* sp. RIZBR01. A. Tratamento com composto como fonte de P; B. Tratamento com super fosfato triplo como fonte de P..... 102
- Figura 4.5 - Atividade das fosfatases alcalina (A) e ácida (B), no solo após a colheita das plantas de cana-de-açúcar. Média de 4 repetições. * difere do tratamento sem inoculante pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 103
- Figura 4.6 - Análise de coordenadas principais (PCoA) para os grupos formados com base na análise de sequenciamento para comunidades de bactérias totais (gene 16S rDNA) comparando o tratamento sem inoculante com os tratamentos em que foram usados os inoculantes 1 e 2.....106
- Figura 4.7 - Estimativa da α diversidade no solo 75 dias após o plantio. Média de 4 repetições. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * indica diferença significativa em relação ao tratamento sem inoculante..... 107
- Figura 4.8 - Dinâmica da estrutura bacteriana (nível de filo) no solo com os diferentes tratamentos. T1: Sem P; T2: Composto; T3: Rocha fosfática de Araxá; T4:

Composto + Rocha fosfática de Araxá; T5: Super fosfato triplo; T6: Super fosfato triplo + Composto..... 108

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Efeito da inoculação de micro-organismos mobilizadores de P sobre o desenvolvimento de culturas em experimentos em casa de vegetação (CV) e campo (CA).....	37
Tabela 3.1 - Análise química da rocha de Araxá usada no experimento.....	48
Tabela 3.2 - Tratamentos utilizados no experimento.....	48
Tabela 3.3 - Estirpes potenciais solubilizadoras de fosfato inoculadas durante a compostagem	50
Tabela 3.4 - <i>Primers</i> , genes alvo e enzimas usados na restrição para a metodologia de <i>T-RFLP</i>	54
Tabela 3.5 - <i>Primers</i> utilizados na reação de PCR para sequenciamento da região V4 ribossomal.....	56
Tabela 3.6 - Produção de fosfatases ácida e alcalina pelas bactérias utilizadas no inoculante aplicado na compostagem, após 24 h de crescimento das culturas em meio SMRS1. Média de três repetições.....	61
Tabela 3.7 - Teores de P ligado ao Ca durante a compostagem. O P foi determinado na fração extraída por HCl (60 DAP). Nos tratamentos inoculados foram adicionadas as estirpes <i>P. aeruginosa</i> PSBR12 e <i>Bacillus</i> sp. BACBR01. Médias seguidas por letras iguais (maiúsculas para tempo e minúsculas para inoculação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 10% de probabilidade. Dados adaptados de Lopes, 2014.....	68
Tabela 4.1 - Estirpes potenciais solubilizadoras de fosfato utilizadas nos inoculantes.....	82
Tabela 4.2 - <i>Primers</i> utilizados para sequenciamento do gene 16S RNAr das estirpes.....	85
Tabela 4.3 - Caracterização química do solo utilizado no experimento.....	87
Tabela 4.4 - Teor de P na rocha fosfática de Araxá e no composto utilizado no experimento com plantas de cana-de-açúcar.....	87
Tabela 4.5 - Tratamentos utilizados no experimento em casa de vegetação.....	89
Tabela 4.6 - <i>Primers</i> utilizados na reação de PCR para sequenciamento da região V4 ribossomal.....	91
Tabela 4.7 - Potencial para mobilizar fósforo pelas estirpes usadas nos inoculantes. A solubilização de PO_4^{3-} e o efeito sobre o pH foi quantificado 48 horas após a incubação. A produção de fosfatases ácida e alcalina, e de compostos indólicos	

foram quantificados após 24 horas após a inoculação. Os dados são médias de 3 repetições $\pm$ erro padrão..... 96

Tabela 4.8 - Acúmulo de nitrogênio e Potássio na parte aérea de plantas de cana-de-açúcar, variedade RB 85-5453, coletadas 75 dias após o plantio. Inoculante 1: *Pseudomonas* sp. PSBR10, *Azotobacter* sp. AZTBR19, *Rhizobium* sp. RIZBR01; Inoculante 2: *Bacillus simplex* BACBR04, *Bacillus* sp. BACBR06, *Rhizobium* sp. RIZBR01. *SPT: Super fosfato triplo. Letras iguais maiúsculas para fontes de P e minúsculas para Inoculante não diferem entre si pelo teste Tukey a 10% de probabilidade..... 100

Tabela 4.9 - Acúmulo de massa seca e concentração foliar de P da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar, variedade RB 85-5453, coletadas 75 dias após o plantio. Inoculante 1: *Pseudomonas* sp. PSBR10, *Azotobacter* sp. AZTBR19, *Rhizobium* sp. RIZBR01; Inoculante 2: *Bacillus simplex* BACBR04, *Bacillus* sp. BACBR06, *Rhizobium* sp. RIZBR01. *SPT: Super fosfato triplo. Letras iguais maiúsculas para fontes de P e minúsculas para Inoculante não diferem entre si pelo teste Tukey a 10% de probabilidade..... 101

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
AD	Atividade da desidrogenase
AI	Após a inoculação
AOA	Ácidos orgânicos aniônicos
BMF	Batérias mobilizadoras de fósforo
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de Carbono
CTC	Capacidade de troca catiônica
DAMP	Dias após a montagem das pilhas
d	Dia
DAP	Dias após o plantio
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleosídeo Trifosfato
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
FAc	Fosfatases acida
FAlc	Fosfatases alcalina
g	Grama
H + Al	Acidez potencial
L	Litros
m	Metro

M	Molar
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MO	Matéria orgânica
ng	Nanograma
O ₂	Oxigênio
pb	Pares de Base
PCoA	Análise de coordenadas principais
PCR	“Polymerase Chain Reaction” (Reação de polimerase em cadeia)
pH	Potencial Hidrogeniônico
pNP	<i>P</i> -nitrofenol fosfato
pmol	Picomoles
q-PCR	PCR quantitativo
RDA	Análise de redundância
rpm	Rotações por Minuto
rRNA	Ácido Ribonucléico Ribossomal
s	Segundo
SPT	Super fosfato Triplo
T-RFLP	<i>Terminal restriction fragment length polymorphism</i>
TTF	Trifenil formazana
U	Unidade
UTO	Unidade Taxônomica Operacional

1 INTRODUÇÃO

Desde a colonização do Brasil a cultura da cana-de-açúcar é de grande importância socioeconômica. Atualmente a área cultivada é estimada em 9,00 milhões de hectares, sendo o estado de São Paulo o maior produtor com 51,7 % (4.690 mil hectares) (CONAB, 2015). No atual cenário energético do Brasil há um grande interesse em diminuir a dependência por combustíveis fósseis, surgindo como uma alternativa os biocombustíveis, em especial, o etanol de cana-de-açúcar.

Entretanto, para atender à demanda crescente de etanol é necessário otimizar a produção de cana-de-açúcar. Com essa finalidade, estratégias de manejo vêm sendo adotadas a fim de reduzir os custos de produção e ocasionando uma consequente expansão econômica do setor. Uma das estratégias é diminuir a demanda por fertilizantes minerais através de técnicas que levem à sua melhor utilização e aproveitamento.

O fósforo (P) é um nutriente-chave no metabolismo da cana-de-açúcar, embora seja absorvido em menores quantidades em relação aos outros macronutrientes primários (nitrogênio e potássio). O P atua na formação de proteínas, processos de divisão celular, no ciclo fotossintético C4, armazenamento de energia, desdobramento de açúcares e respiração. Além disso, a partir do fornecimento da energia bioquímica do ATP (adenosina trifosfato), a glucose-1-fosfato e frutose são catalisadas à sacarose, que é matéria-prima para a produção de açúcar e álcool. Nesse contexto, são crescentes os interesses na descoberta de mecanismos mais eficientes de aquisição de P pelas plantas.

A compostagem tem sido usada por centenas de anos para melhorar as características dos solos agrícolas. Porém, nas últimas décadas começou-se a entender e otimizar especificamente os processos bioquímicos que envolvem esta prática. Diante disto, a compostagem apresenta-se como um possível destino para os resíduos do processamento da cana-de-açúcar (torta de filtro e cinzas). A aplicação do composto traz conhecidas melhorias nas características físicas e químicas do solo e, consequentemente pode aumentar a produtividade das culturas (COLETI et al., 1986), otimizando e reduzindo o uso de fertilizantes minerais.

Descobriu-se que muitas bactérias do solo ou rizosfera de plantas possuem capacidade de solubilizar o P inorgânico e mineralizar o P orgânico. Estes micro-organismos são conhecidos como bactérias mobilizadoras de fósforo (BMF) e possuem um importante papel ecofisiológico, disponibilizando o P antes insolúvel na matriz mineral e na matéria orgânica para as plantas. É conhecido o efeito benéfico da aplicação de BMF sobre o desenvolvimento

de diversas culturas, entretanto existem poucos trabalhos sobre o efeito de sua aplicação na nutrição fosfatada na cultura da cana-de-açúcar, quando são usadas fontes alternativas de P, como o composto.

Neste sentido, os objetivos do trabalho foram aprofundar os estudos sobre as comunidades microbianas que dominam cada etapa durante a compostagem de resíduos da indústria sucroenergética e entender seu funcionamento, além de testar o uso de BMF que possam aperfeiçoar a disponibilidade de P. Por outro lado, foi testado o efeito da inoculação de BMF com a aplicação de diferentes fontes de P sobre a nutrição fosfatada de plantas de cana-de-açúcar, a fim de verificar se esta inoculação modifica a estrutura das comunidades bacterianas do solo.

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 Panorama da cana-de-açúcar no Brasil

A cana-de-açúcar pertence à família das Poaceae, espécie *Saccharum spp.*, originária da Ásia Meridional, é cultivada principalmente em países tropicais e subtropicais dentro de uma latitude de 35° ao norte e ao sul do equador. O Brasil é líder na produção canavieira no mundo, seguido pela Índia, China e Tailândia. Na safra 2014-2015 foram plantados 9,00 milhões de hectares e foram colhidos 634,75 milhões de toneladas, com produtividade de 70,49 t ha⁻¹ (CONAB, 2015).

A grande importância da cana-de-açúcar no Brasil é devido à contribuição econômica, social e ambiental que desempenha para o país, sendo considerada a segunda cultura mais importante para o agronegócio brasileiro. O agronegócio, em torno da cultura, movimenta somente no estado de São Paulo, algo em torno de 20 bilhões de reais, representando 35% do Produto Interno Bruto (PIB) agrícola paulista e 8% do PIB nacional (BAPTISTUSSI, 2010). São empregadas aproximadamente 1,2 milhão de pessoas nas aproximadamente 370 unidades sucroalcooleiras (dos SANTOS, 2009). No cenário atual existe uma crescente necessidade de gerar energia a partir de fontes renováveis, o que vem incitando a produção de etanol e energia a partir da cana-de-açúcar.

2.2 Resíduos gerados durante a produção de açúcar e álcool

Com o crescimento da Agroindústria no Brasil, o volume de resíduos orgânicos é crescente. Nas usinas de açúcar e álcool são geradas grandes quantidades de resíduos como a torta, cinza e bagaços para a queima. A torta de filtro é um resíduo composto da mistura de bagaço moído e lodo de decantação sendo proveniente do processo de tratamento e clarificação do caldo de cana-de-açúcar. São produzidos entre 22 a 40 kg de torta para cada tonelada moída de cana. Na safra 2014/15 foram moídas 634,75 milhões de toneladas de cana-de-açúcar (CONAB, 2015), para uma produção total de 19,04 milhões de toneladas de torta de filtro. A composição da torta de filtro é variável e depende da variedade e da maturação da cana. Este material possui altos teores de matéria orgânica (MO), P e cálcio, além de concentrações significativas de K, magnésio e micronutrientes. Na torta, o P se encontra principalmente na forma orgânica, sendo sua liberação dependente da mineralização e do ataque de micro-organismos presentes no solo (NUNES JUNIOR, 2008).

A ausência de uma destinação adequada dos resíduos gerados na produção de açúcar e álcool pode resultar em problemas ambientais. Na indústria sucroalcooleira algumas usinas utilizam a torta de filtro complementada com P mineral como uma alternativa para reduzir a adubação fosfatada (SANTOS et al., 2010). Outra tecnologia adotada é a compostagem da torta junto a outros resíduos, como esterco animal e rocha fosfática, em processos de compostagem, gerando um fertilizante organomineral. Adicionalmente, a compostagem é uma alternativa para o aproveitamento dos resíduos, reduzindo em aproximadamente 50% o volume e a massa dos resíduos produzidos, além de gerar um composto estável que pode ser benéfico à agricultura (SÁNCHEZ-MONEDERO et al., 2002; CHEFETZ et al., 1996). Deste modo, esses resíduos podem ser reciclados através da compostagem e utilizados de maneira sustentável, sendo fonte de matéria prima para a produção de fertilizantes orgânicos e organominerais.

2.3 O processo de compostagem

Os ciclos biológicos dos nutrientes são indispensáveis para a vida, e, são mediados pela ação de micro-organismos. Segundo Insam e De Bertoldi (2007), a biotransformação é definida como uma modificação biológica que altera a estrutura química. Por meio da biotransformação usando átomos ou moléculas simples, são sintetizadas moléculas mais complexas (biossíntese), ou vice-versa (biodegradação, mineralização). A biodegradação é a quebra de uma estrutura molecular em seus componentes elementares, na qual ocorre um rompimento de complexos em compostos mais simples, ou até mesmo átomos. O rompimento geralmente não é uma simples fragmentação, geralmente os átomos também são incorporados para formar novos compostos (INSAM; De BERTOLDI, 2007).

Nelson e Sommers (1996) definem a compostagem como a bio-oxidação de substratos orgânicos heterogêneos através de processos de degradação biológica resultando em um produto estável e rico em nutrientes adequados para a correção da fertilidade do solo. O composto consiste de células microbianas, resíduos vegetais e animais em vários estádios de decomposição, húmus estável sintetizado a partir de resíduos de micro-organismos e de seus componentes carbonados. Os componentes orgânicos biodegradáveis passam por etapas sucessivas de transformações, sob a ação de diversos grupos de micro-organismos, resultando num processo bioquímico altamente complexo (BETTIOL; CAMARGO, 2000).

Segundo Kiehl (1998), as fases pelas quais a matéria-prima passa pelo processo de compostagem podem ser resumidas em três. A primeira (fitotóxica) é marcada pelo início da

decomposição da matéria orgânica e se caracteriza pela liberação de calor, vapor de água e CO₂. Os materiais orgânicos entrantes possuem reação ácida, portanto, no início da decomposição biológica desenvolvem-se traços de diversos ácidos minerais e orgânicos, principalmente ácido láctico e acético e outras toxinas danosas às plantas. Na segunda fase, (semicura), a decomposição pouco avança e o material entra no estágio de bioestabilização não sendo prejudicial para as plantas, porém, ainda não apresenta as características e propriedades ideais. Na terceira, denominada de maturação ou humificação, que é o estágio final da degradação quando ocorre a mineralização de determinados componentes da matéria orgânica e o composto adquire as desejáveis propriedades físicas, químicas, físico-químicas e biológicas (ZUCCONI; De BERTOLDI, 1986; KIEHL, 1998).

Na compostagem são liberados sais minerais, que contêm nutrientes para as raízes das plantas, e húmus. O composto obtido é um condicionador e melhorador das propriedades químicas (capacidade de troca de cátions (CTC), complexação de elementos tóxicos, etc), físicas (estrutura, retenção de água, densidade) e biológicas do solo (WESTERMAN; BICUDO, 2005).

2.4 Comunidades microbianas durante o processo de compostagem

Browne (1933) foi o primeiro a provar que o auto-aquecimento de compostos é devido à atividade biológica, já Waksman (1932) foi quem iniciou estudos e publicações sobre a microbiologia da compostagem e dinâmica de populações durante o processo. Desde aquele período, por cinco décadas, procedimentos de isolamento e cultivo constituíram a base de estudos de comunidades microbianas na compostagem (FINSTEIN; MORRIS, 1975). Sabe-se que apenas uma pequena fração (<1%) dos micro-organismos presentes no solo e sedimentos é cultivável por técnicas atualmente disponíveis (TORSVIK, 1980).

O recente desenvolvimento de novas abordagens com o uso de DNA e RNA tem mostrado que muitas espécies desconhecidas de micro-organismos podem ser encontradas durante a compostagem (BEFFA et al., 1996). O desenvolvimento de ferramentas como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise de sequência do gene 16S rRNA recentemente têm inspirado inúmeros estudos em microbiologia ambiental. Blanc et al. (1997) investigaram uma biblioteca de clones do gene bacteriano 16S rRNA na tentativa de caracterizar comunidades termofílicas no composto na fase de aumento de temperatura; e Kowalchuk et al. (1999) caracterizaram bactérias oxidantes de amônia por análises de rDNA, rRNA, e *amoA*, gene que codifica uma subunidade da amônia monoxigenase. Peters et al.

(2000) investigaram sucessões na comunidade microbiana durante a compostagem por meio de perfis SSCP ('single strand conformation polymorphism'). Alfreider et al. (2002) compararam as técnicas de DGGE e SSCP no estudo da compostagem, mostrando que ambos os métodos são igualmente adequados, entretanto ambas abordagens resultaram em comunidades de diferentes composições, provavelmente devido ao uso de diferentes primers para amplificação do 16s rDNA.

Estudos de comunidades bacterianas realizados por Chandna, Mallik e Kuhad (2013) usando o sequenciamento do gene 16S RNAr de isolados provenientes da compostagem de co-produtos agrícolas mostraram que as classes Bacilli, γ , β -Proteobacteria, e Actinobacteria foram dominantes durante o processo. Tian et al. (2013) trabalhando com biblioteca de clones, encontraram que os filos mais abundantes durante todas as fases da compostagem foram Firmicutes e Proteobacteria, entretanto o filo Actinobacteria foi apenas dominante na fase termófila. Martins et al. (2013), usando o sequenciador Roche/454 em compostagem de resíduos de zoológico, observaram que em um dos microbiomas avaliados, o gênero *Bacillus* dominou o processo e que a degradação da biomassa durante o processo de compostagem foi totalmente realizado por enzimas de origem bacteriana.

Novas enzimas com potencial industrial têm sido caracterizadas usando técnicas de biologia molecular durante processos de compostagem. Jeong et al. (2012) descreveram uma nova xilanase de uma biblioteca metagenômica realizada durante o processo de compostagem de resíduos da criação de porcos e da produção de fungos comestíveis, sendo que a enzima pode ser usada na produção de biocombustíveis. Kang et al. (2011) obtiveram uma nova esterase com um alto interesse industrial, devido sua estabilidade em solventes orgânicos, na sua atividade sobre ésteres de cetoprofeno e álcoois terciários.

2.5 O fósforo e sua importância na agricultura

Depois do N, o P é o segundo elemento mais limitante para o desenvolvimento das plantas (BIELESKI, 1973). O P tem papel indispensável na biosfera já que faz parte dos ácidos nucléicos, os quais armazenam o código genético. Muitas das substâncias intermediárias da fotossíntese e da respiração celular estão combinadas com P e, além disso, este faz parte da moeda energética da vida, o ATP (BRADY; WEIL, 2004). Na Fixação Biológica de Nitrogênio o P possui uma importante função, já que a redução do N_2 a NH_4 é um processo consumidor de energia, sendo dependente da disponibilidade de ATP (SA; ISRAEL, 1991).

O P no solo está presente em níveis de 400 a 1200 mg kg⁻¹ (JONES, 2000). Em seu ciclo não existe troca com a atmosfera. Este ciclo ocorre por meio da oxidação e redução cíclica dos compostos do P, onde a transferência dos elétrons se dá entre estados de oxidação mais baixos da fosfina (-3) até o fosfato (+5). As plantas só o absorvem em forma de ânions ortofosfatados (predominantemente HPO₄²⁻ e H₂PO₄⁻ a partir da solução do solo) (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999). Apesar dos solos geralmente apresentarem uma grande quantidade de P total, apenas uma pequena parte está imediatamente disponível para absorção pelas plantas geralmente 1-5 µM (BIELESKI, 1973).

No solo, o P existe em formas inorgânicas (Pi) e orgânicas (Po). A maioria do Pi aplicado no fertilizante mineral é retido. Em solos ácidos, o P pode ser adsorvido principalmente pelos óxidos e hidróxidos de Al/Fe, como a gibbsita, hematita e goethita (PARFITT, 1989). Os óxidos de Fe/Al possuem grande superfície específica de contato, possuindo um grande número de sítios de adsorção. A adsorção de P no solo pode ser maior quando aumenta a força iônica. Os óxidos de Fe/Al apresentam nano-poros onde o P pode ser ocluído, assim, torna-se indisponível para as plantas (ARAI; SPARKS, 2007).

Em solos neutros com tendência à alcalinidade, a imobilização do P se dá principalmente por reações de precipitação, embora o P também possa ser adsorvido pela superfície do carbonato de Ca e argilas (SHEN et al., 2011). O fosfato pode precipitar com Ca, gerando o fosfato dicálcico, o qual é disponível para as plantas. O fosfato dicálcico pode ser transformado em formas mais estáveis, como o fosfato octocálcico e a hidroxiapatita, que são menos disponíveis para as plantas quando o pH é alcalino (ARAI; SPARKS, 2007).

No solo, geralmente 30-65% do P estão na forma de Po, representando de 1 a 3 % da matéria orgânica (humificada ou não) (HARRISON, 1987). O Po está principalmente em formas estáveis como os fosfatos de inositol e os ácidos fosfônicos, e formas mais ativas como diésteres de fosfatos, monoésteres de fosfato lábeis, e polifosfatos orgânicos (CONDRON; TURNER; CADE-MENUN, 2005). Os diferentes compostos podem estar em forma lábil, passiva ou resistente à decomposição e mineralização no solo.

Devido às condições de intemperismo a maioria dos solos utilizados para a agricultura no Brasil possui níveis baixos de P disponível, abaixo dos níveis exigidos pelas culturas (SANTOS et al., 2008). Na agricultura intensiva, para obter uma produção de 7 Mg ha⁻¹ de grão, é preciso aplicar de 90 a 120 kg P ha⁻¹. No entanto, mesmo com a aplicação da dose adequada de P, apenas 20% ou menos são assimilados pela cultura no primeiro ano, o que contribui para o acúmulo deste elemento em solos cultivados (VANCE, 2001).

As rochas fosfáticas (27-38% de P_2O_5) são as principais fontes de P empregadas para produzir os diferentes tipos de adubos fosfatados. Os fosfatos têm como origem principal as rochas sedimentares, e em menor quantidade rochas ígneas. Independentemente da sua origem, pertencem ao grupo das apatitas, e as variantes mais comuns encontradas são flúorapatita e francolita (IGUAL; RODRIGUEZ-BARRUECO, 2007). Embora os depósitos de rocha fosfática sejam encontrados em mais de 30 países em todo o mundo, atualmente cerca de dois terços da demanda global de P são produzidos pelos três principais produtores, ou seja, EUA, China e Marrocos (EFMA, 2002).

2.6 Micro-organismos e disponibilidade de P

Os micro-organismos são essenciais no ciclo do P no solo e como tal desempenham um importante papel na disponibilidade de fosfato para as plantas. Os micro-organismos presentes na rizosfera podem aumentar ou diminuir a disponibilidade de fosfato para as plantas (Figura 2.1). Este grupo de micro-organismos são chamados de mobilizadores de P, já que disponibilizam P diretamente, pela solubilização e mineralização do fosfato, ou indiretamente, pela estimulação do crescimento das raízes e pêlos radiculares, levando ao aumento da captação de fosfato pela planta (SHARMA et al., 2013). No entanto, a captação de fosfato pela planta pode ser diminuída pela competição ou por meio da inibição do crescimento das raízes e pêlos radiculares. A quantidade de fosfato presente na biomassa microbiana que é disponibilizado para a planta é variável e influenciada pela quantidade de carbono no solo. A captação de fosfato pela biomassa microbiana (imobilização) pode reduzir o fosfato disponível para a planta, entretanto o retorno (do inglês “turnover”) da biomassa pode liberar fosfato gradualmente, evitando sua fixação no solo em formas menos disponíveis (RICHARDSON e SIMPSON, 2011).

Figura 2.1 - Representação da importância dos micro-organismos na disponibilidade do fósforo no solo. Os micro-organismos podem aumentar a disponibilidade de fósforo no solo através de reações de solubilização e mineralização

2.6.1 Solubilização de P

Sabe-se que um grande número de micro-organismos presentes no solo é capaz de solubilizar o P. Estima-se que 1 a 50% das bactérias e 0,5 a 1% dos fungos do solo podem ser classificados como micro-organismos solubilizadores de Pi (GYANESHWAR et al., 2002). A liberação de prótons resultado do metabolismo dos micro-organismos pode alterar o pH da solução do solo nas proximidades da célula, mudando a disponibilidade dos nutrientes minerais. A solubilização do fósforo pela acidificação é associada principalmente ao fósforo ligado ao Ca em solos com pH próximo à neutralidade (GYANESHWAR et al., 1999). A fonte de N utilizada no meio de cultura ou na adubação nitrogenada influencia a solubilização de Pi. Quando NH_4^+ é utilizado como única fonte de N, a solubilização de P é maior em comparação ao NO_3^- . Isso ocorre devido a extrusão celular de prótons para compensar os íons NH_4^+ assimilados (SHARAN; SHIKHA; DARMWAL, 2008).

Em condições de meio de cultura Park, Lee e Son (2009) demonstraram que a fonte de carbono (glicose, frutose) exerce maior influência na solubilização de fósforo, em comparação a fonte de nitrogênio utilizada (NH_4^+ , NO_3^-) com a estirpe *Pseudomonas fluorescens*. O

estudo indica que a liberação de prótons não está simplesmente associada à presença de NH_4^+ . Gyaneshwar et al. (1999) utilizando um meio tamponado com rocha fosfática demonstrou que o número de micro-organismos com capacidade de diminuir o pH e solubilizar fosfato diminui consideravelmente. A acidificação não explica totalmente a capacidade de solubilizar fosfato devido a capacidade tampão dos solos (WHITELAW, 2000). Com a liberação de prótons para o meio externo também são liberados ácidos orgânicos aniônicos (AOA) (CASARIN et al., 2003).

Alguns micro-organismos liberam AOA de baixa massa molecular (carboxilatos) como mecanismo de solubilização de fosfato (PATEL; ARCHANA; NARESH KUMAR, 2008). Entre os AOA liberados pelos micro-organismos estão o glucônico, 2-cetoglucônico, cítrico, málico, malônico, oxálico, succínico, láctico, tartárico e ácidos glicólicos (DEUBEL; MERBACH, 2005). A diminuição do pH do meio não é causada pela liberação de AOA e sim pela maior secreção de prótons para compensar as cargas líquidas negativas. A solubilização de fosfato por AOA é causada por ação das cargas negativas ou em decorrência das propriedades de complexação. Por se tratar de ânions, estes, podem mobilizar o fosfato da superfície de óxidos metálicos por meio da troca de ligantes ou melhorando a dissolução de óxidos de Fe ou Al e fosfatos de Ca, resultando no enfraquecimento das ligações minerais devido à adsorção prévia do ânion orgânico e/ou quelação (JONES; OBURGER, 2011). Existem evidências do efeito sinérgico da produção de exopolissacarídeos com ácidos orgânicos na dissolução de fosfato tricálcico por micro-organismos solubilizadores de fosfato (YI; HUANG; GE, 2008).

Alguns gêneros de bactérias promotoras de crescimento vegetal tais como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Gluconoacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* são também capazes de solubilizar P (RODRIGUEZ et al., 2004; KUNDU; GAUR, 1980; SARAVANAN et al., 2008; HALDER; CHAKRABARTTY, 1993; SURANGE; KUMAR, 1993).

2.6.2 Mineralização de P

A utilização do Po presente no solo pelas plantas requer a mineralização (hidrólise) de substratos orgânicos por enzimas fosfatases, que podem ser provenientes das próprias plantas ou dos micro-organismos presentes na rizosfera. O aumento da produção de fosfatases na rizosfera em condições de deficiência em P é observado em diversas espécies de plantas e principalmente em solos deficientes em P disponível (RICHARDSON et al., 2011).

Entre as diferentes enzimas fosfatases que são produzidas pelos micro-organismos mineralizadores de P, as fosfomonoesterases e fosfodiesterases (genericamente recebem a denominação de fosfatases), são as mais abundantes e mais bem estudadas. Dependendo de seu pH ótimo, são divididas em fosfatases ácidas e alcalinas. As fosfatases catalisam a hidrólise dos ésteres e anidridos de H_3PO_4 (TABATABAI; BREMNER, 1969). Dependendo das condições extracelulares podem ser produzidas pelos micro-organismos mobilizadores de P (FERNÁNDEZ et al., 2012). Embora as raízes das plantas possam produzir fosfatases ácidas, raramente produzem grandes quantidades de fosfatases alcalinas, sugerindo que este é um nicho potencial para a inoculação de micro-organismos mobilizadores de P (CRIQUET et al., 2004).

A inoculação de micro-organismos mobilizadores de P pode alterar as propriedades da rizosfera. Ramesh et al. (2014) demonstrou que o aumento da atividade das fosfatases ácidas e alcalinas, ao inocular *Bacillus aryabhattai*, sugere que BMP são importantes no ciclo do Po presente no solo. No entanto é difícil determinar se as fosfatases foram liberadas pela raiz ou pela BMP. Outro desafio é determinar se o aumento no fósforo no solo foi devido à ação enzimática (bioquímica) ou a mineralização biológica (“turnover” dos micro-organismos inoculados). Alguns estudos sugerem que as fosfatases de origem microbiana possuem uma maior afinidade por compostos fosfatados do que as produzidas pelas raízes da planta (TARAFDAR; YADAV; MEENA, 2001). Atualmente ainda é pouco conhecida a relação entre os micro-organismos mobilizadores de P inoculados no solo, atividade fosfatase e mineralização posterior do Po presente na biomassa.

2.6.3 Inoculação de bactérias para aumentar a disponibilidade de P

Devido a grande diversidade de micro-organismos presentes na rizosfera com potencial para promover o crescimento vegetal, o uso de inoculantes microbianos para diminuir ou aprimorar o uso de fertilizantes minerais surge como uma alternativa biotecnológica, e no caso do P busca-se aumentar a disponibilidade deste nutriente para as culturas (ADESEMOYE; KLOPPER, 2009). A inoculação de BMP em diversas culturas mostrou o aumento na disponibilidade e assimilação de nutrientes (em alguns casos do P), promovendo aumento da produtividade, por meio da diminuição do uso de fertilizantes minerais (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Efeito da inoculação de micro-organismos mobilizadores de P sobre o desenvolvimento de culturas em experimentos em casa de vegetação (CV) e campo (CA)

Micro-organismo solubilizador de P	Cultura	Resultado da inoculação	Referência
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Canola-CV	Aumento de 30-54 % no número de vagens, Aumento de 35% na produção	de Freitas; Banerjee; Germida (1997)
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	Arroz irrigado-CA	Aumento de 13-22% na produção de grãos	Trân Van et al. (2000)
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	Cevada e grão de bico-CV	Aumento do conteúdo de P de 100 e 125%, Aumento de nutrientes na parte aérea	Peix et al. (2001)
<i>Penicillium</i> sp.	Trigo, Lentilha-CA	Incrementos na parte aérea e biomassa em 7 de 9 experimentos	Wakelin et al. (2007)
Biagro: <i>Pseudomonas fluorescen</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Candida tropicalis</i>	Arroz irrigado-CA	Aumento da produção de colmos de 3-5%, Aumento da produção de grãos de 1,72-3,58 t ha ⁻¹	Cong et al. (2011)
<i>Bacillus</i> sp.	Arroz sequeiro-CV	Aumento da biomassa em 54-85%, Aumento do P nas folhas	Panhwar et al. (2011)
<i>Burkholderia vietaminensis</i> <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Arroz irrigado-CV	Aumento de 33-47 % na produtividade, aumento na eficiência do uso do fertilizante nitrogenado	Estrada et al. (2013)
<i>Azotobacter chroococcum</i> <i>Klebsiella variicola</i>	Milho-CV	Aumento de 29-39% na biomassa da raiz e parte aérea, Aumento na concentração de P nas folhas	López et al. (2013)
<i>Pseudomonas putida</i>	Tomate-CV	Aumento de 67% na massa fresca da parte aérea e de 58% na massa fresca da raiz.	Pastor et al. (2014)

Apesar dos resultados promissores na literatura usando BMP (tabela1), o uso de inoculantes biológicos de BMP para melhorar a fertilização fosfatada ainda é restrito a alguns países como USA, Canadá e Índia. Nestes países, os produtos comerciais utilizam principalmente isolados de *Penicillium* spp. Este fungo apresenta um elevado potencial para o desenvolvimento de inoculantes pela capacidade de solubilizar P em diversas condições de laboratório, facilidade de produção, e por colonizar de forma não específica, a rizosfera de diferentes plantas). Os resultados positivos utilizando *Penicillium* spp. em diversos solos ainda precisa ser confirmado afim de assegurar que o efeito observado é consequência direta da mobilização de P do solo e não decorrente de efeitos indiretos, como por exemplo a produção de fito-hormônios (KARAMANOS; FLORE; HARAPIAK, 2010).

2.7 Hipótese

As hipóteses do presente trabalho foram:

- As comunidades bacterianas são afetadas pelo tempo de compostagem, a adição de rocha fosfática e a adição de bactérias mobilizadoras de P.
- A inoculação de bactérias mobilizadoras de P aumenta a disponibilidade de fósforo no final da compostagem de resíduos da agro-indústria sucroenergética
- A inoculação de bactérias mobilizadoras de P melhora o desenvolvimento e a nutrição fosfatada em plantas de cana-de-açúcar.
- A fonte de fósforo modula as comunidades bacterianas na cultura da cana-de-açúcar.

2.8 Objetivo geral

Determinar as mudanças nas populações bacterianas durante a compostagem e o efeito da inoculação de BMP em plantas de cana-de-açúcar.

2.9 Objetivos específicos

- Avaliar as sucessões de comunidades bacterianas durante a compostagem de resíduos da agro-indústria sucroenergética.
- Avaliar o efeito da inoculação de BMP na compostagem de resíduos da agro-indústria sucroenergética.
- Avaliar comunidades bacterianas no solo de cana-de-açúcar quando são utilizadas diferentes fontes de P.
- Avaliar o efeito da inoculação de BMP em plantas de cana-de-açúcar sobre o desenvolvimento da cana-de-açúcar e as comunidades bacterianas do solo.

Referências

ADESEMOYE, A.O; KLOPPER, J.W. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 85, p. 1–12, 2009.

ALFREIDER, A.; PETERS, S.; TEBBE, C.C.; RANGGER, A.; INSAM, H. Microbial community dynamics during composting of organic matter as determined by 16S ribosomal DNA analysis. **Compost Science and Utilization**, Philadelphia, v.10, p. 303-312, 2002.

ANHWAR, Q.A.; RADZIAH, O.; ZAHARAH RAHMAN, A.; SARIAH, M.; MOHD RAZI, I.; NAHER, U.A. Contribution of phosphate-solubilizing bacteria in phosphorus bioavailability and growth enhancement of aerobic rice. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v. 9, n.3, p. 810-820, 2011.

ARAI, Y.; SPARKS, D.L. Phosphate reaction dynamics in soils and soil minerals: a multiscale approach. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 94, p. 135-179, 2007.

BAPTISTUSSI, R.C. **Efeitos de inseticidas biológicos (óleo de nim, *Azadirachta indica*, e entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*) sobre a cigarrinha-das-raízes, *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae), em cana-de-açúcar sob cultivo orgânico, em relação à mortalidade natural**. 2010. 67p. Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural) - Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2010.

BEFFA, T.; BLANC, M.; LYON, P.F.; VOGT, G.; MARCHIANI, M.; FISCHER, J.L.; ARAGNO, M. Isolation of *Thermus* strains from hot composts (60 to 80 degrees C). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.1723-1727, 1996.

BETTIOL, W.; CAMARGO, O.A. **Impacto ambiental do uso do lodo de esgoto**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. 312p.

BIELESKI, R.L. Phosphate pools, phosphate transport and phosphate availability. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 24, p. 225-252, 1973.

BLANC, M.; MARILLEY, L.; BEFFA, T.; ARAGNO, M. Rapid identification of heterotrophic, thermophilic, spore-forming bacteria isolated from hot composts. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v.47, p. 1246-1248, 1997.

BRADY, N.; WEIL, R. **Elements of the nature and properties of soils**. 2nd ed. London: Editorial Prentice Hall, 2004. 606p.

BROWNE, C.A. The spontaneous heating and ignition of hay and other agricultural products. **Science**, Moulton, v. 77, p. 223-229, 1933.

CASARIN, V.; PLASSARD, C.; SOUCHE, G.; ARVIEU, J.C. Quantification of oxalate ions and protons released by ectomycorrhizal fungi in rhizosphere soil. **Agronomie**, Paris, v. 23, p. 461-469, 2003.

CHANDNA, P.; MALLIK, S.; KUHAD, R.C. Assessment of bacterial diversity in agricultural by-product compost by sequencing of cultivated isolates and amplified rDNA restriction analysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 97, p. 6991-7003, 2013.

CHEFETZ, B.; HATCHER, P.G.; HADAR, Y.; CHEN, Y. Chemical and biological characterization of organic matter during composting of municipal solid waste. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 25, p. 776-785, 1996.

COLETI, T.; LORENZETTI, J.M.; FREITAS, P.G.; CARBINI, J.L. Uso de compostagem em comparação com torta de filtro na adubação de cana-planta e seus efeitos na soca, em solos de alta e baixa fertilidade natural. **Stab**, Piracicaba, v. 4, n.3, p. 33-39, 1986.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana de-açúcar**. Brasília, 2015. p. 1-14.

CONDON, L.M.; TURNER, B.L.; CADE-MENUN, B.J. Chemistry and dynamics of soil organic phosphorus. In: SIMS, J.T.; SHARPLEY, A.N (Ed.). **Phosphorus: Agriculture and the Environment**. Madison, WI: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 2005. p. 87–121.

CONG, P.T.; DUNG, T.D.; HIEN, N.T.; CHOUDHURY, A.T.M.A.; ROSE, M.T.; KECSKÉS, M.L.; DEAKER, R.; KENNEDY, I.R. Effects of a multistrain biofertilizer and phosphorus rates on nutrition and grain yield of paddy rice on a sandy soil in southern Vietnam. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.34, p.1058–1069, 2011.

CRICQUET, S.; FERRE, E.; FARNER, E.M.; LE PETIT, J. Annual dynamics of phosphatase activities in an evergreen oak litter – influence of biotic and abiotic factors. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 1111–1118, 2004.

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

DEUBEL, A.; MERBACH, W. Influence of microorganisms on phosphorus bioavailability in soils. In: BUSCOT, F. VARMA, A. (Ed.). **Microorganisms in soils: roles in genesis and functions**. Berlin :Springer, 2005. , p. 177–191.

DOS SANTOS, D.H. **Adubação fosfatada no plantio da cana-de-açúcar a partir de torta de filtro enriquecida com fosfato solúvel**. 2009. 35p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2009.

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

EUROPEAN FERTILIZER MANUFACTURER ASSOCIATION (EFMA). Phosphorus Essential Element for Food Production. Disponível em: [http://www.efma.org/documents/file/publications/Understanding%20Phosphorus%20and%20its%20Use%20in%20Agriculture%20\(2002\).pdf](http://www.efma.org/documents/file/publications/Understanding%20Phosphorus%20and%20its%20Use%20in%20Agriculture%20(2002).pdf). Acesso em :15 jan. 2014.

FINSTEIN, M.S.; MORRIS, M.L. Microbiology of municipal solid waste composting. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 19, p. 113-151, 1975.

FERNÁNDEZ, L.; AGARAS, B.; ZALBA, P.; WALL, L.G.; VALVERDE, C. *Pseudomonas* spp. isolates with high phosphate-mobilizing potential and root colonization properties from agricultural bulk soils under no-till management. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 48, p. 763-773, 2012.

GYANESHWAR, P.; NARESH KUMAR, G.; PAREKH, L.J.; POOLE, P.S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 245, p. 83–93, 2002.

GYANESHWAR, P.; PAREKH, L.J.; ARCHANA, G.; POOLE, P.S.; COLLINS, M.D.; HUSTON, R.A.; NARESH KUMAR, G. Involvement of a phosphate starvation inducible glucose dehydrogenase in soil phosphate solubilization by *Enterobacter asburiae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 171, p. 223–229, 1999.

HALDER, A.; CHAKRABARTTY, P. Solubilization of inorganic phosphates by *Rhizobium*. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 38, p. 325–330, 1993.

HARRISON, A.F. **Soil Organic Phosphorus: A Review of World Literature**. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, 1987. 257p.

HARVEY, P.R.; WARREN, R.A.; WAKELIN, S. Potential to improve root access to phosphorus: the role of non-symbiotic microbial inoculants in the rhizosphere. **Crop Pasture Science**, Victoria, v. 60, p. 144–151, 2009.

IGUAL, J.M.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C. Fertilizers, food and environment. In: VELAZQUEZ, E.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C. (Ed.). In: INTERNATIONAL MEETING ON MICROBIAL PHOSPHATE SOLUBILIZATION. **Developments in Plant and Soil Science**, Dordrecht, v. 102, p. 199–202, 2007.

INSAM, H.; DE BERTOLDI, M. Microbiology of composting process. In: DIAZ, L.F. DE BERTOLDI, M.; BIDLINGMAIER, W.; STENTIFORD, E. (Ed.). **Waste Management Series 8: Compost Science and Technology**, Amsterdam, p. 25–48, 2007.

JEONG, Y.S.; NA, H.B.; KIM, S.K.; KIM, Y.H.; KWON, E.J.; KIM, J.; YUN, H.D.; LEE, J.K.; KIM, H. Characterization of Xyn10J, a Novel Family 10 Xylanase from a Compost Metagenomic Library. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 166, p. 1328–1339, 2012.

JONES, R.D. Phosphorus cycle. In: LEDERBERG, J (Ed). **Encyclopedia of Microbiology**. 2nd ed. San Diego:Academic, 2000. v.3, p. 614–617,

KANG, C.H.; OH, K.H.; LEE, M.H.; OH, T.K.; KIM, B.H.; YOON, J.H. A novel family VII esterase with industrial potential from compost metagenomic library. **Microbial Cell Factories**, London, v.10, n.41, 2011.

KARAMANOS, R.E.; FLORE, N.A.; HARAPIAK, J.T. Re-visiting use of *Penicillium bilaii* with phosphorus fertilization of hard red spring wheat. **Canadian Journal Plant Science**, Ottawa, v. 90, p. 265–277, 2010.

KIEHL E.J. **Manual de compostagem – maturação e qualidade do composto**. Piracicaba: Editora Degaspari, 1998. 146p.

KOWALCHUK, G.A.; NAOUMENKO, Z.S.; DERIKX, P.J.; FELSKA, A.; STEPHEN, J.R.; ARKHIPCHENCKO, I.A. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class Proteobacteria in compost and composted material. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 396–403, 1999.

KUNDU, B.; GAUR, A. Establishment of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria in rhizosphere and their effect on yield and nutrient uptake of wheat crop. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 57, p. 223–230, 1980.

LÓPEZ-ORTEGA, M.P.; CRIOLLO-CAMPOS, P.J.; GÓMEZ-VARGAS, R.M.; CAMELO-RUSINQUE, M.; ESTRADA-BONILLA, G.; GARRIDO-RUBIANO, M.F.; BONILLA-BUITRAGO, R. Characterization of diazotrophic phosphate solubilizing bacteria as growth promoters of maize plants. **Revista Colombiana de Biotecnología**, Bogotá, v. 15, n.2, p.115-123, 2013.

MARTINS, L.F.; ANTUNES, L.P.; PASCON, R.C.; DE OLIVEIRA, J.C.F.; DIGIAMPIETRI, L.A.; BARBOSA, D.; PEIXOTO, B.M.; VALLIM, M.A.; VIANA-NIERO, C.; OSTROSKI, E.H.; TELLES, G.P.; DIAS, Z.; DA CRUZ, J.B.; JULIANO, L.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DA SILVA, A.M.; SETUBAL, J.C. Metagenomic analysis of a tropical composting operation at the São Paulo Zoo Park reveals diversity of biomass degradation functions and organisms. **PLoS One**, San Fransisco, v. 8, e61928, 2013.

NELSON, D.W.; SOMMERS, L.E. Total carbon, organic carbon, and organic matter. In: SPARKS, D.L.; (Ed). **Methods of soil analysis, Part 3. Chemical methods**. Madison:SSSA-ASA, 1996. 1264. P.(SSSA Book Series, 5.).

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

OBURGER, E.; JONES, D.L.; WENZEL, W.W. Phosphorus saturation and pH differentially regulate the efficiency of organic acid anion-mediated P solubilization mechanisms in soil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 341, n.1/2, p. 363-382, 2011.

PATEL, D.K.; ARCHANA, G.; NARESH KUMAR, G. Variation in the nature of organic acid secretion and mineral phosphate solubilization by *Citrobacter* sp. DHRSS in the presence of different sugars. **Current Microbiology**, New York, v. 65, p. 168–174, 2008.

PARFITT, R.L. Phosphate reactions with natural allophone, ferrihydrite and goethite. **Journal of Soil Science**, Oxford, v.40, p.359–369, 1989.

PARK, K.H.; LEE, C.Y.; SON, H.J. Mechanism of insoluble phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities. **Letter Applied Microbiology**, Baltimore, v.49, p.222-228, 2009.

PASTOR, N.; ROSAS, S.; LUNA, V.; ROVERA, M. Inoculation with *Pseudomonas putida* PCI2, a phosphate solubilizing rhizobacterium, stimulates the growth of tomato plants. **Symbiosis**, New York, v.62, p.157–167, 2014.

PEIX, A.; RIVAS-BOYERO, A.A.; MATEOS, P.F.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C.; MARTINEZ-MOLINA, E.; VELAZQUEZ, E. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.33, p. 103-110, 2001.

PETERS, S.; KOSCHINSKY, S.; SCHWIEGER, F.; TEBBE, C.C. Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 930-936, 2000.

- RAMESH, A.; SHARMA, S.K.; YADAV, N.; JOSHI, O.P. Phosphorus mobilization from native soil P-pool upon inoculation with phytate-mineralizing and phosphate-solubilizing *Bacillus aryabhattai* isolates for improved P-acquisition and growth of soybean and wheat crops in microcosm conditions. **Agricultural Research**, Washington, v. 3, n.2, p. 118–127, 2014.
- RICHARDSON, A.E.; SIMPSON, R.J. Soil microorganisms mediating phosphorus availability. **Plant Physiology**, Berlin, v. 156, p. 989–996, 2011.
- RICHARDSON, A.E.; LYNCH, J.P.; RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; SMITH, F.A.; SMITH, S.E.; HARVEY, P.R.; RYAN, M.H.; VENEKLAAS, E.J.; LAMBERS, H.. Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 349, p. 121–156, 2011.
- RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, New York, v. 17, p. 319–339, 1999.
- RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology advances**, Oxford, v.17, p.319–339, 1999.
- RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 91, n.11, p. 552–555, 2004.
- SA, T.M.; ISRAEL, D.W. Energy status and functioning of phosphorus-deficient soybean nodules. **Plant Physiology**, Berlin, v.116, p. 447–453, 1991.
- SÁNCHEZ-MONEDERO, M.A.; CEGARRA, J.; GARCÍA, D.; ROIG, A. Chemical and structural evolution of humic acids during organic waste composting. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 13, p. 361–371, 2002.
- SANTOS, J.Z.L. FURTINI NETO, A.E.; RESENDE, A.V.; CURI, N.; CARNEIRO, L.F.; COSTA, S.E.V.G.A. Frações de fósforo em solo adubado com fosfatos em diferentes modos de aplicação e cultivado com milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 32, p. 705–714, 2008.
- SANTOS, H.; TIRITAN, C.; SIMONETI, J.; BOULHOSA, L. Produtividade de cana-de-açúcar sob adubação com torta de filtro enriquecida com fosfato solúvel. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 40 , n.4, p. 454–461, 2010.
- SARAVANAN, V.; MADHAIYAN, M.; OSBORNE, J.; THANGARAJU, M.; AS, T. Ecological Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and Nitrogen-fixing Acetobacteraceae Members: Their Possible Role in Plant Growth Promotion. **Microbial Ecology**, New York, v. 55, p. 130–140, 2008.
- SHARAN, A.; SHIKHA; DARMWAL, N.S. Efficient phosphorus solubilization by mutant strain of *Xanthomonas campestris* using different carbon, nitrogen and phosphorus sources. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, p. 3087–3090, 2008.
- SHARMA, S.B.; SAYYED, R.Z.; TRIVEDI, M.H.; GOBI, T.A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **Springer Plus**, Heidelberg, v.2, p.587, 2013.

SHEN, J.B.; YUAN, L.X.; ZHANG, J.L.; LI, H.G.; BAI, Z.H.; CHEN, X.P.; ZHANG, W.F.; ZHANG, F.S. Phosphorus Dynamics: From Soil to Plant. **Plant Physiology**, Berlin, v.156, p. 997-1005, 2011.

SURANGE, S.; KUMAR, N. Phosphate solubilization under varying pH by *Rhizobium* from tree legumes. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 31, p. 855-857, 1993.

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

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**, Weinheinv, v. 164, p. 79–282, 2001.

TIAN, W.; SUN, Q.; XU, D.; ZHANG, Z.; CHEN, D.; LI, C.; SHEN, B. Succession of bacterial communities during composting process as detected by 16S rRNA clone libraries analysis. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, v.78, p. 58-66, 2013

TORSVIK, V.L. Isolation of bacterial DNA from soil. **Soil biology and biochemistry**, Oxford, v. 12, p. 15-21, 1980.

TRÂN VAN, V.; BERGE, O.; NGÔ KÊ, S.; BALANDREAU, J.; HEULIN, T. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 218, p. 273–284, 2000.

VANCE, C.P. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. **Plant Physiology**, Berlin, v. 127, p. 390-397, 2001.

WAKSMAN A. **Principles of soil microbiology**. Baltimore:The Williams & Wilkins 1932. 974p.

WAKELIN, S.A.; GUPTA, V.V.; HARVEY, P.R.; RYDER, M.H. The effect of *Penicillium* fungi on plant growth and phosphorus mobilization in neutral to alkaline soils from southern Australia. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa v. 53, n.1, p. 106-115, 2007.

WESTERMAN, P.W.; BICUDO, J.R. Management considerations for organic waste use in agriculture. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 96, p. 215-221, 2005.

WHITELAW, M.A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. **Advances in Agronomy**, New York, v. 69, p. 99–151, 2000.

YI, Y.M.; HUANG, W.Y.; GE, Y. Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, p.1059–1065, 2008.

ZUCCONI, F.; DE BERTOLDI, M. Compost specifications for the production and characterization of compost from municipal solid waste. In: DE BERTOLDI, M. (Ed). **Compost - Production, Quality and Use**. London, 1986. p. 30-60.

3 SUCESSÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA DURANTE A COMPOSTAGEM DE RESÍDUOS DA INDÚSTRIA SUCROENERGÉTICA E EFEITO DA ADIÇÃO DE BACTÉRIAS MOBILIZADORAS DE FÓSFORO

Resumo

A torta de filtro, cinzas de caldeira e fuligem são alguns dos resíduos produzidos na indústria sucroenergética. Dar um destino adequado a estes resíduos constitui um desafio para as indústrias. Algumas usinas utilizam a compostagem como uma ferramenta para aumentar o valor agregado dos resíduos e tem mostrado efeitos positivos quando o composto é aplicado na lavoura. O objetivo do trabalho foi aprimorar a compostagem de resíduos da indústria sucroenergética, desvendando as comunidades bacterianas presentes durante o processo e enriquecer o composto em P adicionando rocha fosfática de Araxá e bactérias mobilizadoras de P. Para isto foram instaladas pilhas de compostagem compostas por torta de filtro, cinzas de caldeira e esterco de galinha. Foi testado o efeito da inoculação das estirpes *Pseudomonas aeruginosa* PSBR 12 e *Bacillus* sp. BACBR01 previamente caracterizadas como mobilizadoras de P e da adição de rocha fosfática de Araxá na disponibilidade de P no composto final e sobre a estrutura das comunidades bacterianas. Para isto foi quantificada a fração do P ligado ao cálcio nas pilhas. As mudanças nas comunidades bacterianas durante a compostagem foram descritas por meio das técnicas *T-RFLP* e sequenciamento utilizando sistema MiSeq™ (Illumina), também foram estabelecidos os principais parâmetros físico-químicos que modulam a estrutura da comunidade bacteriana. Nos tratamentos que receberam rocha fosfática, a inoculação das estirpes mobilizadoras de P diminuiu o P ligado ao Ca em aproximadamente 21%. A adição da rocha e a inoculação não influenciaram as comunidades bacterianas durante a compostagem. A mudança nas comunidades bacterianas durante a compostagem foi temporal, sendo que no início membros da ordem Lactobacillales foram dominantes e após 15 dias ocorreu uma sucessão das comunidades bacterianas, e as ordens Bacillales e Clostridiales passaram a dominar. Após 30 dias de compostagem a ordem Bacillales se estabeleceu na compostagem até o final do período de avaliação (60 dias). As mudanças na comunidade foram influenciadas principalmente pelo pH, temperatura e umidade. O presente trabalho mostrou que durante a compostagem ocorrem sucessões nas comunidades de bactérias associadas a mudanças físico-químicas no composto. A adição do inoculante solubilizou o P presente na rocha fosfática, se apresentando como uma alternativa biotecnológica potencial.

Palavras chaves: Bactérias mobilizadora de P; Compostagem; Disponibilidade de P; *T-RFLP*; Illumina; Comunidades bacterianas

Abstract

Filter cake, boiler ash and soot are some of the waste generated in the sugarcane industry. To provide a suitable destination for these wastes is a challenge for industries. Some mills use composting as a tool to increase the value of waste and has shown positive effects when the compost is applied in the fields. The objective of this study was to improve the composting waste from the sugarcane industry, revealing the bacterial communities present during the process and P enrichment of the compost adding Araxá rock phosphate and P mobilizing bacteria. Compost piles mounted with filter cake, boiler ash and chicken manure were installed. The effect of inoculation of the strains *Pseudomonas aeruginosa* PSBR 12 and *Bacillus* sp. BACBR01, previously characterized as P mobilizing, and the addition of Araxá

rock phosphate, was tested to determine their effect on P availability in the final compost and bacterial communities structure. The P fraction bound to calcium in the compost piles was quantified. Changes in bacterial communities during composting were described by the application of techniques such as T-RFLP and sequencing, using the MiSeq™ System (Illumina) platform. The main physical and chemical parameters, which modulate bacterial community structure were also established. In treatments with rock phosphate, inoculation of P mobilizing strains decreased the P linked to Ca by approximately 21%. Neither the addition of rock phosphate nor bacterial inoculation influenced bacterial communities during composting. Changes in bacterial communities during composting were temporal, in the beginning members of the Lactobacillales order were dominant and after 15 days a succession of bacterial communities occurred, and Bacillales and Clostridiales began to dominate. After 30 days of composting Bacillales established in the compost remained dominating until the end of the evaluation period (60 days). Community changes were influenced mainly by pH, temperature and humidity. This study shows the occurrence of bacterial community successions during composting, associated with physicochemical changes in the compost. With the addition of the inoculant P of the rock phosphate was solubilized, suggesting its application as a potential biotechnological alternative.

Keywords: P mobilizing bacteria; Composting; Availability of P; T-RFLP; Illumina; Bacterial communities

3.1 Introdução:

O Brasil é pioneiro na produção de açúcar e de álcool a partir da cana-de-açúcar. Dentre os produtos da indústria sucroenergética, são geradas grandes quantidades de resíduos, como vinhaça, torta de filtro, águas residuais, cinzas de caldeira, fuligem, entre outros. A torta de filtro é um resíduo composto da mistura de bagaço moído e lodo de decantação sendo proveniente do processo de tratamento e clarificação do caldo de cana-de-açúcar. São produzidos em média 30 kg de torta para cada tonelada moída de cana. No Brasil na safra 2013/14 o total de cana-de-açúcar moída foi de 653,52 milhões de toneladas (UNICA, 2014), para uma produção aproximada de 19,6 milhões de Mg de torta de filtro.

Caso não sejam descartados adequadamente, os resíduos orgânicos podem transformar-se em fonte de poluição ambiental e até causar problemas de saúde pública (KUMAR, 2011). A compostagem é um meio importante de manejo dos resíduos produzidos na indústria sucroenergética (KUMAR et al., 2010; MEUNCHANG; PANICHSAKPATANA; WEAVER, 2005). Durante o processo de compostagem, a comunidade microbiana deve adaptar-se a uma redução gradual de nutrientes, além de mudanças na temperatura, conteúdo de água, dióxido de carbono, oxigênio e amônia no composto (RYCKEBOER et al., 2003). Compreender a microbiologia da compostagem de resíduos da indústria sucroenergética é fundamental para

entender o processo em si, e para encontrar novos métodos que permitam aprimorar o processo e melhorar as características físico-químicas do produto final. Trabalhos prévios descrevem as comunidades microbianas durante a compostagem utilizando técnicas baseadas em meios de cultura e independentes de cultivo como *Fatty-Acid Methyl Esters* (FAMES), *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE), *Amplified Ribosomal rDNA Restriction Analysis* (ARDRA), Clonagem de Genes e Sequenciamento em Larga Escala (BHATIA et al., 2013; CHANDNA et al., 2013a; ELOUAQOUDI et al., 2015; DE GANNES; EUDOXIE; HICKEY, 2013; HE et al., 2013). Entretanto, poucos trabalhos descrevem as mudanças na comunidade microbiana em condições reais de campo, sendo necessários estudos adicionais, principalmente com o objetivo de modular esta comunidade, a fim de se obter melhorias na qualidade desta compostagem.

É conhecido que bactérias mobilizadoras de fosforo (BMP) são importantes na disponibilidade de fosfato no solo, solubilizando P de minerais fosfatados e mineralizando P de compostos orgânicos no solo em associação com diversas culturas (OWEN et al., 2014). Entretanto, existem poucos trabalhos que descrevem o uso de BMP para aumentar a disponibilidade de P durante a compostagem. Billah e Bano (2015) encontraram aumentos de até 40 % na quantidade de P disponível quando foi aplicada uma estirpe de *Pseudomonas* sp. A estirpe foi caracterizada como uma bactéria promotora do crescimento vegetal.

Apesar de a indústria sucroenergética utilizar o composto da torta de filtro e cinzas como adubo, não existem trabalhos prévios que descrevam as comunidades microbianas durante o processo e como aprimorar o composto aplicando rocha fosfática (apatita) e inoculantes biológicos baseados em BMP. No presente trabalho foram utilizadas as técnicas independentes de cultivo *T-RFLP* e sequenciamento na plataforma Illumina para vislumbrar como é modulada a estrutura das comunidades bacterianas durante a compostagem; e se a aplicação das estirpes *Pseudomonas aeruginosa* PSBR 12 e *Bacillus* spp. com rocha fosfática apresenta efeito sobre o P presente na rocha fosfática de Araxá (Apatita).

3.2 Material e métodos

3.2.1 Montagem e condução das leiras de compostagem

As pilhas de compostagem foram instaladas em um pátio com um declive de 10% a céu aberto na Usina São José da Estiva (Fazenda Três Pontes – Zona Rural Bairro Três Postes- Novo Horizonte- SP- 21°29'42"S - 49°11'23"W). As dimensões das leiras foram de 3,2 x 1,6 x

25 m (Base, altura e comprimento), a separação entre as leiras foi de 5 m. Para a preparação das pilhas foram utilizados resíduos da indústria sucroenergética: duas partes de torta de filtro (1400 kg m^{-1}) para uma de cinza de caldeira e dos retentores de fuligem (700 kg m^{-1}). Além disso, também foi adicionado esterco de galinha poedeira (380 kg m^{-1}) e em alguns tratamentos foram adicionados 2% de rocha fosfática de Araxá ($3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{CaF}_2$) (42 kg m^{-1}) (tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Análise química da rocha de Araxá usada no experimento

P₂O₅ total	P₂O₅ citríco	P₂O₅ H₂O	CaO	Fe₂O₃	SiO₂	Al₂O₃	MgO	BaSO₄	TiO₂	F	BaO
g kg ⁻¹											
271	46	2	357,5	171,3	12,7	3,3	7,3	33,7	44,4	16,9	11,8

O delineamento do experimento foi totalmente aleatorizado com 4 tratamentos e 3 repetições (tabela 3.2), para um total de 12 pilhas de compostagem. Nos tratamentos em que foi adicionado o inoculante, aplicou-se a dose de 8 L Mg^{-1} de composto com concentração de 10^8 células mL^{-1} de cada estirpe (a composição do inoculante é descrita no item 3.2.2). O inoculante foi adicionado no início do experimento e 30 d após a montagem das pilhas (DAMP). Na parte superior do pátio de compostagem foram instaladas pilhas sem inoculante com a finalidade de evitar a contaminação proveniente das pilhas inoculadas com a água das chuvas. O período da compostagem foi de 60 d realizando o revolvimento das pilhas a cada 7 d (iniciando o revolvimento nas pilhas não inoculadas) (figura 3.1).

Tabela 3.2 - Tratamentos utilizados no experimento

Nomenclatura	Tratamentos
Rocha	Rocha fosfática de Araxá sem inoculante
Padrão (Controle)	Sem inoculante
Rocha + Inoculante	Rocha fosfática de Araxá com inoculante
Padrão + inoculante	Com inoculante

Figura 3.1 - Instalação do experimento de compostagem na usina São José da Estiva

3.2.2 Estirpes e preparo do inoculante

Foram utilizadas as estirpes *Pseudomonas aeruginosa* PSBR12 e *Bacillus* sp. BACBR1. As estirpes foram isoladas do processo da compostagem (Tabela 3.3), foram selecionadas pela sua característica de solubilizar P *in vitro* em placas de meio sólido SMRS1 (SUNDARA-RAO; SINHA, 1963). As estirpes foram reativadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio LB, a 30° C sob agitação a 150 rpm por 24 horas. Em seguida foram semeadas em placas com meio King B para *Pseudomonas* spp. e LB para *Bacillus* spp. Após a verificação da pureza nas placas e da sua morfologia típica (PALLERONI, 2005; LOGAN; DE VOS, 2009), as estirpes foram multiplicadas em tubos contendo meio LB nas condições citadas previamente. As células foram lavadas com solução salina (0,85%) e a D.O. 600 foi ajustada para 0,9-1. Para a realização da inoculação, 5 mL foram colocados em frascos de Erlenmeyer de 1 L contendo 200 mL do meio LB, e mantidos a 30° C sob agitação de 200 rpm por 24 h. O inóculo foi adicionado a um fermentador Tecnoyon de 13 L carregado com 10 L do meio LB, mantido por 24 h a 300 rpm, a 30°C, com um fluxo de ar de 10 L min⁻¹. O número de células

viáveis foi determinado pelo método de microplaca em meio LB (SPENCER; RAGOUT, 2001). Ao final da fermentação foi obtida uma concentração de 10^9 células mL^{-1} de cada micro-organismo. Antes da aplicação foram misturados volumes iguais de cada micro-organismo, em seguida o inoculante foi diluído em 50 L de água e foi aplicado nas pilhas. Foram realizadas 2 aplicações do inoculante, no início da compostagem e 30 DAMP.

Tabela 3.3 - Estirpes potenciais solubilizadoras de fosfato inoculadas durante a compostagem

Identificação molecular	Origem	Isolamento	Local
<i>Pseudomonas</i> sp. PSBR12	Compostagem 40°C	Início da compostagem	Novo Horizonte, SP.
<i>Bacillus</i> sp. BACBR1	Compostagem 55 °C	30 dias de compostagem	Novo Horizonte, SP.

3.2.3 Coleta de amostras, quantificação da temperatura e umidade durante a compostagem

As amostras para posterior análise enzimática e molecular foram retiradas a cada 15 d, coletando amostras em 5 níveis nos 15 m centrais de cada pilha e a partir delas foi obtida uma amostra composta de cada repetição (Figura 3.2). As amostras foram coletadas logo após o revolvimento das pilhas com o compostador para obter amostras com maior uniformidade.

Figura 3.2 - Instalação das pilhas e os diferentes níveis (1, 2, 3, 4, 5), onde foram coletadas as amostras

A temperatura foi monitorada diariamente em 5 pontos nas pilhas. O monitoramento foi realizado usando o termômetro digital Minnipa-APPA modelo MT – 520, com um comprimento de 1,5 m.

Foi mantida a umidade mínima de 30% durante o período de compostagem, sendo monitorada semanalmente e regulada por meio do revolvimento e a adição de água. Para realizar o cálculo da humidade, 10 g das amostras foram levadas a 65 °C em estufa com ventilação forçada por 48 horas. Em seguida foram esfriadas em dessecador e foi calculada sua massa seca.

3.2.4 Solubilização, mineralização de fosfato das estirpes usadas no inoculante

3.2.4.1 Reativação das estirpes

As estirpes foram reativadas em meio de cultura LB líquido sob agitação de 200 rpm por 24 horas a 30°C, e riscadas em meios sólidos King B e LB, para os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, respectivamente. As placas foram incubadas à temperatura de 30°C para a verificação da formação da morfologia típica, característica das bactérias, segundo descrito por Palleroni (2005); Kennedy et al. (2005); Logan e de Vos (2009).

3.2.4.2 Determinação da capacidade de solubilizar P em meio de cultura líquido

As estirpes *Pseudomonas aeruginosa* PSBR12 e *Bacillus* spp. BACBR1 foram multiplicadas em tubos contendo meio de cultura SMRS1 por 24 h a 30° C sob agitação de 150 rpm; em seguida as células foram lavadas com solução salina e sua D.O.₆₀₀ foi ajustada a 0,9 – 1. A seguir 5 mL foram inoculadas em erlenmeyers de 250 mL contendo 45 mL do meio SMRS1 com 5 g L⁻¹ de rocha fosfática de Araxá como fonte de P. O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente aleatório com três repetições.

A quantificação do fosfato solúvel foi feita utilizando-se a técnica de azul de fosfomolibdênio de acordo com Estrada et al. (2013). As análises foram realizadas empregando o kit Spectroquant® Fósforo (PMB) (Merck) em culturas com 0, 1, 2, 4, 6, 8 e 15 d após a inoculação (AI). As alíquotas (1 mL) foram centrifugadas a 13000xg por 2 minutos. Em um tubo de vidro, foram adicionados 2,25 mL de água Milli-Q, 0,25 mL do sobrenadante, 75 µL do reagente 1 (íons molibdato em solução sulfúrica) e 50 mg do reagente 2 (ácido ascórbico). Depois de 5 min do início da reação foram feitas leituras da absorbância no espectrofotômetro em comprimento de onda de 712 nm. As leituras foram normatizadas por meio de uma curva padrão previamente obtida a partir de concentrações conhecidas de H₂PO₄. A determinação do pH no meio de cultura foi feita paralelamente para verificar a variação do mesmo. A contagem da população bacteriana foi feita pela técnica de contagem

em placa (SPENCER; RAGOUT, 2001). Foi retirado 0,5 mL de cada Erlenmeyer e diluído seriadamente em tubos com 4,5 mL de solução salina até a diluição 10^{-7} . Em seguida, 4 gotas (20 µl cada) dos 4 tubos mais diluídos foram aplicados em placas de Petri contendo o meio LB. As placas foram incubadas a 30°C por 24-48 h.

3.2.4.3 Produção de enzimas fosfatases alcalina e ácida

Para a determinação da atividade das fosfatases alcalina (FAlc) e ácida (FAc) foi seguida a metodologia descrita por Fernández et al. (2012). As amostras foram retiradas das culturas em fermentação utilizadas na determinação da solubilização de fosfato (4.2.2) às 24 h AI. Aliquotas de 0,1 mL foram adicionadas a 0,1 mL de 0,05 M *P*-nitrofenil fosfato, e 0,4 mL do buffer universal modificado (pH 6,5 para FAc e pH 11 para FAlc). Em seguida foram incubadas a 37 °C durante 1 h e logo se adicionou 0,1 mL de 0,5 M CaCl₂ e 0,4 mL de 0,5 M NaOH. O controle negativo foi o meio estéril. As amostras foram centrifugadas a 13000xg durante 2 min e foi quantificada a intensidade da cor amarela do *P*-nitrofenol fosfato (pNP) do sobrenadante a 405 nm (TABATABAI; BREMNER, 1969). A atividade de fosfatase dos isolados foi expressa como microgramas de pNP produzido por mililitro por hora. As leituras foram normalizadas por meio de uma curva padrão previamente obtida com concentrações conhecidas de pNP.

3.2.5 Caracterização molecular das estirpes

3.2.5.1 Extração do DNA

A extração do DNA total foi realizada com auxílio do kit para extração de DNA genômico WIZARD Genomic DNA purification kit (Promega Corporation, Madison, USA). O DNA extraído foi analisado segundo Sambrook e Russell (2001) e quantificado em gel de agarose 1%. Após a eletroforese, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta em fotodocumentador.

3.2.5.2 Amplificação do gene 16S DNAr

Para a amplificação do gene 16S RNAr foi utilizada a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se os *primers* 8FM (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) e 926R (CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT) descritos por Culman et al. (2008). Cada reação

de amplificação teve um volume final de 50 μL e foi composta de 50 ng de DNA genômico. Foram utilizados 3 mM de MgCl_2 ; 0,2 mM de dNTP (Invitrogen Corporation, USA); 0,02 U μL^{-1} de Taq polimerase (Invitrogen Corporation, USA); tampão para Taq polimerase 1X (Tris-HCl 1 mmol.L⁻¹, pH 9,0 e KCl 5 mmol.L⁻¹) (Invitrogen Corporation, USA); 0,20 pmol μL^{-1} de cada primer; 0,10 mg mL⁻¹ de BSA; 50 ng de DNA molde e água Mili-Q para completar o volume da reação. Os ciclos de amplificação foram constituídos de uma desnaturação inicial de 94 °C por 4 min seguidos de 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 seg, uma etapa de anelamento a 63 °C por 1 min e uma etapa de extensão a 72 °C por 1 min. Ao final foi efetuada uma última etapa de extensão a 72 °C por 1 min. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems).

3.2.5.3 Sequenciamento dos fragmentos e análise de similaridade

O sequenciamento do gene 16S RNAr das estirpes foi realizado pelo método de Sanger. Com o resultado foram realizados estudos de similaridade pelo programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com as sequências contíguas possuindo em média 1000 pares de base. O programa Mega6 (TAMURA et al., 2013), cuja comparação se dá pela pesquisa contra o banco de dados de nucleotídeos NCBI foi utilizado para fazer as comparações.

3.2.6 Avaliação da atividade das enzimas desidrogenase e fosfatases ácida e alcalina durante o processo de compostagem

3.2.6.1 Determinação da atividade enzimática da desidrogenase

Para a avaliação da atividade da desidrogenase (AD) foi seguida a metodologia descrita por Casida, Klein e Santoro (1964). 2,5 g do composto foram colocados em tubos de ensaio e foram adicionados 5 mL da solução de cloreto de trifênil tetrazólio 1,5 % como substrato, incubados em banho-maria a 37 °C por 24 h. Após este tempo foram adicionados 10 mL de metanol e foi centrifugado por 2 minutos a 13000xg. Foi realizada a leitura colorimétrica do sobrenadante em espectrofotômetro a 485 nm. Utilizando a curva-padrão previamente construída com trifênil formazana (TTF) foi calculada a AD e expressa em mg de TTF g⁻¹ hora⁻¹.

3.2.6.2 Determinação da atividade enzimática das fosfatases ácida e alcalina

A atividade das enzimas FAlc e FAc foram quantificadas segundo Tabatabai e Bremner (1969). 0,5 g de composto foi colocado em tubos de vidro de 50 mL, foram adicionados 4 mL do tampão MUB (pH 6,5 para FAc ou pH 11 para FAlc) e 1 mL da solução p-nitrofenilfosfato de sódio (0.05 M). Os frascos foram incubados a 37 °C por 30 min. Após a incubação foi adicionado 1 mL de CaCl₂ 0,5 M e 4 mL de NaOH 0,5 M, misturando vigorosamente. A suspensão foi filtrada em papel filtro Whatman n° 2 e se procedeu a realizar a leitura da absorbância a 420 nm em espectrofotômetro. O conteúdo de pNP foi calculado por uma curva padrão previamente realizada.

3.2.7 Análise das comunidades bacterianas durante a compostagem

3.2.7.1 Extração do DNA total

O DNA total foi extraído com o kit comercial *Power Soil DNA Extraction* (MoBio, EUA), seguindo as instruções do fabricante a partir de 0,4 g do composto. Após a extração, a integridade e a qualidade dos DNAs obtidos foram verificadas em eletroforese em gel de agarose 1% (w/v), seguido da visualização em luz ultravioleta.

3.2.7.2 Análise da estrutura bacteriana por meio da técnica *T-RFLP*

A técnica de *T-RFLP* foi utilizada devido à sua confiabilidade, já que gera padrões comparáveis mesmo em distintas corridas no sequenciador. Para isto, os DNAs das amostras foram submetidos à amplificação com *primers* específicos de regiões ribossomais 16S rRNA para grupos de bactérias (tabela 3.4).

Tabela 3.4 - *Primers*, genes alvo e enzimas usados na restrição para a metodologia de *T-RFLP*

Grupo Microbiano	<i>Primers</i> (5'-3')	Região Alvo	Enzimas	Referência
Bactéria	FAM*-8fm –AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 926r– CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT	16S DNAr	HhaI, MspI e HaeIII	CULMAN et. al., 2008

* indica a marcação do *primer* com o fluoróforo 6-FAM, a ser detectado na leitura a laser dos picos (*TRFs*).

As condições da reação de PCR foram as seguintes: 95°C por 4 min; 30 ciclos de 95 °C por 30 s; 57 °C por 30 s e 72 °C por 40 s; seguido de uma extensão final de 72 °C por 10 min. Foram utilizados 3 mM de MgCl₂; 0,2 mM dNTP (Invitrogen Corporation, USA); 0,02 U μL^{-1} de Taq polimerase (Fermentas, São Paulo, Brasil); tampão para Taq polimerase 1X (Tris-HCl 1 mmol.L⁻¹, pH 9,0 e KCl 5 mmol.L⁻¹) (Fermentas, São Paulo, Brasil); 0,20 pmol μL^{-1} de cada primer; 0,10 mg mL⁻¹ de BSA; 50 ng de DNA molde e água Mili-Q para completar o volume da reação. O volume final das reações foi de 50 μL . As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Após esta etapa, as amostras foram purificadas com isopropanol 75 % e o produto quantificado em géis de agarose 2 %. Para realizar as clivagens com as respectivas endonucleases foram utilizados aproximadamente 100 ng de produto com 5 U da enzima HhaI (Fermentas, São Paulo, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Para finalizar, estes produtos foram precipitados com acetato de sódio 3 M e EDTA 125 mM, ressuspensos em formamida HiDI com o marcador LIZ 600 (Applied Biosystems) e cada amostra foi lida duas vezes em sequenciador automático ABI Prism 3500As (Applied Biosystems). Foi adotada uma linha de corte de 50 unidades de fluorescência, para remover o “background” das amostras e os resultados transformados em matriz de abundância relativa.

3.2.7.3 Análise da diversidade filogenética bacteriana pelo sistema MiSeq™ (Illumina)

As amostras foram submetidas ao sequenciamento por meio da plataforma de nova geração MiSeq™ System (Illumina) realizado na empresa “Hellix bases for life”, Paulínia-SP. A técnica é baseada na identificação dos grupos bacterianos presentes nas amostras ambientais por meio do sequenciamento de regiões específicas do gene 16S RNAr.

Com o objetivo de sequenciar a região V4, os *primers* utilizados foram desenhados de forma a não amplificar as regiões vizinhas da sequência alvo, como descrito no *Ribosomal Data Project* (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp). Para tanto, o DNA extraído das amostras foi amplificado usando um mix de 4 *primers forward* e um mix de 4 *primers reverse* (Tabela 3.5). Os *primers* continham pré-adaptadores de acordo com a proposta da Illumina que visam amostrar o maior número de grupos bacterianos possível dentro da amostra a ser analisada.

Tabela 3.5 - *Primers* utilizados na reação de PCR para sequenciamento da região V4 ribossomal

<i>Primer</i>	<i>Sequências (5'→ 3')</i>
16SV4FPCR1_1 F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAA GAGACAGAYTGGGYDTAAAGNG
16SV4FPCR1_2 F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAA GAGACAGNAYTGGGYDTAAAGNG
16SV4FPCR1_3 F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAA GAGACAGNNAYTGGGYDTAAAGNG
16SV4FPCR1_4 F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAA GAGACAGNNNAYTGGGYDTAAAGNG
16SV4RPCR1_1 R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAA GAGACAGCCGTCAATTCMTTTRAGT
16SV4RPCR1_2 R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAA GAGACAGNCCGTCAATTCMTTTRAGT
16SV4RPCR1_3 R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAA GAGACAGNNCCGTCAATTCMTTTRAGT
16SV4RPCR1_4 R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAA GAGACAGNNNCCGTCAATTCMTTTRAGT

As condições da reação foram as seguintes: 94 °C por 4 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 s; 63 °C por 1 min e 72 °C por 1 min; seguido de uma extensão final de 72 °C por 10 min. Utilizaram-se 3,75 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTP (Invitrogen Corporation, USA); 0,05 U µL⁻¹ de Taq polimerase premium (Invitrogen Corporation, USA); tampão para Taq polimerase 1X (Tris-HCl 1 mmol.L⁻¹, pH 9,0 e KCl 5 mmol.L⁻¹) (Invitrogen Corporation, USA); 0,2 µM de cada *primer*; 1 µL de DNA (50 ng) e água Mili-Q para completar o volume da reação.

3.2.7.4 Procedimentos de bioinformática para avaliação dos dados do sequenciamento

Para análise das sequências obtidas, inicialmente foi necessário efetuar o comando *join_paired_ends.py* com base no programa QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*). Este comando permite que as leituras *forward* e *reverse* geradas no equipamento da Illumina se juntem, formando uma leitura única (*single read*). Em seguida foi realizada a seleção dos dados com base no valor de qualidade (*quality value*), fixado em 25 utilizando-se

o programa *CLC Genomics Workbench 6* (CLCbio). Em seguida, o restante das análises das sequências foi realizado utilizando-se o programa QIIME. Antes de realizar as análises as sequências quiméricas foram removidas.

Para as análises no QIIME foram empregadas linhas de comando específicas, conforme as análises desejadas. Deste modo, o agrupamento das unidades taxonômicas operacionais (UTOs) foi realizado para o nível de distância de 3%, ou seja, as UTOs foram estabelecidas a 97% de similaridade pela metodologia *uclust* empregando-se, para isso, o comando *pick_OTUs.py*. O comando *align_seqs.py* foi empregado para o alinhamento das sequências pelo método PYNAST. A classificação taxonômica foi realizada com base no comando *assing_taxonomy.py*, pelo RDP *classifier* (COLE et al., 2007), utilizando o banco de dados do *Greengenes* chamado *Caporoso Reference OTUs* (GREENGENES, 2012).

A tabela de UTOs foi obtida por meio do comando *make_otu_table.py*. Em seguida procedeu-se a retirada de sequências pertencentes a DNA mitocondrial e cloroplastidial por meio do comando *filter_taxa_from_OTU_table.py*. Os gráficos de classificação taxonômica foram obtidos por meio do comando *summarize_taxa_through_plots.py*. Os softwares descritos foram implementados na plataforma Linux (Ubuntu 12.0.4 LTS, 2012).

3.2.7.5 Análise estatística dos dados obtidos

Para aplicação da técnica de análise multivariada os dados foram primeiramente transformados usando o software PAST 3.03 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001). Os dados biológicos foram transformados utilizando o índice de distância de *Bray-Curtis* e as variáveis ambientais foram transformadas em *Box-cox*, para reduzir as diferenças entre as unidades. Com a finalidade de avaliar a estrutura da comunidade bacteriana e a influência de parâmetros físico-químicos foi realizada a análise de redundância (RDA) no software Canoco for Windows 4.51 (Copyright C 1997-2003 Biometrics).

Foi testada a normalidade e a homogeneidade dos resultados através dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett, respectivamente, utilizando o software Statistica 7.0®. A significância das análises de fosfatases, P ligado ao Ca, e concentração de P foliar, abundância e α -diversidade foi testada por meio da análise de variância de uma via (one-way ANOVA). Quando detectadas diferenças ($p \leq 0,05$), as médias dos tratamentos foram comparadas com seus respectivos controles pelo teste Tukey a 5 e 10 % de probabilidade, utilizando o pacote de software R® (versão 2.5.1.).

3.2.8 Quantificação das comunidades bacterianas durante a compostagem

Com o intuito de quantificar o número de cópias do gene 16S rRNA por grama de composto, o DNA obtido nas amostragens foi submetido à metodologia de qPCR (PCR quantitativo). As reações foram realizadas no equipamento “StepOne™ Real-Time PCR System”, utilizando o sistema SYBR Green I. Para a quantificação foram utilizados os *primers* Eub338 (5' - ACTCCTACGGGAGGCAGCAG - 3') e Eub518 (5' - ATTACCGCGGCTGCTGG - 3') (MUYZER, 1993).

As amplificações para bactérias foram realizadas com as seguintes condições: 95 °C por 3 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 s; 55°C por 30 s e 72°C por 30 s. As reações foram realizadas com volume final de 25 µl contendo 12,5 µl do kit SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®); utilizando 0,20 pmol µL⁻¹ de cada primer; 0,10 mg mL⁻¹ de BSA; 50 ng de DNA molde e água Mili-Q para completar o volume da reação.

Para a quantificação, curvas padrões foram obtidas, realizando amplificações com o número de cópias conhecidos do DNA molde adicionado nas reações. Desta maneira, os dados da amplificação do DNA extraído do composto foram interpolados na curva padrão para determinar o número de cópias do gene de interesse.

3.2.9 Análises químicas do material durante a compostagem

Os dados físico-químicos utilizados para realizar as análises de RDA foram realizadas paralelamente na tese de doutorado da aluna Cintia Masuco Lopes (LOPES, 2014).

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Capacidade de mobilizar fosfato das estirpes e caracterização molecular das estirpes usadas no inoculante

As estirpes *P. aeruginosa* PSBR12 e *Bacillus* sp BACBR01, isoladas do composto e que apresentaram capacidade de solubilizar PO₄³⁻ em placas de Petri contendo meio sólido SMRS1, foram avaliadas quanto à capacidade de solubilizar P em meio líquido SMRS1. Foi realizada a quantificação de PO₄³⁻ liberado e da população bacteriana, a atividade de fosfatase em meio líquido SMRS1 e o pH para as estirpes após 15 d AI.

Estas estirpes apresentaram diferentes capacidades para solubilizar apatita (rocha fosfática de Araxá) (Figura 3.3). A solubilização do PO₄³⁻ e a acidificação do meio líquido

SRSM1 mostraram correlação significativa. O coeficiente de Pearson entre o pH e a disponibilidade de PO_4^{3-} foi de: $r = -0,82$, $P < 0,05$ quando a estirpe *P. aeruginosa* PSBR12 foi inoculada no meio e de $0,77$, $P < 0,05$ quando foi inoculada a estirpe *Bacillus* sp BACBR01. As estirpes *P. aeruginosa* PSBR12 e *Bacillus* sp BACBR01 apresentaram seu pico máximo de solubilização 1 d ($78,5 \text{ g L}^{-1}$ de PO_4^{3-}) e 15 d AI ($138,4 \text{ g L}^{-1}$ de PO_4^{3-}), respectivamente.

A.

B.

Figura 3.3 - Solubilização de rocha fosfática de Araxá, associada com a alteração de pH e a população bacteriana durante 15 dias de crescimento. A. *Pseudomonas aeruginosa* PSBR12; B. *Bacillus* sp BACBR01. As barras indicam o erro padrão para três repetições

É provável que no estágio exponencial ocorra um intenso metabolismo aeróbico com o consumo de glicose e produção de ácidos orgânicos como o ácido glucônico, resultando assim em uma redução do pH e desta forma sugere-se que este é o principal mecanismo de solubilização de PO_4^{3-} das estirpes. Resultados similares foram relatados por Park, Lee e Son (2009) com a estirpe *P. fluorescens* RAF15. Os autores identificaram como principal mecanismo de solubilização de PO_4^{3-} a produção de ácido glucônico via oxidação direta da glicose pela GDH-PQQ e a produção de ácido tartárico. Com a estirpe *B. globisporus* Q12, Sheng et al. (2008) demonstraram que o principal mecanismo de solubilização do silicato foi a produção de ácidos orgânicos, principalmente o ácido glucônico.

Os ácidos orgânicos liberados pelas bactérias solubilizam PO_4^{3-} por dois mecanismos: 1) Dissolvendo diretamente o fosfato mineral, como resultado da troca aniônica do íon PO_4^{3-} pelo ânion ácido (GYANESHWAR et al., 2002); por seu comportamento como ânion orgânico, aumentando a mobilização de formas pouco solúveis de PO_4^{3-} (por exemplo o PO_4^{3-} ligado a Al e Fe), por meio de reações de quelação (WHITELAW, 2000).

A estirpe *P. aeruginosa* PSBR12 solubilizou maior quantidade de PO_4^{3-} durante seu crescimento exponencial, alcançando uma concentração celular aproximada de 10^9 UFC mL^{-1} , 24 h AI. A concentração celular se manteve estável até 15 d AI, porém a concentração de PO_4^{3-} diminuiu a $41,89 \text{ g L}^{-1}$ às 48 h AI, para logo aumentar até $63,15 \text{ g L}^{-1}$ de PO_4^{3-} 15 DAI. A diminuição na concentração de PO_4^{3-} às 48 h AI pode ser explicada pela imobilização do íon PO_4^{3-} na biomassa celular ou pode estar relacionada com a ligação do PO_4^{3-} a metais (Fe, Ca, Mn, Mg, K) presentes no meio de cultura, resultando assim em formas insolúveis (LIN et al., 2006). Estrada et al. (2013) observaram um incremento inicial na concentração de PO_4^{3-} no meio, acompanhado de um alto crescimento celular e posterior diminuição na concentração de PO_4^{3-} até o final de avaliação do experimento, ao inocular estirpes de *Burkholderia* spp em meio NBRIP.

A estirpe *Bacillus* sp. BACBR01 apresentou uma maior eficiência de solubilização de íon PO_4^{3-} após 15 d AI. Apresentou crescimento exponencial até uma concentração 10^8 UFC mL^{-1} , 24 h AI e se manteve constante com uma concentração de 10^6 UFC mL^{-1} . A liberação de PO_4^{3-} da rocha fosfática no meio foi paulatina, alcançando a maior concentração de PO_4^{3-} no meio de cultura aos 15 d AI. A liberação de PO_4^{3-} não se correlacionou com o crescimento da bactéria no meio de cultura.

As estirpes *P. aeruginosa* PSBR12 e *Bacillus* sp. BACBR01 produziram tanto FAc como FAlc (tabela 3.6). A estirpe *Bacillus* sp. BACBR01 apresentou maior atividade da enzima FAlc e 6 vezes maior atividade da enzima FAc que a estirpe *P. aeruginosa* PSBR12. A maior

atividade da FAc apresentada pela estirpe *Bacillus* sp. BACBR01 pode ser importante nas condições iniciais da compostagem onde o pH ótimo é inferior a 6 (NIEMI; VEPSÄLÄINEN, 2005). As FAc são produzidas tanto por micro-organismos como pelas plantas, por outro lado as FAlc são produzidas especificamente por micro-organismos (RAMESH et al., 2014).

Tabela 3.6 - Produção de fosfatases ácida e alcalina pelas bactérias utilizadas no inoculante aplicado na compostagem, após 24 h de crescimento das culturas em meio SMRS1. Média de três repetições

Estirpes	Fosfatase ácida	Fosfatase alcalina
	ug PNF mL ⁻¹ h ⁻¹	
PSBR12	65, 29±5,94	813,10±25,12
BACBR01	420,03±79,77	599,27±71,73

Assim, as estirpes aplicadas na compostagem possuem a capacidade de solubilizar apatita (rocha fosfática de Araxá) e produzem fosfatases extracelulares, o que sugere que elas têm um alto potencial para mobilizar P tanto de substratos orgânicos como inorgânicos (Figura 3.3, Tabela 3.6).

Baseado na análise de filogenia do 16S RNAr a estirpe PSBR12 possui uma alta similaridade com a estirpe *P. aeruginosa*. A estirpe BACBR01 formou um grupo separado com uma alta similaridade com *B. safensis* e *B. pumilus* (Figura 3.4). Estudos prévios com uma coleção de estirpes previamente identificadas de *B. safensis* e *B. pumilus* demonstram a dificuldade para diferenciar as duas espécies com base em características fenotípicas, bioquímicas e em sequências do gene 16S rRNA, sugerindo que estão altamente relacionadas (BRANQUINHO et al., 2014). Uma solução encontrada para diferenciar taxonomicamente as espécies estreitamente relacionadas como *B. safensis* e *B. pumilus* é o sequenciamento dos genes “housekeeping”, como *gyrB* (β-subunidade da girase do ADN) e *rpoB* (β-subunidade da RNA polimerase) (BRANQUINHO et al., 2014).

Figura 3.4 - Árvore filogenética baseada nas sequências parciais do gene 16S RNAr, incluindo as sequências das estirpes mobilizadoras de P utilizadas no inoculante. A árvore foi gerada pelo método *neighbour-joining*. Os números mostrados nas conexões indicam os valores de bootstrap (percentual de 1000 repetições). A barra de escala indica a taxa de substituição por base. Os números após a espécie indicam a sequência de acesso do banco de dados NCBI

3.3.2 Parâmetros químicos e bioquímicos durante a compostagem

As variáveis temperatura e umidade foram monitoradas durante a compostagem. Foi observado um aumento inicial da temperatura até 30 DAMP. Posteriormente a temperatura se manteve acima de 60 °C até o final do experimento (figura 3.5A), não se observou uma diminuição da temperatura até 60 DAMP. A temperatura é considerada um parâmetro útil para monitorar o processo de compostagem, já que está altamente correlacionada com a oxidação biológica durante a degradação da matéria orgânica (PAGANS et al., 2006). O teor de umidade inicial permaneceu em torno de 50-55 % em todos os tratamentos, diminuindo até 30 % 60 DAMP (figura 3.5B). Durante o experimento a umidade esteve dentro dos limites estabelecidos previamente.

Figura 3.5 - Mudança na temperatura (A) e na umidade (B), durante 60 dias de compostagem de resíduos da indústria sucroenergética. As barras indicam o erro padrão de três repetições

O pH inicial nos diferentes tratamentos esteve entre 4,95 e 5,69 correspondendo ao tratamento com torta de filtro + esterco + rocha (rocha) e ao tratamento com torta de filtro + esterco + rocha + inoculante (rocha+inoculante), respectivamente (figura 3.6A). O pH inicial

menor pode ser consequência da produção de ácidos orgânicos por bactérias principalmente, os quais são compostos intermediários da degradação de compostos carbonados (YANG et al., 2014). Com o decorrer do tempo o pH vai aumentando, já que os ácidos orgânicos são mineralizados e aumenta a liberação de amônia após a degradação dos compostos orgânicos, tais como proteínas e aminoácidos (CACERES; FLOTATS; MARFA, 2006). O pH no final da compostagem esteve em torno de 8,00 em todos os tratamentos avaliados, dentro do intervalo considerado como adequado (7,00-8,50) (CACERES; FLOTATS; MARFA, 2006).

A AD está relacionada com um grupo de enzimas que participam das reações metabólicas que produzem energia na forma de ATP por meio da oxidação da matéria orgânica (GU; WANG; KONG, 2009). A AD é usada como indicador da atividade dos microrganismos presentes no composto (BARRENA; VÁZQUEZ; SÁNCHEZ, 2008). Na compostagem foi observada uma maior AD no início do experimento, diminuindo até 45 DAMP (figura 3.6B). A maior atividade microbiana no início da compostagem é causada pela degradação de compostos de fácil degradação como açúcares, proteínas e ácidos nucleicos, abundantes nas matérias primas em condições de pouca pressão de O₂ e maior quantidade de água (Figura 3.5B).

A AD está relacionada com a temperatura das pilhas e em estudos prévios foi demonstrado que com a diminuição da AD, a temperatura também diminuía (BARRENA; VÁZQUEZ; SÁNCHEZ, 2008). Entretanto a alta temperatura até o final do processo pode ser explicada pela diminuição da umidade aumentando a difusão do O₂ na pilha, favorecendo o metabolismo aeróbio (WOLIŃSKA; STĘPNIEWSKA, 2012).

A.

B.

Figura 3.6 - Comportamento do pH (A) e atividade da enzima desidrogenase (B), durante 60 dias de compostagem de resíduos da indústria sucroenergética. As barras indicam o erro padrão de três repetições

A atividade das FAlc e ácida FAc foi alta comparada com a atividade relatada em estudos com compostagem (ALBRECHT et al 2010) (Figura 3.7). As FAlc tiveram valores mais

elevados do que as FAc, já que as fosfatases alcalinas são produzidas unicamente por micro-organismos (REJSEK et al., 2012). A produção tanto de FAc quanto de FAlc não teve relação com o pH presente na pilha de compostagem (dados não apresentados).

A Atividade das FAlc se manteve estável nos tratamentos com inoculante durante o experimento (figura 3.7A). No tratamento torta + esterco + inoculante (inoculante) a Atividade das FAlc foi maior comparado com o tratamento não inoculado (padrão). A Atividade das FAc se manteve estável durante o tempo de avaliação do experimento (Figura 3.7B). Os maiores valores da atividade das FAc foram observados no tratamento com torta + esterco + inoculante (inoculante). Provavelmente a maior atividade verificada neste tratamento seja devido à aplicação do inoculante, visto que as estirpes usadas têm a capacidade de produzir FAc (tabela 3.6).

A.

B.

Figura 3.7 - Atividade no tempo das fosfatases alcalina (A) e ácida (B), durante 60 dias de compostagem de resíduos da indústria sucroenergética. Média de 3 repetições. Letras iguais diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

3.3.3 Efeito da compostagem sobre o fósforo ligado ao cálcio

Observou-se o aumento na concentração do P ligado ao cálcio até os 60 DAMP nos tratamentos não inoculados e 30 DAMP nos tratamentos inoculados (Tabela 3.7), provavelmente devido à diminuição do carbono orgânico na forma de CO_2 e CH_4 , produto do metabolismo dos micro-organismos presentes na pilha de compostagem, aumentando sua concentração (GUO et al., 2012). Estudos anteriores sugerem que a compostagem com rocha fosfática é um meio eficiente de aumentar o P que estará disponível para as plantas (VASSILEV; VASSILEVA, 2003). O aumento do P ligado ao Ca pode ser produto do aumento do pH, favorecendo a formação de fosfatos de cálcio.

Tabela 3.7 - Teores de P ligado ao Ca durante a compostagem. O P foi determinado na fração extraída por HCl (60 DAP). Nos tratamentos inoculados foram adicionadas as estirpes *P. aeruginosa* PSBR12 e *Bacillus* sp. BACBR01. Médias seguidas por letras iguais (maiúsculas para tempo e minúsculas para inoculação) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 10% de probabilidade. Dados adaptados de Lopes, 2014

Descrição	Não Inoculado	Inoculado
	g Kg ⁻¹	
Tempo(dia)		
0	5,31 B a	5,44 A a
15	6,33 AB a	6,45 A a
30	7,52 AB a	6,75 A a
45	7,96 A a	6,43 A b
60	7,87 A a	6,21 A b
Composição		
Rocha	8,07 a	7,24 b
Padrão	5,93 a	5,28 a

Quando foram aplicadas as estirpes na compostagem, o P ligado ao Ca diminuiu significativamente em comparação a quando não foram adicionados, a partir de 45 DAMP. As estirpes adicionadas à compostagem apresentam a capacidade de solubilizar rocha fosfática de Araxá (Figura 3.3) o que provavelmente explica a diminuição do P ligado ao Ca. A solubilização do P não disponível presente na rocha foi maior quando o inoculante foi aplicado na compostagem. No final do período da compostagem o pH é maior (pH 8), condição que favorece a formação de fosfatos de cálcio pouco solúveis, entretanto a aplicação do inoculante diminuiu a formação destes complexos. Este resultado apresenta uma alternativa para melhorar a qualidade do composto final, disponibilizando P por meio do uso de estirpes bacterianas diminuindo 21% do P ligado ao Ca no composto final. Existem poucos trabalhos similares, entretanto Billah e Bano (2015) mostraram que a inoculação de *Pseudomonas* sp. juntamente com rocha fosfática aumentou em 40% o fósforo disponível extraído por meio da solução Mehlich-3.

3.3.4 Sucessões das comunides bacterianas durante a compostagem

Por causa da grande similaridade observada entre as repetições de cada tratamento por meio da *PCoA* (utilizando à análise de TRFLP) (ANEXO A), foi realizada uma amostra composta para seu sequenciamento usando a plataforma Illumina. Pela técnica de TRFLP não foram observadas mudanças na estrutura da comunidade bacteriana nos diferentes

tratamentos. A adição de apatita e/ou inoculante bacteriano não alteraram as comunidades bacterianas naturalmente presentes durante a compostagem.

Foi observado que a mudança nas comunidades bacterianas é principalmente temporal, tanto pela técnica de TRFLP como pela técnica de sequenciamento, usando a plataforma Illumina (Figura 3.8). No início da compostagem as comunidades bacterianas são distintas de sua composição nos dias de compostagem subsequentes. Observa-se uma sucessão das comunidades bacterianas durante a compostagem, no entanto existe similaridade entre os dias 45 e 60 DAMP (figura 3.8B), sugerindo que as comunidades bacterianas se estabelecem a partir de 45 DAMP.

Classicamente é descrita na literatura a presença de bactérias e fungos durante o processo de compostagem típico (GRAY; SHERMAN; BIDDLESTONE, 1971). Durante os 60 d de compostagem não foi possível observar a presença de fungos. No trabalho não foi possível amplificar a região ITS (internal transcribed sequences) por meio da PCR e q-PCR (dados não apresentados). Possivelmente, durante o tempo de compostagem, o número de fungos foi baixo ou inexistente, presumivelmente por causa da temperatura alta. Resultados similares foram observados por Martins et al. (2013), em compostagem de resíduos de zoológico, na qual os autores observaram que o número de sequências que codificam proteínas relacionadas a fungos foram inferiores a 0,02% das leituras.

Figura 3.8 - Análise de redundância (RDA) mostrando a relação entre a estrutura da comunidade bacteriana e parâmetros ambientais durante o período da compostagem. A. RDA realizada usando os perfis do TRFLP. B. RDA realizada usando as UTOs obtidas usando a plataforma Illumina. * Parâmetros significativos pelo teste de Monte Carlo a 5% de probabilidade

O alto número de cópias do gene 16S rRNA (aproximadamente 10^{10} UFC mg^{-1}) na compostagem durante 60 d indica que o papel das bactérias é fundamental neste processo (figura 3.9). Não se observaram diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo (teste Tukey com 5% de significância), indicando que a aplicação da Apatita e o inoculante bacteriano não exercem efeito sobre a abundância de bactérias na compostagem. Chandna et al, (2013b), utilizando a técnica de contagem em meio de cultura não observaram a mesma tendência, diminuindo o número de bactérias de 10^9 UFC g^{-1} no início da compostagem a 10^7 UFC g^{-1} na fase termofílica e de maturação. O número de cópias do gene 16S rRNA diminuiu significativamente 15 DAMP em todos os tratamentos. Neste dia inicia a mudança na estrutura da comunidade na compostagem, diminuindo o número de *Lactobacillales* e aumentando os *Bacillales* e *Clostridiales* (figura 3.10), entretanto não existe o domínio claro de um gênero. Provavelmente existe uma competição entre as bactérias pertencentes a estes gêneros e por este motivo observa-se uma diminuição temporal no número de bactérias.

A α -diversidade de bactérias não apresentou diferença significativa entre os tratamentos e durante o tempo de compostagem, o que provavelmente reflete o fato de que o número de espécies não muda durante a compostagem e entre os tratamentos e sim sua estrutura (ANEXO B). Partanen et al. (2010) encontraram maior diversidade no início da compostagem, trabalhando com biblioteca de clones.

Figura 3.9 - Abundância de bactérias durante a compostagem. Valores seguidos de letras iguais não diferem entre si, comparação dos tratamentos no tempo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias de três repetições

O filo dominante durante a compostagem foi Firmicutes, observando-se sucessão das comunidades bacterianas principalmente entre as ordens Lactobacillales, Bacillales e Clostridiales durante o tempo da compostagem.

No início da compostagem uma alta quantidade de compostos orgânicos degradáveis na matéria prima utilizada para construir as pilhas pode ter estimulado o crescimento bacteriano, principalmente de bactérias da ordem Lactobacillales, causando o auto-aquecimento durante a fase inicial de compostagem (figura 3.10). As bactérias da ordem Lactobacillales, em condições de baixa pressão de oxigênio, produzem ácidos orgânicos, principalmente ácido láctico como produto da fermentação dos açúcares, o qual pode explicar o pH baixo no início da compostagem (ISHII; FUKUI; TAKII, 2000). Bactérias da ordem Lactobacillales podem produzir peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e antibióticos, o que poderia explicar a baixa ocorrência de bactérias de outros gêneros no início da compostagem (AOSHIMA et al., 2001). Os resultados obtidos pela RDA confirmam que a presença da ordem Lactobacillales está relacionada significativamente ao pH baixo (figura 3.8).

No início da compostagem é interessante ressaltar a presença de bactérias da ordem Xanthomonadales, as quais englobam vários grupos de bactérias fitopatogênicas (CUTIÑO-JIMÉNEZ et al., 2010). Com o decorrer do tempo a ordem Xanthomonadales diminuiu, mostrando que a compostagem é eficiente na eliminação de grupos de bactérias potencialmente fitopatogênicas, provavelmente devido à alta temperatura gerada nas pilhas (ELORRIETA et al., 2003).

A partir de 15 DAMP se observa a diminuição do orden Lactobacillales e o aumento da ordem Clostridiales, provavelmente devido ao aumento do pH. O pH baixo é um fator limitante para o crescimento das bactérias do gênero *Clostridium*, pertencentes à ordem Clostridiales (LI et al., 2013). O aparecimento de anaeróbios obrigatórios, tais como *Clostridium*, sugere a presença de micro-nichos anaeróbicos dentro dos agregados do composto.

O aumento das ordens Clostridiales e Bacillales após 15 DAMP pode estar associado principalmente ao aumento do pH (figura 3.6). Gêneros pertencentes a estas ordens degradam os ácidos orgânicos, previamente produzidos pelas bactérias do ácido láctico (ordem Lactobacillales), causando um incremento do pH e inibindo as bactérias pertencentes à ordem Lactobacillales. Resultados similares foram encontrados por Partanen et al. (2010), em compostagem de lixo doméstico. O autor encontrou que a abundância das bactérias do ácido láctico *Acetobacter* e *Lactobacillus* esteve relacionado com o pH baixo. *Bacillus* é um gênero que pode produzir enzimas catabólicas como as proteases, que podem aumentar o pH no

processo de proteólise. Bactérias pertencentes às ordens Clostridiales e Bacillales possuem a capacidade de metabolizar substratos mais recalcitrantes como celulose e lignina, o que pode ser uma vantagem quando se esgotam as fontes de nutrientes de mais fácil degradação (WATANABE et al., 2009). Ishii, Fukui e Takii (2000) encontraram resultados similares utilizando a técnica de DGGE. Os autores descreveram que no início da compostagem, as bactérias fermentadoras produtoras de ácidos orgânicos dominaram a compostagem e que, com o aumento da temperatura, diminuição de carbono solúvel e aumento do pH, houve uma sucessão por bactérias do gênero *Bacillus*.

Figura 3.10 - Dinâmica da estrutura bacteriana (nível de ordem) durante a compostagem de resíduos da indústria sucroenergética

Após o dia 30 DAMP as bactérias pertencentes à ordem Bacillales dominaram o processo da compostagem, provavelmente devido a sua capacidade de suportar altas temperaturas e pH mais alto. *Bacillus* spp são bactérias formadoras de esporos que apresentam metabolismo ativo em temperaturas em torno de 50-60 °C. Apresentam capacidade de degradar substratos mais recalcitrantes (RYCKEBOER et al., 2003) mas, em pH inferior a 6,0, como o observado no início da compostagem, o seu crescimento é limitado.

A menor atividade microbiana indicada pela AD a partir do dia 30 AMP pode estar relacionada à dominância da ordem Bacillales. A diminuição da umidade pode induzir a formação de esporos no gênero *Bacillus*, diminuindo sua atividade metabólica e se mantendo latentes na pilha de compostagem.

3.4 Conclusões

A aplicação das estirpes potenciais mobilizadoras de P e a adição de rocha fosfática de Araxá na compostagem apresenta uma opção tecnológica para tornar mais disponível o P presente na rocha fosfática, diminuindo a ligação do P com o Ca no composto. Entretanto, a aplicação do inoculante e a adição de rocha fosfática não mudou a estrutura das comunidades bacterianas durante o tempo da compostagem. As comunidades bacterianas mudaram no tempo, alterando-se ao decorrer do tempo da compostagem. As principais ordens que modularam a comunidade bacteriana durante a compostagem foram Lactobacillales, Bacillales e Clostridiales e as mudanças foram influenciadas principalmente pelos parâmetros pH, temperatura e umidade.

Referências

- AOSHIMA, M.; PEDRO, M.S.; HARUTA, S.; DING, L.; FUKADA, T.; KIGAWA, A.; KODAMA, T.; ISHII, M.; IGARASHI, Y. Analyses of microbial community within a composter operated using household garbage with special reference to the addition of soybean oil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 91, n.5, p. 456-461, 2001.
- BARRENA, R.; VÁZQUEZ, F.; SÁNCHEZ, A. Dehydrogenase activity as a method for monitoring the composting process. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 99, n.4, p. 905–908, 2008.
- BHATIA, A.; MADAN, S.; SAHOO, J.; ALI, M.; PATHANIA, R.; KAZMI, A.A. Diversity of bacterial isolates during full scale rotary drum composting. **Waste Management**, Oxford, v. 33, p. 1595–1601, 2013.
- BILLAH, M.; BANO, A. Role of plant growth promoting rhizobacteria in modulating the efficiency of poultry litter composting with rock phosphate and its effect on growth and yield of wheat. **Waste Management & Research**, London, v. 33, p. 63-72, 2015.
- BRANQUINHO, R.; MEIRINHOS-SOARES, L.; CARRICO, J.A.; PINTADO, M.; PEIXE, L.V. Phylogenetic and clonality analysis of *Bacillus pumilus* isolates uncovered a highly heterogeneous population of different closely related species and clones. **FEMS Microbiology Ecology**, Hoboken, v. 90, n.3, p. 689–698, 2014.

CACERES, R.; FLOTATS, X.; MARFA, O. Changes in the chemical and physicochemical properties of the solid fraction of cattle slurry during composting using different aeration strategies. **Waste Management**, Oxford, v. 26, n.10, p. 1081-1091, 2006.

CASIDA, J.R.L.E.; KLEIN, D.A.; SANTORO, T. Soil dehydrogenase activity. **Soil Science**, Baltimore, v. 98, p. 371-376, 1964.

CHANDNA, P.; MALLIK, S.; KUHAD, R.C. Assessment of bacterial diversity in agricultural by-product compost by sequencing of cultivated isolates and amplified rDNA restriction analysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 97, p. 6991–7003, 2013a.

CHANDNA, P.; NAIN, L.; SINGH, S.; KUHAD, R.C. Assessment of bacterial diversity during composting of agricultural byproducts. **BMC Microbiology**, London, v.13, p. 99, 2013b.

COLE, J.R.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; WANG, Q.; KULAM-SYED-MOHIDDEN, A.S.; MACGARREL, D.M.; BANDELA, A.M.; CARDENAS, E.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. The ribosomal database project (RDP-II): introducing my RDP space and quality controlled public data. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 35, p. 169-172, 2007.

CULMAN, S.W.; GAUCH, H.G.; BLACKWOOD, C.B.; THIES, J.E. Analysis of T-RFLP data using analysis of variance and ordination methods: A comparative study. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 75, p. 55-63, 2008.

CUTIÑO-JIMENEZ, A.M.; MARTINS-PINHEIRO, M.; LIMA, W.C.; MARTIN-TORNET, A.; MORALES, O.G.; MENCK, C.F. Evolutionary placement of Xanthomonadales based on conserved protein signature sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v.54, p. 524–534 2010.

DE GANNES, V.D.; EUDOXIE, G.; HICKEY, W.J. Prokaryotic successions and diversity in composts as revealed by 454-pyrosequencing. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 133, p. 573–580, 2013.

ELORRIETA, M.A.; SUAREZ-ESTRELLA, F.; LOPEZ, M.J.; VARGAS-GARCIA, M.C.; MORENO, J. Survival of phytopathogenic bacteria during waste composting. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 96, p. 141–146, 2003.

ELOUAQOUDI, F.Z.; EL FELS, L.; AMIR, S.; MERLINA, G.; MEDDICH, A.; LEMEE, L.; AMBLES, A.; HAFIDI, M. Lipid signature of the microbial community structure during composting of date palm waste alone or mixed with couch grass clippings. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, v. 97, p. 75-84, 2015.

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.

FERNÁNDEZ, L.; AGARAS, B.; ZALBA, P.; WALL, L.G.; VALVERDE, C. *Pseudomonas* spp. isolates with high phosphate-mobilizing potential and root colonization properties from agricultural bulk soils under no-till management. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 48, p. 763-773, 2012.

GRAY, K.R.; SHERMAN, K.; BIDDLESTONE, A.J. A Review of composting - pt 1. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 6, p. 32-36, 1971.

GREENGENES, **16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB, 2012**. Disponível em: <http://greengenes.lbl.gov/Download/Sequence_Data/Fasta_data_files/>. Acesso em: 20 jan. 2014.

GU, Y.; WANG, P.; KONG, C.H. Urease, invertase, dehydrogenase and polyphenoloxidase activities in paddy soil influenced by allelopathic rice variety. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v.45, p. 436-441, 2009.

GUO, R.; LI, G.X.; JIANG, T.; SCHUCHARDT, F.; CHEN, T.B.; ZHAO, Y.Q.; SHEN, Y.J. Effect of aeration rate, C/N ratio and moisture content on the stability and maturity of compost. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 112, p. 171-178, 2012.

GYANESHWAR, P.; NARESH KUMAR, G.; PAREKH, L.J.; POOLE, P.S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, Dordrecht v. 245, p. 83-93, 2002.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological statistical software package for education and data analysis. **Paleontological Electronica**, Boulder, v. 4, p. 1-9, 2001.

HE, Y.; XIE, K.; XU, P.; HUANG, X.; GU, W.; ZHANG, F.; TANG, S. Evolution of microbial community diversity and enzymatic activity during composting. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 164, p. 189-198, 2013.

ISHII, K.; FUKUI, M.; TAKII, S. Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 89, p. 768-77, 2000.

KENNEDY, C.; RUDNICK, P.; MACDONALD, T.; MELTON, T. Genus *Azotobacter*, p. 384-401. In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T.; GARRITY, G.M (Ed.). 2nd ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology – The Proteobacteria**, New York, v. 2, pt B, p. 323-379, 2005.

KUMAR, R.; VERMA, D.; SINGH, B.L.; KUMAR, U.; SHWETA. Composting of sugarcane waste by-products through treatment with microorganisms and subsequent vermicomposting. **Bioresource Technology**, Oxford v.101, p. 6707-6711, 2010.

KUMAR, S. Composting of municipal solid waste. **Critical Review Biotechnology**, Haugen, v. 31, p. 112-136, 2011.

LI, T.; TIAN, R.; CAI, K.; WANG, Q.; CHEN, F.; FANG, H.; LUO, S.; LI, Z.; WANG, D.; HOU, X.; WANG, H. The Effect of pH on growth of *Clostridium botulinum* type A and expression of *bontA* and *botR* during different growth stages. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 10, p. 692–697, 2013.

LIN, T.F.; HUANG, H.I.; SHEN, F.T.; YOUNG, C.C. The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-A174. **Bioresource Technology**, Oxford, v.97, p.957–960, 2006.

LOGAN, N.; DE VOS, P. Genus *Bacillus*. In: BERGEY, D.; BOONE, D. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, New York, p. 651-656, 2009.

LOPES, C.M. **Caracterização química de subprodutos da indústria sucroenergética enriquecidos com fontes minerais e orgânicas submetidos à compostagem**. 2014. 80p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

MARTINS, L.F.; ANTUNES, L.P.; PASCON, R.C.; DE OLIVEIRA, J.C.F.; DIGIAMPIETRI, L.A.; BARBOSA, D.; PEIXOTO, B.M.; VALLIM, M.A.; VIANA-NIERO, C.; OSTROSKI, E.H.; TELLES, G.P.; DIAS, Z.; DA CRUZ, J.B.; JULIANO, L.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DA SILVA, A.M.; SETUBAL, J.C. Metagenomic analysis of a tropical composting operation at the São Paulo Zoo Park reveals diversity of biomass degradation functions and organisms. **PLoS One**, San Fransisco, v. 8, e61928, 2013.

MEUNCHANG, S.; PANICHSAKPATANA, S.; WEAVER, R.W. Co-composting of filter cake and bagasse; by-products from a sugar mill. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 96, p. 437–442, 2005.

MUYZER, G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59 , n.3, p. 695–700, 1993.

NIEMI, R.M.; VEPSÄLÄINEN, M. Stability of the fluorogenic enzyme substrates and pH optima of enzyme activities in different Finnish soils. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 60, p. 195–205, 2005.

OWEN, D.; WILLIAMS, A.P.; GRIFFITH, G.W.; WITHERS, P.J.A. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 86, p. 41-54, 2015.

PAGANS, E.; BARRENA, R.; FONT, X.; SANCHEZ, A. Ammonia emissions from the composting of different organic wastes. Dependency on process temperature. **Chemosphere**, Oxford, v. 62, p. 1534–1542, 2006.

PALLERONI, N.J. Genus I. *Pseudomonas migula* 1894, 237AL. In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T.; GARRITY, G.M (Ed.). 2nd ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology – The Proteobacteria**, New York, v. 2, pt B, p. 323–379, 2005.

PARK, K.H.; LEE, C.Y.; SON, H.J. Mechanism of insoluble phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities. **Letters in Applied Microbiology**, Malden, v. 49, p. 222-228, 2009.

PARTANEN, P.; HULTMAN, J.; PAULIN, L.; AUVINEN, P.; ROMANTSCHUK, M. Bacterial diversity at different stages of the composting process. **BMC Microbiology**, London, v. 10, p. 94, 2010.

RAMESH, A.; SHARMA, S.K.; YADAV, N.; JOSHI, O.P. Phosphorus mobilization from native soil P-pool upon inoculation with phytate-mineralizing and phosphate-solubilizing *Bacillus aryabhatai* isolates for improved P-acquisition and growth of soybean and wheat crops in microcosm conditions. **Agricultural Research**, Washington, v. 3, n.2, p. 118-127, 2014.

REJSEK, K.; VRANOVA, V.; PAVELKA, M.; FORMANEK, P. Acid phosphomonoesterase (EC 3.1. 3.2) location in soil. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 175, p. 196-211, 2012.

RYCKEBOER, J.; MERGAERT, J.; VAES, K.; KLAMMER, S.; DE CLERCQ, D.; COOSEMANS, J.; INSAM, H.; SWINGS, J. A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. **Annals of Microbiology**, New York, v. 53, p. 349-410, 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 99p.

SHENG, X.F.; ZHAO, F.; HE, LY.; QIU, G.; CHEN, L. Isolation and characterization of silicate mineral-solubilizing *Bacillus globisporus* Q12 from the surfaces of weathered feldspar. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 54, p. 1064-1068, 2008.

SPENCER, J.F.T.; RAGOUT, A.L. **Food microbiology protocols**. Totowa:Humana Press, 2001.494p.

SUNDARA-RAO, W.; SINHA, M. Phosphate dissolving microorganisms is the soil and Rhizosphere. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, New Delhi, p. 272-278, 1963.

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

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR - UNICA. Relatório final da safra 2013/2014, São Paulo, 2014. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/FAQ/>>. Acesso em: 12 Dez. 2014.

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

WATANABE, K.; NAGAO, N.; TATSUKI-TODA, T.; KUROSAWA, N. The dominant bacteria shifted from the order “Lactobacillales” to Bacillales and Actinomycetales during a start-up period of large-scale, completely-mixed composting reactor using plastic bottle flakes as bulking agent. **World Journal Microbiology Biotechnology**, New York, v. 25, p. 803-811, 2009.

WHITELAW, M.A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. **Advances in Agronomy**, New York, v. 69, p. 99–151, 2000.

WOLIŃSKA, A.; STEPŃIEWSKA, Z. Dehydrogenase activity in the soil environment. In: CANUTO, R.A. (Ed.). **Dehydrogenases**. Rijeka: InTech, chap. 8, p. 196-276, 2012.

YANG, F.; LI, G.; SHI, H.; WANG, Y. Effects of phosphogypsum and superphosphate on compost maturity and gaseous emissions during kitchen waste composting. **Waste Management**, Oxford, v. 30, p. 70-76, 2014.

4 EFEITO DA APLICAÇÃO DE BACTÉRIAS MOBILIZADORAS DE FÓSFORO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA CANA-DE-AÇÚCAR E SOBRE AS COMUNIDADES BACTERIANAS DO SOLO

Resumo

O fósforo é um nutriente essencial para o desenvolvimento da cultura da cana-de-açúcar e sua falta limita a produtividade e qualidade tecnológica da cultura. Pequenas quantidades de P estão disponíveis nas condições dos solos tropicais, devido à alta capacidade de fixação destes solos, sendo necessário aplicar quantidades acima do que realmente é exportado pela planta. Para melhorar a adubação fosfatada, fontes orgânicas de P como, por exemplo, o composto de resíduos da indústria sucroenergética, vêm sendo utilizadas com resultados promissores. As chamadas bactérias mobilizadoras de P solubilizam o P ligado ao Fe, Al e Ca e mineralizam o P presente na matéria orgânica, aumentando a disponibilidade para a planta, apesar dos resultados positivos em outras culturas, não existem trabalhos estudando seu uso na cultura da cana-de-açúcar. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da aplicação de consórcios de bactérias mobilizadoras de P com diferentes fontes de P sobre o desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar e seu efeito sobre as comunidades bacterianas do solo. Para isto, primeiramente, as estirpes foram caracterizadas quanto ao potencial em mobilizar P, depois foi instalado um experimento em casa de vegetação utilizando diferentes fontes de P (sem P, composto, rocha fosfática de Araxá, composto + rocha fosfática de Araxá, super fosfato triplo, composto + super fosfato triplo), em que foram testados o Inoculante 1: *Pseudomonas* sp. PSBR10, *Azotobacter* sp. AZTBR19, *Rhizobium* sp. RIZBR01; e o Inoculante 2: *Bacillus simplex* BACBR04, *Bacillus* sp. BACBR06, *Rhizobium* sp. RIZBR01. Foram avaliados parâmetros na planta (acúmulo de P, N, e K, acúmulo de biomassa). Além disso, por meio do uso da técnica de sequenciamento que utiliza o sistema MiSeq™ (Illumina), foi determinado o efeito dos tratamentos sobre as comunidades bacterianas do solo. Todas as estirpes apresentaram potencial para mobilizar P. Em geral os inoculantes tiveram um efeito positivo sobre o acúmulo de P independentemente da fonte de P. Entretanto, com a inoculação, os maiores incrementos na nutrição fosfatada foram observados utilizando-se composto e super fosfato triplo. Usando composto como fonte de P e aplicando o inoculante 2 observaram-se incrementos de 53,90 %, 28,91%, 49,12% no acúmulo de P, N e K, respectivamente, em relação ao tratamento sem inoculação. Já com super fosfato triplo como fonte de P e aplicando-se o inoculante 2, os incrementos foram de 29,05% e de 24,81% no acúmulo de P e K, respectivamente. Com a utilização do inoculante 1, foram observadas tendências de aumentos, mas não foram significativos. A aplicação dos inoculantes modificou a estrutura das comunidades bacterianas em relação aos tratamentos não inoculados, principalmente nos tratamentos que apresentaram maior eficiência no uso do P. As bactérias utilizadas nos inoculantes (principalmente o 2) devido a sua capacidade de mobilizar P, modificaram a estrutura das comunidades bacterianas naturais do solo, aprimorando o uso do P e de outros nutrientes como o N e K pelas plantas de cana-de-açúcar. Dessa forma, o inoculante 2 se apresenta como uma alternativa promissora, para tornar a fertilização fosfatada orgânica e mineral mais eficiente na cultura da cana-de-açúcar.

Palavras chaves: Bactérias mobilizadoras de P; Composto; Cana-de-açúcar; Disponibilidade de P; Illumina; Comunidades bacterianas

Abstract

Phosphorus is an essential nutrient for the development of the sugarcane culture and its deficiency limits the productivity and technological quality of the crop. Only small amounts of P are available under tropical soils conditions due to the high P binding capacity of these soils. When applying P-fertilizer only 10 to 15% are used by the plants and it is necessary to apply amounts way above the actually exported quantity by the plant. To improve phosphate fertilization, organic phosphorus sources, for example, the compost of the sugarcane industry waste has been used with promising results. P mobilizing bacteria solubilize P connected to Fe, Al and Ca and mineralize P present in organic matter, increasing P availability for many plants. Despite the positive results in other cultures, there are no studies evaluating its use in sugarcane. The objective of this study was to evaluate the effect of applying P mobilizing bacterial consortia with different P sources on the development of sugarcane and their effect on soil bacterial communities. In our experiments, first, the strains were characterized to find out their potential to mobilize P, then a greenhouse pot experiment with sugarcane was conducted, using different P sources (zero P, compost, Araxá rock phosphate, compost + Araxá rock phosphate, triple superphosphate, triple superphosphate + compost). During composting two different inoculants were tested: Inoculant 1: *Pseudomonas* sp. PSBR10, *Azotobacter* sp. AZTBR19, *Rhizobium* sp. RIZBR01; and Inoculant 2: *Bacillus simplex* BACBR04, *Bacillus* sp. BACBR06, *Rhizobium* sp. RIZBR01. Plant parameters were evaluated (P, N, and K accumulation, biomass accumulation). Furthermore, by using the sequencing technique MiSeq™ System (Illumina) platform, the effect of these treatments on the soil bacterial communities was tested. All strains mobilized P. Generally, inoculants had a positive effect on the accumulation of P regardless of P source. However, with inoculation, the largest increases in phosphorus nutrition were observed using compost and triple superphosphate. Using compost as P source and applying the inoculant 2 we observed increments of 54%, 29%, 50% in the accumulation of N, P and K, respectively, when compared to the treatments without inoculation. Using triple superphosphate as a source of P and applying the inoculant 2, the increases were 29% and 25% in the accumulation of P and K, respectively. With the use of inoculant 1 increasing trends were also observed, but they were not statistically. Inoculant application changed the structure of soil bacterial communities compared to un-inoculated treatments, particularly in treatments that showed most efficient P use. The bacterial strains used in our inoculants (especially in inoculant 2) changed the structure of the natural soil bacterial communities and mobilized P, improving the use of phosphorus and other nutrients such as N and K, by the sugarcane. Therefore, inoculant 2 represents a promising alternative to improve organic and mineral P fertilization in the sugarcane culture.

Keywords: P mobilizing bacteria; Composting; Sugarcane; P availability; Illumina; Bacterial communities

4.1 Introdução

A cana-de-açúcar é uma cultura importante no Brasil tanto socialmente, quanto economicamente, devido a sua crescente expansão na área de cultivo e por consequência na produtividade. Na última safra 2014-2015 9,00 milhões de ha foram plantados no Brasil com uma produção de 634,77 Mg⁻¹ (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2015).

Um dos principais gastos com insumos agrícolas nesta cultura é para corrigir a deficiência de fósforo (P) na cultura, visto que sua falta compromete a absorção de outros nutrientes, diminuindo o crescimento inicial da raiz (KHAN et al., 2010). Sua falta durante o desenvolvimento da cultura da cana-de-açúcar traz consequências negativas, diminuindo o acúmulo de açúcares na planta, pois, para a formação da sacarose é necessária energia na forma de ATP (molécula contendo P) para catalizar a união dos monossacarídeos Glucose-1-fosfato e frutose, resultando na formação da sacarose (VEITH; KOMOR, 1993). Do ponto de vista industrial a deficiência de fósforo também é problemática, uma vez que dificulta a clarificação do caldo durante a fabricação do açúcar, criando a necessidade de adicionar fosfatos solúveis para atingir o teor ideal de P₂O₅ que permita a clarificação eficiente. Esta prática, por sua vez, aumenta o custo de fabricação (MAHADEVAIAH et al., 2007).

Na maioria dos solos tropicais o P aplicado via fertilizante é fixado. Por este motivo, apesar dos solos conterem grandes quantidades de P, apenas pequenas quantidades estão disponíveis para as plantas e outros organismos (LIU et al., 2008). Para melhorar a adubação fosfatada e diminuir o uso de fertilizantes minerais são utilizadas fontes alternativas como o composto produzido com resíduos da indústria sucroenergética. Muitas são as informações relativas ao valor do composto na nutrição da cana-de-açúcar, com aumento substancial na produção (MELCHOR et al., 2008; JEONG et al., 2011; SHOWLER, 2015).

Existe um grupo de bactérias denominadas bactérias mobilizadoras de P (BMP) que, além de solubilizar fósforo inorgânico (Pi) também mineraliza P orgânico (Po) através da produção de enzimas como as fosfatases (ácidas e alcalinas) e fitases, além de facilitar a translocação do fosfato à planta (OWEN et al., 2015). Entretanto, ainda não se conhece o efeito da aplicação de diferentes fontes de P sobre a microbiota do solo e sobre a disponibilidade do P, nem se sabe se a eficiência do fertilizante pode ser aprimorada com o uso de BMP.

Portanto, com a necessidade de diminuir a taxa de aplicação e tornar mais eficiente o uso de fertilizantes minerais, atualmente a agricultura demanda o uso de BMP, a fim de melhorar a eficiência do uso do P, aumentando o crescimento das plantas, além de aumentar a

disponibilidade de outros nutrientes, melhorar a emergência das sementes, e manter as plantas saudáveis (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009). São necessários mais estudos que abordem biotecnologicamente e com técnicas de biologia molecular a compreensão sobre os mecanismos de ação das BMP e o seu efeito quando são utilizadas diferentes fontes de P na cana-de-açúcar. Baseando-se nestes fatos, e com o intuito de diminuir as doses de P que são aplicadas na cultura da cana-de-açúcar e melhorar seu aproveitamento, foi avaliado o efeito da inoculação de duas misturas de estirpes bacterianas sobre a disponibilidade de P e seu efeito sobre as comunidades bacterianas do solo quando são usadas diferentes fontes de P.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Potencial para mobilizar fósforo das estirpes usadas no inoculante

As estirpes utilizadas foram *Pseudomonas* sp. PSBR10, *Azotobacter* sp. AZTBR19, *Rhizobium* sp. RIZBR01, *Bacillus simplex*. BACBR04. *Bacillus* sp. BACBR06. As estirpes são provenientes da rizosfera da cana-de-açúcar e foram selecionadas previamente pela capacidade de solubilizar P *in vitro* em placa com meio SMRS1 sólido (SUNDARA-RAO; SINHA, 1963) (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Estirpes potenciais solubilizadoras de fosfato utilizadas nos inoculantes

Identificação	Origem	Descrição	Local
<i>Pseudomonas</i> sp. PSBR10	Cana-de-açúcar RB 86-7515	Rizosfera	Novo Horizonte, SP.
<i>Azotobacter</i> sp. AZTBR19	Cana-de-açúcar RB 86-7515	Rizosfera	Novo Horizonte, SP.
<i>Rhizobium</i> sp. RIZBR01	Cana-de-açúcar RB 86-7515	Rizosfera	Novo Horizonte, SP.
<i>Bacillus simplex</i> . BACBR04	Cana-de-açúcar RB 86-7515	Rizosfera	Novo Horizonte, SP.
<i>Bacillus</i> sp. BACBR06	Cana-de-açúcar RB 86-7515	Rizosfera	Novo Horizonte, SP.

As estirpes foram reativadas em placas com meio semi-específico, King B para *Pseudomonas* sp. PSBR10; ASHBY para *Azotobacter* sp. AZTBR19; 79R para *Rhizobium* sp. RIZBR01; e LB para *Bacillus simplex* BACBR04 e *Bacillus* sp. BACBR06. As placas foram incubadas à temperatura de 30 °C para a verificação da formação da morfologia típica,

característica das bactérias (PALLERONI, 2005; KENNEDY et al., 2005; KUYKENDALL et al., 2005; LOGAN; de VOS, 2009).

4.2.1.1 Determinação da capacidade de solubilizar fosfato em meio de cultura líquido

As estirpes *Pseudomonas* sp. PSBR10, *Azotobacter* sp. AZTBR19, *Rhizobium* sp. RIZBR01, *Bacillus simplex* BACBR04 e *Bacillus* sp. BACBR06 foram multiplicadas em tubos contendo meio de cultura SMRS1 por 24 h a 30 °C sob agitação de 150 rpm; em seguida as células foram lavadas com solução salina e sua D.O.₆₀₀ foi ajustada a 0,9 – 1. A seguir, 5 mL foram inoculados em erlenmeyers de 250 mL contendo 45 mL do meio SMRS1 com 5 g L⁻¹ de rocha fosfática de Araxá como fonte de P. O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente aleatório com três repetições.

A quantificação do fosfato solúvel foi feita utilizando-se a técnica de azul de fosfomolibdênio de acordo com Estrada et al. (2013). As análises foram realizadas empregando o kit Spectroquant® Fósforo (PMB) (Merck) em culturas com 48 h após a inoculação (AI). As alíquotas (1 mL) foram centrifugadas a 13000 x g por 2 min. Em um tubo de vidro, foram adicionados 2,25 mL de água Milli-Q, 0,25 mL do sobrenadante, 75 µL do reagente 1 (íons molibdato em solução sulfúrica) e 50 mg do reagente 2 (ácido ascórbico). Depois de 5 min do início da reação foram feitas leituras da absorbância no espectrofotômetro em comprimento de onda de 712 nm. As leituras foram normalizadas por meio de uma curva padrão previamente obtida a partir de concentrações conhecidas de H₂PO₄. A determinação do pH no meio de cultura foi feita paralelamente para verificar a variação do mesmo.

4.2.1.2 Determinação da produção de enzimas fosfatases alcalina e ácida pelas estirpes

Para a determinação da atividade das fosfatases alcalina (FAlc) e ácida (FAc) foi seguida a metodologia descrita por Fernández et al. (2012). As amostras foram retiradas das culturas em fermentação utilizadas na determinação da solubilização de fosfato (4.2.1.1) às 24 h AI. Alíquotas de 0,1 mL foram adicionadas a 0,1 mL de 0,05 M *P*-nitrofenil fosfato, e 0,4 mL do buffer universal modificado (pH 6,5 para FAc e pH 11 para FAlc). A seguir foram incubadas a 37 °C durante 1 h e se adicionou 0,1 mL de CaCl₂ 0,5 M e 0,4 mL de NaOH 0,5 M. O controle negativo consistiu do meio estéril. As amostras foram centrifugadas a 13000 x g durante 2 min e foi quantificada a intensidade da cor amarela do *P*-nitrofenol fosfato (pNP) do sobrenadante a 405 nm (TABATABAI; BREMNER, 1969). A atividade das fosfatases dos

isolados foi expressa em microgramas de pNP produzido por mililitro por hora. As leituras foram normalizadas por meio de uma curva padrão previamente obtida com concentrações conhecidas de pNP.

4.2.1.3 Avaliação da produção de Auxinas

As estirpes selecionadas foram testadas quanto à capacidade de produzir compostos indólicos. A quantificação dos compostos indólicos foi realizada conforme o método desenvolvido por Gordon e Weber (1950). Uma colônia característica de cada estirpe foi cultivada em meio líquido LB sob agitação a 150 rpm a 24 – 30 °C até atingir D.O.₆₀₀ = 0,9-1. Posteriormente, 30 µL de cultura bacteriana foi inoculado em 3 mL de meio LB suplementado com L-triptofano na concentração final de 1 mg mL⁻¹. Os tubos foram mantidos no escuro sob agitação de 150 rpm em uma temperatura de 30 °C e foram realizadas medições após o crescimento das culturas pelo período de 24 h AI. Para cada avaliação, alíquotas de 1 mL foram centrifugadas a 9400 x g por 3 min. Em tubos de ensaio, 500µL do sobrenadante foram misturados a 500µL do reagente de Salkowski, sendo as mesmas incubadas no escuro por 30 min à temperatura ambiente. Após este período foram realizadas leituras utilizando-se espectrofotômetro (IBM). As leituras foram normalizadas por meio de uma curva padrão previamente obtida com concentrações conhecidas de ácido 3-indol-acético.

4.2.2 Caracterização molecular das estirpes

4.2.2.1 Extração do DNA

A extração do DNA total foi realizada com auxílio do kit para extração de DNA genômico WIZARD Genomic DNA purification kit (Promega Corporation, Madison, USA). O DNA extraído foi analisado segundo Sambrook e Russell (2001) e quantificado em gel de agarose 1%. Após a eletroforese, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta em fotodocumentador.

4.2.2.2 Amplificação do gene 16S DNAr

Para a amplificação do gene 16S RNAr foi utilizada a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se os *primers* 27F, 1492R e P1 (Tabela 4.2). Cada reação de amplificação foi preparada em um volume final de 50 µL, sendo composta de 50 ng de DNA

genômico. Foram utilizados 3 mM de $MgCl_2$; 0,2 mM de dNTP (Invitrogen Corporation, USA); 0,02 U μL^{-1} de Taq polimerase (Invitrogen Corporation, USA); tampão para Taq polimerase 1X (Tris-HCl 1 mmol.L⁻¹, pH 9,0 e KCl 5 mmol.L⁻¹) (Invitrogen Corporation, USA); 0,20 pmol μL^{-1} de cada primer; 0,10 mg mL⁻¹ de BSA; 50 ng de DNA molde e água Mili-Q para completar o volume da reação. Os ciclos de amplificação foram constituídos de uma desnaturação inicial de 94 °C por 4 min seguidos de 25 ciclos de desnaturação a 94° C por 30 seg, uma etapa de anelamento a 63 °C por 1 min e uma etapa de extensão a 72 °C por 1 min. Ao final foi efetuada uma última etapa de extensão a 72 °C por 1 min. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Tabela 4.2 - *Primers* utilizados para sequenciamento do gene 16S RNAr das estirpes

Primer	Sequência (5'-3')	Referência
27F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	Lane (1991)
1492R	CGG NWA CCTT GTT ACG ACT T	
P1	AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T	Deng e Hiruki (1991)

4.2.2.3 Sequenciamento dos fragmentos e análise de similaridade

O sequenciamento do gene 16S RNAr das estirpes foi realizado pelo método de Sanger. Com o resultado foram realizados estudos de similaridade pelo programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com as sequências contíguas possuindo em média 1000 pares de base. O programa Mega6 (TAMURA et al., 2013), cuja comparação se dá pela pesquisa contra o banco de dados de nucleotídeos NCBI foi utilizado para fazer as comparações.

4.2.3 Instalação do experimento com bactérias mobilizadoras de fósforo em plantas de cana-de-açúcar em casa de vegetação

4.2.3.1 Preparo do inoculante

As estirpes foram reativadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio LB, a 30 °C sob agitação a 150 rpm por 24 h. Foram semeadas em placas com meio semi-específico, King B para *Pseudomonas* spp. LB para *Bacillus* spp, ASHBY para *Azotobacter* sp. e meio 79R para *Rhizobium* sp. e foram observadas suas características morfológicas típicas (PALLERONI, 2005; LOGAN e de VOS, 2009; KENNEDY et al, 2005; KUYKENDALL et al, 2005). Após

a verificação da pureza, as estirpes foram multiplicadas em tubos contendo meio LB nas condições citadas anteriormente. As células foram lavadas com solução salina e a D.O.₆₀₀ foi ajustada para 0,9-1. Um mL foi transferido para Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do meio LB a 30 °C sob agitação a 150 rpm por 24 h. O número de células viáveis foi determinado pelo método de microplaca, no respectivo meio para cada bactéria (SPENCER e RAGOUT, 2001). No experimento foram utilizados dois inoculantes:

-Inoculante 1: *Pseudomonas* sp. PSBR10, *Azotobacter* sp. AZTBR19, *Rhizobium* sp. RIZBR01.

-Inoculante 2: *Bacillus simplex* BACBR04, *Bacillus* sp. BACBR06, *Rhizobium* sp. RIZBR01.

A inoculação foi realizada no plantio e 30 dias após o plantio (DAP) acompanhando a adubação de cobertura. Foi aplicado 1 mL de cada estirpe por vaso, totalizando 3 mL do inoculante por vaso.

4.2.3.2 Caracterização da rocha fosfática, composto, solo e cultivar de cana-de-açúcar

O solo utilizado oriundo do Campus experimental da ESALQ-USP foi coletado nos primeiros 20 cm do horizonte A de um Latossolo Vermelho distrófico de textura média. A partir da análise química do solo (Tabela 4.3), a saturação por bases foi elevada a 60 % com 0,11 g kg⁻¹ de CaCO₃; 0,03 g kg⁻¹ de MgCO₃ (Relação 3:1), deixando reagir o corretivo durante 30 d, mantendo-se a umidade próxima à capacidade de campo. Foram aplicados 150 mg kg⁻¹ de P e as fontes de P variaram de acordo com os tratamentos (Tabela 4.5). A adubação nitrogenada e potássica foi parcelada em duas frações aplicando-se 50 mg de N kg⁻¹; 40 mg de K kg⁻¹ no plantio e 50 mg kg⁻¹; 40 mg de K kg⁻¹ 30 DAP, a fonte de N e de K utilizada foi NH₄NO₃ e K₂SO₄, respectivamente. Quanto aos micronutrientes, foram aplicados: 1,50 mg kg⁻¹ de cobre (CuSO₄.5H₂O); 0,25 mg kg⁻¹ de Boro (H₃BO₃); 2 mg kg⁻¹ de manganês (MnSO₄.H₂O); 0,1 mg kg⁻¹ de molibdênio ((NH₄)₆Mo₇O₂₄.2H₂O).

Tabela 4.3 - Caracterização química do solo utilizado no experimento

	C.O.	P	S	K	Ca	Mg	H+Al	Al	S.B	CTC
pH CaCl ₂	g dm ⁻³		mg dm ⁻³	mmolc dm ⁻³						
5,3	4	9	11	1,9	16	7	20	0	24	44,2

Sat. Bases	Sat. Al	B	Cu	Fe	Mn	Zn
V%	m%	g dm ⁻³				
54	0	0,09	0,7	41	9,5	2,5

O composto utilizado no experimento foi produzido conforme descrito no item 3.2.1 utilizando torta de filtro e cinzas (Relação 2:1). Foi determinado o teor de P na rocha e no composto utilizado no experimento (Tabela 4.4) (LOPES, 2014). Neste estudo foram usadas plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) da variedade RB 85-5453.

Tabela 4.4 - Teor de P na rocha fosfática de Araxá e no composto utilizado no experimento com plantas de cana-de-açúcar

Fonte de P	P total	P Ac. Cítrico
	g kg ⁻¹	
Rocha fosfática de Araxá	111,96	17,07
Composto	15,00	6,59

4.2.3.3 Produção das mudas, Plantio e delineamento experimental

Toletes foram cortados e selecionados por seu comprimento e largura procurando homogeneizar ao máximo possível as mudas (Ilustrado na figura 4.1). Os toletes foram cultivados durante 45 DAP em bandejas contendo areia e vermiculita na proporção 2:1. Antes do plantio as raízes foram lavadas com água destilada.

Figura 4.1 - Plantio e seleção das mudas usadas no experimento

O experimento foi instalado no dia 15 de outubro de 2014 em vasos com capacidade para 12 kg e contendo 9 kg de solo. O solo foi mantido com 70 % da sua capacidade máxima de retenção de água. O controle da umidade do solo foi realizado pesando-se cada vaso.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no campus da ESALQ-USP, Piracicaba, SP durante 75 d e o delineamento experimental foi em blocos ao acaso com quatro repetições, em arranjo fatorial 3 x 9 com 4 repetições, totalizando 72 vasos. Os fatores foram: sem inoculante, Inoculante 1 e Inoculante 2; e 6 fontes de P (os tratamentos são descritos na tabela 4.5).

Tabela 4.5 - Tratamentos utilizados no experimento em casa de vegetação

Tratamentos	Fonte de P	Inoculante
Sem P	Sem P	Sem inoculante
Composto	Composto	
Rocha*	Rocha de Araxá	
Rocha + Composto*	Rocha de Araxá + Composto	
SPT	Super Fosfato Triplo	
SPT + Composto	Super Fosfato Triplo + Composto	Inoculante 1
Sem P	Sem P	
Composto	Composto	
Rocha	Rocha de Araxá	
Rocha + Composto	Rocha de Araxá + Composto	
SPT	Super Fosfato Triplo	Inoculante 2
SPT + Composto	Super Fosfato Triplo + Composto	
Sem P	Sem P	
Composto	Composto	
Rocha	Rocha de Araxá	
Rocha + Composto	Rocha de Araxá + Composto	
SPT	Super Fosfato Triplo	
SPT + Composto	Super Fosfato Triplo + Composto	

*Tratamentos com Rocha receberam 20% da recomendação na forma de SPT

Para o cálculo da quantidade aplicada de Rocha fosfática de Araxá e composto, foi utilizado o total do P presente nas fontes. Devido à baixa solubilidade da rocha fosfática de Araxá, nos tratamentos em que foi aplicada a rocha fosfática (Rocha, Rocha + Composto) como fonte de P, 20 % do P foi fornecido na forma de Super fosfato Triplo (SPT). Nos tratamentos em que foram utilizadas duas fontes de P, cada fonte forneceu 50 % da dose recomendada.

4.2.3.4 Coleta de amostras

Após os 75 DAP as amostras para posterior análise enzimática e molecular foram retiradas do solo. Foram tomadas 5 amostras em diferentes níveis de cada vaso e a partir delas foi obtida uma amostra composta de cada repetição.

Após a colheita da parte aérea, o material vegetal foi levado à estufa a 65 °C por 72 h. Em seguida, o material foi pesado para determinação de massa seca (MS), e foi finamente moído em moinho de aço inoxidável do tipo Willey.

4.2.4 Determinação da atividade enzimática das fosfatases ácida e alcalina

As enzimas FAlc e FAc foram quantificadas segundo Tabatabai e Bremner (1969). 0,5 g de composto foi colocado em tubos de vidro de 50 mL, foram adicionados 4 mL do tampão MUB (pH 6,5 para FAc ou pH 11 para FAlc) e 1 mL da solução p-nitrofenilfosfato de sódio (0,05 M). Os frascos foram incubados a 37 °C por 30 min. Após a incubação foram adicionados 1 mL de CaCl₂ 0,5 M e 4 mL de NaOH 0,5 M, misturando vigorosamente. A suspensão foi filtrada em papel filtro Whatman n° 2 e se procedeu a realizar a leitura da absorbância a 420 nm em espectrofotômetro. O conteúdo de pNP foi calculado por uma curva padrão previamente realizada.

4.2.5 Análise das comunidades bacterianas no solo

As amostras foram submetidas ao sequenciamento por meio da plataforma de nova geração MiSeq™ System (Illumina). O DNA extraído das amostras foi amplificado usando um mix de 4 *primers forward* e um mix de 4 *primers reverse* (Tabela 4.6). Os *primers* continham pré-adaptadores conforme recomendação do fabricante.

Tabela 4.6 - *Primers* utilizados na reação de PCR para sequenciamento da região V4 ribossomal

Primer	Sequência (5'→ 3')
16SV4FPCR1_1 F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAA GAGACAGAYTGGGYDTAAAGNG
16SV4FPCR1_2 F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAA GAGACAGNAYTGGGYDTAAAGNG
16SV4FPCR1_3 F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAA GAGACAGNNAYTGGGYDTAAAGNG
16SV4FPCR1_4 F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAA GAGACAGNNNAYTGGGYDTAAAGNG
16SV4RPCR1_1 R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAA GAGACAGCCGTCAATTCMTTTRAGT
16SV4RPCR1_2 R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAA GAGACAGNCCGTCAATTCMTTTRAGT
16SV4RPCR1_3 R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAA GAGACAGNNCCGTCAATTCMTTTRAGT
16SV4RPCR1_4 R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAA GAGACAGNNNCCGTCAATTCMTTTRAGT

As condições da reação foram as seguintes: 94 °C por 4 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 s; 63 °C por 1 min e 72 °C por 1 min; seguido de uma extensão final de 72°C por 10 min. Utilizaram-se 3,75 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTP (Invitrogen Corporation, USA); 0,05 U µL⁻¹ de Taq polimerase premium (Invitrogen Corporation, USA); tampão para Taq polimerase 1X (Tris-HCl 1 mmol.L⁻¹, pH 9,0 e KCl 5 mmol.L⁻¹) (Invitrogen Corporation, USA); 0,2 µM de cada *primer*; 1 µL de DNA (50 ng) e água Mili-Q para completar o volume da reação.

4.2.5.1 Procedimentos de bioinformática para avaliação dos dados do sequenciamento

Para análise das sequências obtidas, inicialmente foi necessário efetuar o comando *join_paired_ends.py* com base no programa QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*). Este comando permite que as leituras *forward* e *reverse* geradas no equipamento da Illumina se juntem, formando uma leitura única (*single read*). Em seguida foi realizada a seleção dos dados com base no valor de qualidade (*quality value*), fixado em 25 utilizando-se o programa *CLC Genomics Workbench 6* (CLCbio). Em seguida, o restante das análises das

sequências foi realizado utilizando-se o programa QIIME. Resumidamente, o agrupamento das unidades taxonômicas operacionais (UTOs) foi realizado para o nível de distância de 3 %, ou seja, as UTOs foram estabelecidas a 97% de similaridade pela metodologia *uclust* empregando-se, para isso, o comando *pick_OTUs.py*. O comando *align_seqs.py* foi empregado para o alinhamento das sequências pelo método PYNAST. A classificação taxonômica foi realizada com base no comando *assing_taxonomy.py*, pelo RDP *classifier* (COLE et al., 2007), utilizando o banco de dados do *Greengenes* chamado *Caporoso Reference OTUs* (GREENGENES, 2012). A tabela de UTOs foi obtida por meio do comando *make_otu_table.py*. Em seguida procedeu-se a retirada de sequências pertencentes a DNA mitocondrial e cloroplastidial por meio do comando *filter_taxa_from_OTU_table.py*. Os gráficos de classificação taxonômica foram obtidos por meio do comando *summarize_taxa_through_plots.py*.

4.2.5.2 Análise estatística dos dados obtidos

As variações na estrutura da comunidade bacteriana foram visualizadas a partir da Análise de Coordenadas Principais (*PCoA*), a qual demonstra a distância relativa entre as amostras, permitindo uma visão robusta da distribuição destas, com base na heterogeneidade na composição destas comunidades (beta diversidade) (LEGENDRE; LEGENDRE, 2012). Previamente a esta análise a tabela de UTOs foi transformada em uma matriz de distância pelo índice de *Bray-Curtis*. Todas estas análises foram realizadas no software PAST 3.03 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

4.2.6 Análise química do material vegetal e do solo

Conforme metodologia descrita em Malavolta, Vitti e Oliveira (1997), O material vegetal moído foi digerido em solução nitro-perclórica, para obtenção dos extratos que foram utilizados na determinação dos teores de P e K presentes na parte aérea da planta por espectrofotômetro. Para a determinação do N, o material foi digerido com Ácido sulfúrico.

A caracterização química do solo nos vasos após a colheita da parte aérea foi feita através da medição de vários parâmetros em amostras de solo secas, seguindo as metodologias de Raij et al. (2001). Foram determinados o P, Ca, Mg e K disponíveis, pelo método da resina trocadora de íons.

4.2.7 Análise estatística dos dados

Foi testada a normalidade e a homogeneidade dos resultados através dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett, respectivamente, utilizando o software Statistica 7.0®. A significância das análises foliares, fosfatases, biomassa e concentração de P foliar foi testada por meio da análise de variância de uma via (one-way ANOVA). Quando detectadas diferenças ($p \leq 0,05$), as médias dos tratamentos foram comparadas com seus respectivos controles pelo teste Tukey a 5 e 10 % de probabilidade, utilizando o pacote de software R® (versão 2.5.1.).

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Caracterização molecular e potencial para mobilizar fósforo das estirpes usadas no inoculante

A análise de filogenia do 16S RNAr da estirpe PSBR10 mostrou uma alta similaridade com diferentes gêneros de *Pseudomonas*, entretanto não foi possível identificá-la ao nível de espécie (figura 4.2A). Apesar da estirpe AZTBR19 apresentar características morfológicas similares ao gênero *Azotobacter*, apresentou maior similaridade com o gênero *Pseudomonas*. Mesmo sendo o gene de 16S RNAr a base da classificação bacteriana atual, sabe-se que quando as espécies dentro de um gênero ou diferentes espécies estão estreitamente relacionados não é possível ser diferenciados utilizando o gene 16S RNAr (PEIX; RAMÍREZ-BAHENA; VELÁZQUEZ, 2009). Estudos taxonômicos prévios demonstraram que os genes “housekeeping” como *recA*, *atpD*, *carA* permitem a diferenciação de espécies similares dentro do gênero *Pseudomonas* (HILARIO; BUCKLEY, YOUNG, 2004). De acordo com o estudo filogenético do gene 16S RNAr *Azotobacter* e *Pseudomonas* apresentam alta similaridade (REDIERS; VANDERLEYDEN; de MOT, 2004). Özen e Ussery (2012) em estudos de similaridade com genomas de *Azotobacter vinelandii* e de *Pseudomonas* sugerem que *Azotobacter* poderia ser considerado uma *Pseudomonas*.

Figura 4.2 - Árvore filogenética baseada nas sequências parciais do gene 16S RNAr, incluindo as sequências das estirpes mobilizadoras de P utilizadas nos inoculantes. A árvore foi gerada pelo método *neighbour-joining*. Os números mostrados nas conexões indicam os valores de bootstrap (percentual de 1000 repetições). A barra de escala indica a taxa de substituição por base. Os números após a espécie indicam a sequência de acesso do banco de dados NCBI

A estirpe BACBR06 mostrou alta similaridade com *B. safensis* e *B. pumilus* (Figura 4.2B). *B. safensis* e *B. pumilus* estão altamente relacionadas dificultando sua diferenciação com base em características fenotípicas, bioquímicas e sequências do gene 16S rRNA.

Estudos conduzidos por Branquinho et al, (2014) demonstram que o sequenciamento dos genes “housekeeping”, como *gyrB* (β -subunidade da girase do ADN) e *rpoB* (β -subunidade da RNA polimerase) permitem a diferenciação dos gêneros. Enquanto BACBR04 apresentou alta similaridade com *Bacillus simplex* e a estirpe RIZBR01 teve maior similaridade com o gênero *Rhizobium*, não foi possível identificá-los ao nível de espécie (Figura 4.2C).

4.3.2 Capacidade para mobilizar P pelas estirpes usadas nos inoculantes

As estirpes utilizadas nos inoculantes apresentaram potencial para mobilizar P (solubilizam PO_4^{3-} e mineralizam Po) e promover o crescimento das raízes e desenvolvimento de pelos radiculares que indiretamente aumentam a superfície de contato das raízes, permitindo maior captação de P no solo (tabela 4.7).

As estirpes solubilizaram PO_4^{3-} da rocha fosfática. A quantidade de PO_4^{3-} solubilizado variou entre 11,10 e 304,66 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo a estirpe *Azotobacter* sp AZTBR10 a que apresentou maior solubilização 48 h AI. Em todas as estirpes a solubilização de PO_4^{3-} esteve acompanhada da acidificação do meio de cultura, apresentando correlação negativa entre o pH e a solubilização de P (dados não apresentados). A diminuição do pH no meio de cultura sugere que a solubilização de PO_4^{3-} pelas estirpes pode estar associada à produção de ácidos orgânicos os quais acidificam o meio de cultura, solubilizando a rocha, quer seja diretamente pela extrusão de prótons (acidificação) ou/e pela capacidade dos ácidos orgânicos aniônicos de competir pelos sítios de adsorção do P (troca de ligantes), além de formar complexos solúveis com os íons metálicos ligados ao P insolúvel (Ca, Al, Fe), assim, o P é liberado tornando-se disponível (OWEN et al., 2014).

Tabela 4.7 - Potencial para mobilizar fósforo pelas estirpes usadas nos inoculantes. A solubilização de PO_4^{3-} e o efeito sobre o pH foi quantificado 48 horas após a incubação. A produção de fosfatases ácida e alcalina, e de compostos indólicos foram quantificados após 24 horas após a inoculação. Os dados são médias de 3 repetições $\pm$ erro padrão

Estirpe	PO_4^{3-}	pH*	Fosfatase	Fosfatase	Compostos indólicos
	$\mu\text{g mL}^{-1}$		ácida	alcalina	
			$\mu\text{g.mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$		$\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Bacillus simplex</i>	45,98 $\pm$	4,43 $\pm$	86,99 $\pm$	57,4 $\pm$	279,57 $\pm$
BacBr04	2,81	0,01	10,83	17,31	16,21
<i>Bacillus</i> sp.	41,34 $\pm$	4,55 $\pm$	87,59 $\pm$	22,83 $\pm$	308,81 $\pm$
BacBr06	0,42	0,01	6,46	6,05	43,50
<i>Azotobacter</i> sp.	304,66 $\pm$	3,41 $\pm$	873,95 $\pm$	467,01 $\pm$	255,02 $\pm$
Azt19	48,32	0,02	114,84	149,00	73,08
<i>Pseudomonas</i> sp.	252,99 $\pm$	3,45 $\pm$	1281,14 $\pm$	292,34 $\pm$	322,57 $\pm$
PsBr10	27,56	0,01	55,06	43,52	18,26
<i>Rhizobium</i> sp.	11,10 $\pm$	4,07 $\pm$	2555,17 $\pm$	313,54 $\pm$	340,16 $\pm$
RizBr01	0,10	0,02	3,34	11,07	71,82

*pH inicial do meio SMRS1: 6,8

Presumivelmente os principais ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias, produto da oxidação direta da glicose, são o ácido glucônico e 2-cetoglucônico. Já foi demonstrado que os gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* e *Rhizobium* produzem ácidos orgânicos na solubilização de P (PUENTE; BASHAN, 2009; PARK; LEE; SON, 2009; ROJAS-TAPIAS et al., 2012; MARRA et al., 2012). A fonte de nitrogênio utilizada no meio de cultura (sulfato de amônio) pode influenciar indiretamente a solubilização do P presente na rocha fosfática. Quando ocorre a assimilação de nitrogênio na forma de amônio (NH_4^+) nas células bacterianas, prótons são liberados. Com a liberação de prótons, ocorre a diminuição do pH extracelular, solubilizando indiretamente o P ligado ao Ca (ILLMER; SCHINNER, 1992).

As estirpes produziram fosfatases ácida e alcalina, sendo que as estirpes *Azotobacter* sp. AZTBR119, *Pseudomonas* PSBR19 e *Rhizobium* sp. RIZBR01 produziram mais fosfatases comparando-as com as estirpes pertencentes ao gênero *Bacillus* (BACBR04 e BACBR06). As raízes das plantas podem produzir fosfatases ácidas (importantes em solos ácidos), porém não produzem fosfatases alcalinas (importantes em solos neutros e alcalinos), sugerindo que a produção de fosfatases alcalinas pelas estirpes apresenta potencial na mineralização de P (CRIQUET et al., 2004).

As estirpes avaliadas demonstraram a capacidade de sintetizar compostos indólicos na presença do precursor L-triptofano. A concentração de compostos indólicos variou entre as diferentes estirpes entre 255,02 e 340,16 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em trabalhos similares, Beneduzi et al. (2013), em diferentes gêneros de bactérias promotoras do crescimento vegetal, também

relataram a produção de diferentes quantidades de compostos indólicos, variando entre 0,16-160,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A produção de Ácido Indol Acético (AIA) por bactérias promotoras de crescimento pode variar entre espécies e estirpes, sendo influenciada por condições no meio de cultura, fase de desenvolvimento da bactéria e disponibilidade do substrato no meio de cultura (MIRZA et al 2001).

A produção de Indóis, entre eles o AIA, nos isolados utilizados no inoculante pode favorecer o crescimento da cana-de-açúcar. A produção de AIA por bactérias em concentrações ideais estimula a formação de pelos radiculares e aumenta o número e o comprimento das raízes laterais e primárias (DUCA et al., 2014). Tem sido relatado que a inoculação de bactérias produtoras de AIA exerce efeitos benéficos sobre o crescimento das plantas em diversas culturas (PASTOR et al., 2014; GUMIERE et al., 2014). Porém, concentrações elevadas de AIA podem inibir o crescimento das raízes, diminuindo a produtividade da planta (XIE; PASTERNAK; GLICK, 1996).

4.3.3 Efeito da inoculação de bactérias mobilizadoras de fosforo sobre plantas de cana-de-açúcar

Em geral, com o uso das diferentes fontes de P no experimento, a aplicação dos inoculantes aumentou o acúmulo de P na parte aérea da planta (figura 4.3). Em média, o inoculante 1 aumentou o P em 6,40 % (73,13 mg Vaso⁻¹) e o inoculante 2 em 16,01 % (79,74 mg Vaso⁻¹), em relação aos tratamentos não inoculados (68,73 mg Vaso⁻¹). Diferentes autores relatam aumentos no rendimento de diversas culturas devido à inoculação de bactérias promotoras do crescimento vegetal que apresentam potencial para mobilizar P dos gêneros *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium* (ADESEMOYE; OBINI; UGOJI, 2008; KUMAR; BEHL; NARULA, 2001; AFZAL; BANO 2008).

Figura 4.3 - Acúmulo de Fósforo na parte aérea de plantas de cana-de-açúcar, variedade RB 85-5453, coletadas 75 dias após o plantio. Inoculante 1: *Pseudomonas* sp. PSBR10, *Azotobacter* sp. AZTBR19, *Rhizobium* sp. RIZBR01; Inoculante 2: *Bacillus simplex* BACBR04, *Bacillus* sp. BACBR06, *Rhizobium* sp. RIZBR01. SPT: Super fosfato triplo. Letras iguais maiúsculas para fontes de P não diferem entre si pelo teste Tukey a 10% de probabilidade. * Indica diferença significativa em relação ao tratamento sem inoculante

Analisando o efeito das diferentes fontes de P sem aplicar os inoculantes foi observado que nos tratamentos que foram adubados com composto e rocha fosfática o acúmulo de P na parte aérea foi inferior em relação aos tratamentos com rocha + composto, SPT, SPT + composto como fonte de P (figura 4.3). Com a aplicação de 50% da dose com composto foi possível igualar o acúmulo de P apresentado no tratamento que recebeu 100 % da adubação fosfatada na forma de SPT. A aplicação de composto melhora as propriedades físicas, químicas e biológicas, principalmente através do aumento da disponibilidade de nutrientes nas frações orgânicas do solo (LARCHEVEQUE et al., 2006).

Com a aplicação dos inoculantes o acúmulo de P na parte aérea usando composto foi aprimorada, principalmente com o uso do inoculante 2, obtendo aumentos de 53,90 % (35,5 mg Vaso⁻¹) e de 27,45 % (18,09 mg Vaso⁻¹) em relação aos tratamentos que não receberam inoculante e que receberam como fonte de P composto e SPT, respectivamente. Este efeito

também foi observado na concentração de P na parte aérea (Tabela 4.9). Este resultado é um indicativo do aumento da disponibilidade de P para as plantas, pela ação direta ou indireta das estirpes usadas no inoculante. As estirpes utilizadas no inoculante 2 podem aumentar a nutrição fosfatada solubilizando Pi ou mineralizando Po, além de poder aumentar a eficiência de assimilação na planta produzindo fito-hormônios como compostos indólicos (tabela 4.7). O aumento na absorção de P devido à inoculação das estirpes *Bacillus simplex* BACBR04, *Bacillus* sp. BACBR06, *Rhizobium* sp. RIZBR01 pode ser devido à mineralização de P por meio da liberação de FAlc e FAc, no tratamento em que foi utilizado o inoculante 2 com composto e que apresentou maiores quantidades de FAc e FAlc no solo comparado com os tratamentos que não receberam inoculante (figura 4.5).

O acúmulo de N e K na parte aérea das plantas de cana-de-açúcar com a aplicação do inoculante 2 aumentou em 28,91 % (126,91 mg de N vaso⁻¹) e em 49,12 % (426,32 mg de K vaso⁻¹) em relação ao tratamento não inoculado. Independentemente da aplicação do inoculante 1 ter apresentado tendência de incrementos em relação ao tratamento sem inoculante no acúmulo de nutrientes (P, N e K), a diferença não foi significativa (Tabela 4.8). Resultados similares foram encontrados por Billah e Bano (2015), artigo em que os autores observaram que a inoculação de uma estirpe de *Pseudomonas* sp. junto com a aplicação de composto enriquecido com rocha fosfática como fonte de P igualou a produtividade e o acúmulo de P, comparado com o tratamento mineral (superfosfato simples como fonte de P). Já em estudos realizados por Kaur e Reddy (2014) estes observaram que a inoculação das bactérias solubilizadoras de P: *Pantoea cypripedi* e *Pseudomonas plecoglossicida* aumentou significativamente a produção de grãos e o acúmulo de P nos grãos, parte aérea e raiz das culturas de milho e trigo. Os experimentos foram conduzidos durante dois anos a campo.

Tabela 4.8 - Acúmulo de nitrogênio e Potássio na parte aérea de plantas de cana-de-açúcar, variedade RB 85-5453, coletadas 75 dias após o plantio. Inoculante 1: *Pseudomonas* sp. PSBR10, *Azotobacter* sp. AZTBR19, *Rhizobium* sp. RIZBR01; Inoculante 2: *Bacillus simplex* BACBR04, *Bacillus* sp. BACBR06, *Rhizobium* sp. RIZBR01. *SPT: Super fosfato triplo. Letras iguais maiúsculas para fontes de P e minúsculas para inoculantes não diferem entre si pelo teste Tukey a 10% de probabilidade

Tratamento	Sem inoculante	Inoculante 1	Inoculante 2
Acúmulo de N (mg vaso⁻¹)			
Sem P	212,91 Ba	117,57 Bb	148,57 Cb
Composto	438,86 Ab	472,46 Ab	565,77 Aa
Rocha	420,25 Aa	461,82 Aa	426,41 Ba
Rocha+Composto	501,57 Aa	436,90 Aab	393,57 Bb
SPT*	490,16 Aa	549,69 Aa	501,31 Aba
SPT+Composto	537,78 Aa	536,44 Aa	493,53 Aba
Média	433,59 a	429,15 a	421,53 a
Acúmulo de K (mg vaso⁻¹)			
Sem P	338,11 Ca	184,33 Cb	213,83 Cb
Composto	867,85 Ab	1051,14 Aab	1294,17 Aa
Rocha	773,10 Ba	821,20 Ba	819,90 Ba
Rocha+Composto	943,65 Aba	877,37 ABab	714,80 Bb
SPT	763,75 Bb	1033,93 Aba	953,25 Ba
SPT+Composto	983,75 Aa	1058,60 Aa	960,60 Ba
Média	778,37 a	837,76 a	826,09 a

A aplicação do inoculante 2 nos tratamentos que receberam SPT como fonte de P aumentou o acúmulo de P na parte aérea de 29,05 % (24 mg vaso⁻¹) em relação ao tratamento que não recebeu inoculação. Quanto ao acúmulo de K, a aplicação do inoculante 2 aumentou em 24,81 % (189,50 mg Vaso⁻¹) em relação ao tratamento sem inoculante. Com a aplicação de SPT se garante que o P aplicado estará prontamente disponível para a planta, entretanto grande parte do P aplicado torna-se indisponível para a planta, visto que o P pode se ligar a óxidos de Fe e Al por reações de adsorção superficial e precipitação, reduzindo sua disponibilidade para a planta. A diminuição do pH na solubilização de PO₄³⁻ (tabela 4.7) indica que o possível mecanismo de solubilização é a liberação de ácidos orgânicos pelas estirpes utilizadas no inoculante 2 que podem mobilizar o P através da competição pelos sítios de absorção do P no solo, com os fosfatos adsorvidos na superfície de óxidos de ferro e alumínio (TROLOVE et al., 2003).

A concentração de P na parte aérea sempre foi maior quando foi aplicado tanto o inoculante 1 como o 2. Entretanto, as diferenças no acúmulo de massa seca não foram

significativas entre os tratamentos inoculados e o tratamento sem inoculação aos 75 DAP (Tabela 4.9). Aos 40 DAP observaram-se aparentes aumentos na altura e perfilhamento das plantas inoculadas em relação às não inoculadas, porém não foram significativos (Figura 4.4).

Tabela 4.9 - Acúmulo de massa seca e concentração foliar de P da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar, variedade RB 85-5453, coletadas 75 dias após o plantio. Inoculante 1: *Pseudomonas* sp. PSBR10, *Azotobacter* sp. AZTBR19, *Rhizobium* sp. RIZBR01; Inoculante 2: *Bacillus simplex* BACBR04, *Bacillus* sp. BACBR06, *Rhizobium* sp. RIZBR01. *SPT: Super fosfato triplo. Letras iguais maiúsculas para fontes de P e minúsculas para Inoculante não diferem entre si pelo teste Tukey a 10% de probabilidade

Tratamento	Sem inoculante	Inoculante 1	Inoculante 2
Biomassa parte aérea			
	g Vaso⁻¹		
Sem P	16,17 Ca	10,93 Bb	14,4 Cab
Composto	40,25 ABa	43,87 Aa	46,1 Aa
Rocha	37,43 Baa	43,67 Aa	41,8 ABa
Rocha+Composto	46,73 ABa	41,20 Aa	36,27 Ba
SPT*	47,98 ABa	49,17 Aa	49,15 Aa
SPT+Composto	49,80 Aa	44,92 Aa	48,62 Aa
Média	39,72 a	38,96 a	39,39 a
Concentração de P			
	g kg⁻¹		
Sem P	1,18 Ba	1,24 Ca	1,39 Ba
Composto	1,68 Ab	1,92 ABa	2,20 Aa
Rocha	1,85 Aab	1,66 Bb	1,93 Aa
Rocha+Composto	1,82 Aa	2,00 ABa	2,23 Aa
SPT	1,74 Ab	2,16 Aa	2,20 Aa
SPT+Composto	1,84 Aa	1,94 ABa	1,99 Aa
Média	1,69 b	1,82 ab	1,99 a

Figura 4.4 - Efeito do inoculante 2 sobre plantas de cana-de-açúcar da variedade IR42 40 dias após o plantio. Inoculante 2: *Bacillus simplex* BACBR04, *Bacillus* sp. BACBR06, *Rhizobium* sp. RIZBR01. A. Tratamento com composto como fonte de P; B. Tratamento com super fosfato triplo como fonte de P

As concentrações de FAc foram maiores que as de FAlc (figura 4.5). Normalmente as FAc predominam em solos ácidos, enquanto as FAlc são mais abundantes em solos neutros e alcalinos (EIVAZI; TABATABAI, 1977). O pH do solo no experimento foi inferior a 5,5 (ANEXO C) o que explicaria a maior produção de Fac. O experimento foi conduzido em vasos, o que aumenta o efeito das raízes sobre o solo. As Fac podem ser produzidas tanto pelas plantas como pelos micro-organismos (CRIQUET et al., 2004). É difícil diferenciar as Fac produzidas pela raiz e pelas bactérias, entretanto estudos prévios indicam que as fosfatases de origem microbiana possuem uma maior afinidade por composto orgânicos que contém P do que as produzidas pelas raízes das plantas (TARAFDAR; YADAV; MEENA, 2001). Independentemente do uso do inoculante, quando não foi realizada a adubação fosfatada, a produção de fosfatases é associada com a quantidade de P disponível no solo; em condições de falta de P são produzidas maiores quantidades de fosfatases (TRASAR-CEPEDA; LEIRÓS; GIL-SOTRES, 2008).

Figura 4.5 - Atividade das fosfatases alcalina (A) e ácida (B), no solo após a colheita das plantas de cana-de-açúcar. Média de 4 repetições. * difere do tratamento sem inoculante pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

4.3.4 Efeito da inoculação de bactérias mobilizadoras de P sobre as comunidades bacterianas presentes no solo

O resultado da análise de coordenadas principais (*PCoA*) mostra que a aplicação dos inoculantes 1 e 2 modificou a estrutura das comunidades bacterianas (beta diversidade)

quando se comparam as diferentes fontes de P avaliadas no experimento e quando comparando os tratamentos com e sem inoculante. Entretanto, a estrutura das comunidades bacterianas quando aplicados os inoculantes 1 e 2 foi similar, indicando que o efeito dos inoculantes sobre as comunidades do solo foi similar (figura 4.6).

Os tratamentos que receberam composto e SPT como fonte de P e a aplicação dos inoculantes apresentaram maior eficiência na acumulação de nutrientes, o que pode estar relacionado às mudanças na estrutura da comunidade pela introdução de bactérias originalmente isoladas da rizosfera. Principalmente nos tratamentos com composto e com inoculante a diferença foi mais marcante nas comunidades bacterianas em relação ao tratamento não inoculado. Estudos recentes mostraram que o microbioma associado às plantas influencia algumas características da planta, como resistência a doenças, crescimento, nutrição e tolerância ao estresse abiótico (MENDES et al., 2011; SUGIYAMA et al., 2013; PANKE-BUISSE et al., 2015; BONILLA et al., 2015).

Entretanto, o mecanismo de como ocorrem as mudanças das comunidades pelo uso do inoculante é desconhecido. Especula-se que seja por sua capacidade de mobilizar fósforo, o que permite que se estabeleçam na rizosfera, influenciando o estabelecimento ou/e a inibição de outras bactérias. Quer seja por sua capacidade de disponibilizar P diretamente para a planta ou indiretamente pelo “turnover” (retorno do P imobilizado na biomassa) do P presente na biomassa (RICHARDSON; SIMPSON, 2011), liberando gradualmente o P para a planta, aumentando a eficiência no uso do fósforo fornecido pelos fertilizantes minerais e orgânicos.

As fontes de fósforo modificaram as comunidades bacterianas, os tratamentos que não receberam composto tenderam a se agrupar, mostrando que a adição de composto modifica a estrutura das comunidades. A adição de matéria orgânica ao solo afeta tanto as propriedades físico-químicas quanto fatores bióticos relacionados à microbiota do solo, como a biomassa microbiana e a diversidade, estrutura da comunidade e atividade do solo (WALLIS et al., 2010). Como foi previamente demonstrado (Descrito no na figura 3.9 do item 3) o composto naturalmente apresenta uma elevada abundância bacteriana (10^{10} UFC g⁻¹) e esta é inoculada ao solo com a adição de composto. Provavelmente o efeito destas bactérias “inoculadas” e as propriedades que conferem à matéria orgânica no composto mudaram a estrutura da comunidade.

Os tratamentos que não receberam adubação fosfatada apresentaram uma estrutura bacteriana diferente em relação aos outros tratamentos. A diminuição na disponibilidade de P aumenta a liberação de ânions orgânicos acompanhados de prótons, resultando na acidificação da rizosfera (RICHARDSON et al., 2009). Como o experimento foi instalado em vasos,

aumentando o efeito da rizosfera, isto explica o menor pH do solo comparado com os tratamentos que receberam fontes de P (ANEXO C). O pH pode ter sido o fator que influenciou a mudança na estrutura das comunidades bacterianas do solo (ROUSK et al., 2010). Bigaton (2014) demonstrou que um dos fatores que mais modula a estrutura bacteriana do solo em cana-de-açúcar é o pH.

Figura 4.6 - Análise de coordenadas principais (*PCoA*) para os grupos formados com base na análise de sequenciamento para comunidades de bactérias totais (gene 16S rDNA) comparando o tratamento sem inoculante com os tratamentos em que foram usados os inoculantes 1 e 2

A α -diversidade (obtida a partir do índice PD_whole_tree) foi maior nos tratamentos que receberam composto como fonte de P e não receberam inoculante (figura 4.7). Hartmann et al.

(2014) observaram aumento na α -diversidade e mudanças na β -diversidade quando foi aplicada matéria orgânica na forma de composto, em comparação com o tratamento mineral. Contudo, as diferenças na α -diversidade não são significativas entre as diferentes fontes de P, quando são aplicados os inoculantes. Quando foram aplicados os inoculantes a α -diversidade diminuiu devido à redução significativa do número de UTOs observadas (indicativo do número de espécies) (Anexo D). O número de UTOs diminuiu em comparação com os tratamentos que não receberam o inoculante, em 2430 e 2356 UTOs após a adição do inoculante 1 e 2, respectivamente. Provavelmente este fenômeno ocorreu pelas interações ecológicas entre os isolados inoculados e as bactérias nativas, resultando na inibição de algumas espécies de bactérias presentes no solo.

Figura 4.7 - Estimativa da α diversidade no solo 75 dias após o plantio. Média de 4 repetições. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * indica diferença significativa em relação ao tratamento sem inoculante

A análise conjunta dos dados da filiação taxonômica das sequências 16S rRNA de bactérias mostrou que, em média, menos de 1 % das sequências não puderam ser classificadas em filos (bactérias não classificadas), enquanto o restante foi afiliado aos filos Proteobacteria (27,94 %), Acidobacteria (24,35 %), Actinobacteria (15,52 %), Verrucomicrobia (5,92 %), Chloroflexi (4,82 %), Bacteroidetes (4,64 %), Planctomycetes

(4,14%), Gemmatimonadetes (4,8%), Firmicutes (3,78%), além de outros 56 filos, representando 0,87 % (Figura 4.8).

Figura 4.8 - Dinâmica da estrutura bacteriana (nível de filo) no solo com os diferentes tratamentos. T1: Sem P; T2: Composto; T3: Rocha fosfática de Araxá; T4: Composto + Rocha fosfática de Araxá; T5: Super fosfato triplo; T6: Super fosfato triplo + Composto

Observando mais detalhadamente a afiliação das sequências a nível taxonômico de classe foram observadas: Alphaproteobacteria (16,44 %), Deltaproteobacteria (3,95 %), Gammaproteobacteria (3,26 %) e Betaproteobacteria (2,32 %), para o filo Proteobacteria; Acidobacteria (7,54 %), Solibacteres (5,85 %), Acidobacteria Gp 6 (5,23 %), e Chloracidobacteria (2,59 %) para o filo Acidobacteria; Thermoleophilia (9,28 %) e Actinobacteria (5,60 %) para o filo Actinobacteria.

Resultados similares foram encontrados por Bigaton (2014) em solos coletados em diferentes regiões no estado de São Paulo, encontrando os mesmos filos abundantes, porém o autor utilizou a plataforma Ion Torrent. Dini-Andreote et al. (2010), utilizando a técnica de sequenciamento de biblioteca de clones encontrou os mesmos filos abundantes. Trabalhos realizados com outros solos indicam que estes filos bacterianos são os mais abundantes na maioria dos casos, o que confere robustez aos dados aqui obtidos (KURAMAE et al., 2012; ROESCH et al., 2007).

4.4 Conclusões

A aplicação dos inoculantes aumentou o acúmulo de P na parte aérea com as diferentes fontes de P avaliadas no trabalho, não obstante os efeitos do inoculante 2 (*Bacillus simplex*

BACBR04, *Bacillus* sp. BACBR06, *Rhizobium* sp.) terem sido mais significativos. O inoculante 2 aumentou a eficiência de assimilação do P utilizando diferentes fontes de P. Com a aplicação do composto como fonte de P o inoculante 2 apresenta potencial biotecnológico para melhorar o aproveitamento do P, além de aumentar o acúmulo de N e K. Este é o primeiro estudo sobre o efeito da inoculação de bactérias mobilizadoras de P utilizando diferentes fontes de P sobre o desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar e sobre as comunidades bacterianas no solo. O estudo demonstrou que o composto ou o composto suplementado com SPT podem ser uma alternativa para melhorar a nutrição fosfatada.

Nos tratamentos que tiveram efeitos significativos no acúmulo de P na parte aérea, foram observadas mudanças na estrutura da comunidade bacteriana, em relação aos tratamentos não inoculados. Apesar de não elucidar o efeito do inoculante na comunidade bacteriana do solo, parece provável que mudanças na estrutura e riqueza afetam o aumento da eficiência da fertilização fosfatada.

Em suma, o inoculante 2 oferece uma excelente oportunidade para desenvolver um biofertilizante mais favorável ao meio ambiente e que pode ser usado como suplemento e / ou servir como alternativa para fertilizantes minerais com aplicação de composto.

Referências

- ADESEMOYE, A.O.; OBINI, M.; UGOJI, E.O. Comparison of plant growth promotion with *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in three vegetables. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 39, p. 423–426, 2008.
- AFZAL, A.; BANO, A. *Rhizobium* and phosphate solubilizing bacteria improve the yield and phosphorus uptake in wheat (*Triticum aestivum* L.). **International Journal of Agriculture and Biology**, Faisalabad, v. 10, p. 85–88, 2008.
- BENEDUZI, A.; MOREIRA, F.; COSTA, P.B.; VARGAS, L.K.; LISBOA, B.B.; FAVRETO, R. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 63, p. 94–104, 2013.
- BIGATON, A. **Diversidade de bactérias e arqueias em solos cultivados com cana-de-açúcar: um enfoque biogeográfico**. 2014. 92 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.
- BILLAH, M.; BANO, A. Role of plant growth promoting rhizobacteria in modulating the efficiency of poultry litter composting with rock phosphate and its effect on growth and yield of wheat. **Waste Management & Research**, London, v. 33, n.1, p. 63-72, 2015.

- BONILLA, N.; VIDA, C.; MARTÍNEZ-ALONSO, M.; LANDA, B.B.; GAJU, N.; CAZORLA, F.M.; DE VICENTE, A. Organic amendments to avocado crops induce suppressiveness and influence the composition and activity of soil microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 81, n.10, p. 3405-3418, 2015.
- BRANQUINHO, R.; MEIRINHOS-SOARES, L.; CARRICO, J.A.; PINTADO, M.; PEIXE, L.V. Phylogenetic and clonality analysis of *Bacillus pumilus* isolates uncovered a highly heterogeneous population of different closely related species and clones. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 90, n.3, p. 689–698, 2014.
- COLE, J.R.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; WANG, Q.; KULAM-SYED-MOHIDDEN, A.S.; MACGARREL, D.M.; BANDELA, A.M.; CARDENAS, E.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. The ribosomal database project (RDP-II): introducing my RDP space and quality controlled public data. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 35, p. 169-172, 2007.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana de-açúcar**. Brasília, 2015. p. 1-14.
- CRICQUET, S.; FERRE, E.; FARNER, E.M.; LE PETIT, J. Annual dynamics of phosphatase activities in an evergreen oak litter – influence of biotic and abiotic factors. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 1111–1118, 2004.
- DENG, S.; HIRUKI, D. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 14, p. 53–61, 1991.
- DINI-ANDREOTE, F.; ANDREOTE, F.D.; COSTA, R.; TAKETANI, R.G.; ELSAS, J.D.; ARAÚJO, W.L. Bacterial soil community in a Brazilian sugarcane field. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 336, n. 1/2, p. 337–349, 2010.
- DUCA, D.; LORV, J.; PATTEN, C.L.; ROSE, D.; GLICK, B.R. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 106, p. 85–125, 2014.
- EIVAZI, F.; TABATABAI, M.A. Phosphatases in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 9, p. 167–172, 1977.
- 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.
- GORDON, S.A.; WEBER, P.R. Colorimetric estimation of indol acetic acid. **Plant Physiology**, Berlin, v.26, p.192-195, 1950.
- GREENGENES, **16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB, 2012**. Disponível em: <http://greengenes.lbl.gov/Download/Sequence_Data/Fasta_data_files/>. Acesso em: 20 jan. 2014.
- GUMIERE, T.; RIBEIRO, C.M.; VASCONCELLOS, R.L.; CARDOSO, E.J. Indole-3-acetic acid producing root-associated bacteria on growth of Brazil pine (*Araucaria angustifolia*) and slash pine (*Pinus elliottii*). **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 105, p. 663–669, 2014.
- HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological statistical software package for education and data analysis. **Paleontological Electronica**, Boulder, v. 4, p. 1-9, 2001.

HARTMANN, M.; FREY, B.; MAYER, J.; MÄDER, P.; WIDMER, F. Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. **The ISME Journal**, New York, v. 9, p. 1177-1194, 2014.

HILARIO, E.; BUCKLEY, T.; YOUNG, J. Improved resolution on the phylogenetic relationships among *Pseudomonas* by the combined analysis of *atpD*, *carA*, *recA* and 16S rDNA. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 86, p. 51–64, 2004.

ILLMER, P.; SCHINNER, F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 24, p. 389–395, 1992.

JEONG, C.Y.; WEINDORF, D.C.; DERAMUS, A.; GOODEAUX, L.L. Surface and subsurface phosphorus losses from sugarcane fields with different management practices. **Water, Air, & Soil Pollution**, Dordrecht, v. 217, n.1/4, p. 649-661, 2011.

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

KENNEDY, C.; RUDNICK, P.; MACDONALD, T.; MELTON, T. Genus *Azotobacter*, p. 384-401. In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T.; GARRITY, G.M (Ed.). 2nd ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology – The Proteobacteria**, New York, v. 2, pt B, p. 323–379, 2005.

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

KUMAR, V.; BEHL, R.K.; NARULA, N. Establishment of phosphate- solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under greenhouse conditions. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 156, p. 87–93, 2001.

KURAMAE, E.E.; YERGEAU, E.; WONG, L.C.; PIJL, A.S.; VAN VEEN, J.A.; KOWALCHUK, G.A. Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 79, n.1, , p. 12–24, 2012.

KUYKENDALL, L.D.; YOUNG, J.; MARTINEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. Genus I. *Rhizobium*. In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T.; GARRITY, G.M (Ed.). 2nd ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology – The Proteobacteria**, New York, v. 2, pt B, p. 323–379, 2005.

LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics** New York: John Wiley 1991. p. 115-175.

LARCHEVEQUE, M.; BALDY, V.; MONTES, N.; FERNANDEZ, C.; BONIN, G.; BALLINI, C. Short-term effects of sewage-sludge compost on a degraded mediterranean soil. **Soil Science Society of America**, Madison, v. 70, p. 1178-1188, 2006.

LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. **Numerical ecology**. 2nd ed. Amsterdam:Elsevier, 2012. 853p.

LIU, Y.; VILLALBA, G.; AYRES, R.U.; SCHRODER, H. Global phosphorus flows and environmental impacts from a consumption perspective. **Journal of Industrial Ecology**, Cambridge, v. 12, n.2, p. 229-247, 2008.

LOGAN, N.; DE VOS, P. Genus *Bacillus*. In: BERGEY, D.; BOONE, D. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, New York, p. 651-656, 2009.

LOPES, C.M. **Caracterização química de subprodutos da indústria sucroenergética enriquecidos com fontes minerais e orgânicas submetidos à compostagem**. 2014. 80p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 63, p. 541-556, 2009.

MAHADEVAIAH, M.S.; KUMAR, Y.; GALIL, M.S.A.; SURESHA, M.S.; SATHISH, M.A.; NAGENDRAPPA, G. A simple spectrophotometric determination of phosphate in sugarcane juices, water and detergent samples. **Journal of Chemistry**, Adirampattinam, v. 4, p. 467-473, 2007.

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

MARRA, L.M.; SOARES, C.R.F.S.; OLIVEIRA, S.M.; FERREIRA, P.A.A.; SOARES, B.L.; CARVALHO, R.F.; LIMA, J.M.; MOREIRA, F.M.S. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 357, p. 289-307, 2012.

MELCHOR, G.H.; GARCÍA, S.S.; LOPEZ, D.J.P.; ESPINOZA, L.D.C.L.; ROSADO, O.R. Vinasse and filter cake compost as nutrient source for sugarcane in a molic gleysol of chiapas, México. **Interciencia**, Caracas, v. 33, n.11, p. 855-860, 2008.

MENDES, R.; KRUIJT, M.; DE BRUIJN, I.; DEKKERS, E.; VAN DER VOORT, M.; SCHNEIDER, J.H.M.. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. **Science**, Moulton, v. 332, p. 1097-1100, 2011.

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.

OWEN, D.; WILLIAMS, A.P.; GRIFFITH, G.W.; WITHERS, P.J.A. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorous acquisition. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 86, p. 41-54, 2015.

OWEN, D.; WILLIAMS, A.P.; GRIFFITH, G.W.; WITHERS, P.J.A. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorous acquisition. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 86, p. 41-54, 2014.

ÖZEN, A.I.; USSERY, D.W. Defining the *Pseudomonas* genus: where do we draw the line with *Azotobacter*? **Microbial Ecology**, Oxford, v. 63, p. 239-248, 2012.

PALLERONI, N.J. Genus I. *Pseudomonas migula* 1894, 237AL. In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T.; GARRITY, G.M (Ed.). 2nd ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology – The Proteobacteria**, New York, v. 2, pt B, p. 323-379, 2005.

PANKE-BUISSSE, K.; POOLE, A.C.; GOODRICH, J.K.; LEY, R.E.; KAO-KNIFFIN, J. Selection on soil microbiomes reveals reproducible impacts on plant function. **The ISME Journal**, New York, v. 9, p. 980 – 989, 2015.

PARK, K.H.; LEE, C.Y.; SON, H.J. Mechanism of insoluble phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities. **Letters in Applied Microbiology**, Malden, v. 49, p. 222-228, 2009.

PASTOR, N.; ROSAS, S.; LUNA, V.; ROVERA, M. Inoculation with *Pseudomonas putida* PCI2, a phosphate solubilizing rhizobacterium, stimulates the growth of tomato plants. **Symbiosis**, Rehovot, v. 62, n.3, p. 157-167, 2014

PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M.H.; VELÁZQUEZ, E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. **Infection, Genetics and Evolution**, London, v. 9, n.6, p. 1132–1147, 2009.

PUENTE, M.E.; LI, C.Y.; BASHAN, Y. Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 66, p. 389–401, 2009.

RAIJ, B. van; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Editora IAC, 2001. 285p.

REDIERS, H.; VANDERLEYDEN, J.; DE MOT, R. *Azotobacter vinelandii*: a *Pseudomonas* in disguise? **Microbiology**, Reading, v. 150, p. 1117–1119, 2004.

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.

RICHARDSON, A.E.; SIMPSON, R.J. Soil microorganisms mediating phosphorus availability. **Plant Physiology**, Berlin, v. 156, p. 989–996, 2011.

ROESCH, L.F.W.; FULTHORPE, R.R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, .K.M.; KENT, A.D.; DAROUB, S.H.; CAMARGO, F.A.O.; FARMERIE, W.G.; TRIPLETT, W. Pyrosequence enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME Journal**, New York, v. 1, p. 283-290, 2007.

ROJAS-TAPIAS, D.; MORENO-GALVÁN, A.; PARDO-DÍAZ, S.; OBANDO, M.; RIVERA, D.; BONILLA, R. Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 61, p. 264–272, 2012.

ROUSK, J.; BÅÅTH, E.; BROOKES, P.C.; LAUBER, C.L.; LOZUPONE, C.; CAPORASO, J.G.; FIERER, N. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. **The ISME Journal**, New York, v. 4, n.10, p. 1340-1351, 2010.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 99p.

SHOWLER, A. Effects of compost and chicken litter on soil nutrition, and sugarcane physiochemistry, yield, and injury caused by Mexican rice borer, *Eoreuma loftini* (Dyar) (Lepidoptera: Crambidae). **Crop Protection**, Oxon, v. 71, p. 1-11, 2015.

SPENCER, J.F.T.; RAGOUT, A.L. **Food microbiology protocols**. , Totowa;Humana Press, 2001. 494p.

SUGIYAMA, A.; BAKKER, M.G.; BADRI, D.V.; MANTER, D.K.; VIVANCO, J.M. Relationships between Arabidopsis genotype-specific biomass accumulation and associated soil microbial communities. **Botany-Botanique**, Canadá, v. 91, p. 123-126, 2013.

SUNDARA-RAO, W.; SINHA, M. Phosphate dissolving microorganisms is the soil and Rhizosphere. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, New Delhi, p. 272-278, 1963.

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**, Berlin, v. 164, p. 279–282, 2001.

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

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TRASAR-CEPEDA, C.; LEIRÓS, M.C.; GIL-SOTRES, F. Hydrolytic enzyme activities in agricultural and forest soils: Some implications for their use as indicators of soil quality. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 2146–2155, 2008.

TROLOVE, S.N.; HEDLEY, M.J.; KIRK, G.J.D.; BOLAN, N.S.; LOGANATHAN, P. Progress in selected areas of rhizosphere research on P acquisition. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v. 41, p. 471–499, 2003.

VEITH, R.; KOMOR, E. Regulation of growth, sucrose storage and ion content in sugarcane cells, measured with suspension cells in continuous culture grown under nitrogen, phosphorus or carbon limitation. **Journal of plant physiology**, Stuttgart, v. 142, n.4, p. 414-424, 1993.

WALLIS, P.D.; HAYNES, R.J.; HUNTER, C.H.; MORRIS, C.D. Effect of land use and management on soil bacterial biodiversity as measured by PCR-DGGE. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 46, p. 147-150, 2010.

XIE, H.; PASTERNAK, J.J.; GLICK, B.R. Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indoleacetic acid. **Current Microbiology**, New York, v. 32, p. 67–71, 1996.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A demanda global crescente por alimentos, fibras e bioenergia requer o uso eficiente de recursos não renováveis, e representa um desafio crucial para a indústria agrícola, cientistas e líderes políticos. Por consequência, nas últimas décadas, aumentou-se o interesse por desenvolver uma agricultura que vise à diminuição dos insumos agrícolas, e, como resposta a esta demanda, nos últimos anos se observa um crescimento das pesquisas e da utilização de inoculantes comerciais biológicos (bactérias e/ou fungos) visando o aumento da mobilização dos principais nutrientes, especialmente P, aumentando sua disponibilidade para as plantas cultivadas.

A indústria sucroenergética gera grandes quantidades de resíduos orgânicos sólidos como palha, torta de filtro e cinzas. A deposição inadequada desses materiais pode produzir impactos indesejáveis no ambiente e na saúde. Por outro lado, o composto gerado a partir da torta de filtro e cinzas é de interesse para o setor agrícola, por seus efeitos benéficos nas propriedades físicas e químicas do solo, além da disponibilização progressiva de nutrientes essenciais como o P. Existe uma crescente demanda em compreender e aprimorar o processo da compostagem nas indústrias sucroenergéticas afim de aumentar seu potencial biotecnológico e tornar o composto uma alternativa de manejo, que permita aumentar a produtividade e diminuir a aplicação de fertilizantes fosfatados minerais.

A partir de nossos resultados foi possível constatar que o uso de bactérias mobilizadoras de P durante a compostagem de resíduos da indústria sucroenergética aumenta a solubilização da rocha fosfática aplicada, aumentando o potencial do composto como alternativa ao manejo do P na cultura. Além disso, foram desvendadas as sucessões bacterianas que ocorrem durante o processo e quais fatores ambientais influenciam estas mudanças. Entender como se comportam as comunidades bacterianas permitirá dar um manejo mais adequado à compostagem, modulando as comunidades bacterianas em cada fase da compostagem e com isto aumentando a eficiência do processo. Trabalhos futuros podem ser conduzidos com o objetivo de isolar e inocular bactérias eficientes na biodegradação que sejam competentes em cada uma das fases da compostagem. Também é importante avaliar se realmente é indispensável a aplicação da estirpe pertencente ao gênero *Pseudomonas*, devido à pouca expressão da ordem Pseudomonadales durante a compostagem.

Os resultados obtidos na inoculação da cana-de-açúcar com bactérias mobilizadoras de P mostram o grande potencial da aplicação desta tecnologia, aumentando expressivamente a assimilação de P, além de outros nutrientes como o N e K tanto com fontes de P orgânica

quanto mineral. Foi demonstrado que a inoculação modifica as comunidades bacterianas do solo e que a alfa diversidade diminui. Entender como são impactadas as comunidades de bactéria nativas do solo, quando inoculantes mobilizadores de P são aplicados, permitirá dar um manejo mais adequado à cultura visando favorecer os micro-organismos exógenos aplicados no inoculante. São necessários experimentos à campo para validar os resultados obtidos e observar se os efeitos do inoculante são persistentes no ciclo da cultura da cana-de-açúcar. Para entender melhor o efeito do inoculante sobre as comunidades bacterianas do solo é necessário monitorar seu estabelecimento no solo e na rizosfera, para atender tal objetivo, *primers* específicos para as estirpes em questão devem ser sintetizados, permitindo sua quantificação por meio da técnica de q-PCR.

ANEXOS

ANEXO A - Análise de coordenadas principais (*PCoA*) para os grupos formados com base na análise de TRFLP para comunidades de bactérias totais (gene 16S rDNA) aos 0 dia, 15 dias, 30 dias, 45 dias e 60 dias de compostagem

ANEXO B - Estimativa da α diversidade durante a compostagem. Média de 3 repetições. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

ANEXO C - Caracterização química do solo após a colheita da cana-de-açúcar. Média de 4 repetições.

Tratamento	Sem inoculante	Inoculante 1	Inoculante 2
P			
mg dm-3			
Sem P	9,00 ± 1,41	7 ± 0,82	9,00 ± 0,82
Composto	42,50 ± 3,32	43,50 ± 5,07	40,75 ± 4,99
Rocha	32,50 ± 4,51	31,50 ± 2,38	32,25 ± 4,65
Rocha+Composto	37 ± 2,16	33,50 ± 2,08	36,5 ± 1,72
SPT	64,25 ± 3,30	62,25 ± 2,06	64,50 ± 3,70
SPT+Composto	48,33 ± 2,05	53,25 ± 2,06	53,75 ± 2,62
Média	38,93	38,5	
K			
mmolc dm-3			
Sem P	4,08 ± 0,64	4,05 ± 0,30	4,33 ± 0,46
Composto	2,58 ± 0,66	2,30 ± 0,50	1,68 ± 0,43
Rocha	2,04 ± 0,47	1,55 ± 0,21	2,25 ± 0,99
Rocha+Composto	2,18 ± 0,36	2,88 ± 1,36	3,35 ± 0,77
SPT	1,35 ± 0,35	1,33 ± 0,17	1,23 ± 0,19
SPT+Composto	1,88 ± 0,33	2,1 ± 0,41	2,23 ± 0,26
Média	2,51	2,53	2,68

Ca			
mmolc dm-3			
Sem P	34,75 ± 2,87	26,00 ± 2,45	21,50 ± 3,32
Composto	41 ± 0,82	33,75 ± 3,09	30,00 ± 5,23
Rocha	34 ± 1,83	30,25 ± 5,91	17,50 ± 2,65
Rocha+Composto	45,75 ± 1,71	40,00 ± 2,58	21,50 ± 2,38
SPT	38,75 ± 2,22	44,25 ± 1,71	22,75 ± 0,96
SPT+Composto	43 ± 5,35	39,00 ± 7,12	29,25 ± 3,40

pH			
Sem P	4,57 ± 0,15	4,65 ± 0,13	4,63 ± 0,15
Composto	5,55 ± 0,13	5,33 ± 0,09	5,43 ± 0,05
Rocha	4,9 ± 0,08	5,05 ± 0,10	4,8 ± 0,21
Rocha+Composto	5,38 ± 0,05	5,20 ± 0,18	5,08 ± 0,15
SPT	4,98 ± 0,05	5,10 ± 0,08	4,93 ± 0,09
SPT+Composto	5,18 ± 0,05	5,30 ± 0,08	5,18 ± 0,09

ANEXO D - Estimativa do numero de UTOs no solo 75 dias após o plantio. Média de 4 repetições. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * indica diferença significativa em relação ao tratamento sem inoculante