

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

GUSTAVO ANDRÉS IGLESIAS BARRERA

**POTENCIAL DE LIBERAÇÃO DE FOSFATO PELA MICROBIOTA
DO SOLO SUPRIDA COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO**

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2020**

GUSTAVO ANDRÉS IGLESIAS BARRERA

**POTENCIAL DE LIBERAÇÃO DE FOSFATO PELA MICROBIOTA
DO SOLO SUPRIDA COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Magister Scientiae.

Orientador: Maurício Dutra Costa

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

I24p
2020

Iglesias Barrera, Gustavo Andrés, 1993-
Potencial de liberação de fosfato pela microbiota do solo
suprida com diferentes fontes de carbono / Gustavo Andrés
Iglesias Barrera. – Viçosa, MG, 2020.
58 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Maurício Dutra Costa.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Rizosfera. 2. Exsudatos de raízes. 3. Fosfato -
Solubilidade. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 631.43

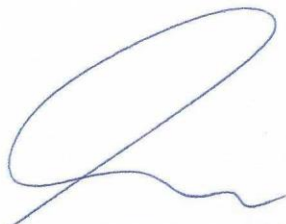
GUSTAVO ANDRÉS IGLESIAS BARRERA

**POTENCIAL DE LIBERAÇÃO DE FOSFATO PELA MICROBIOTA
DO SOLO SUPRIDA COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 21 de fevereiro de 2020.

Assentimento:



Gustavo Andrés Iglesias Barrera
Autor



Maurício Dutra Costa
Orientador

Obrigado à vida por
ter me dado
tanto.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Aos meus pais, pelo amor, confiança e pelo apoio em todas as etapas da vida.

Aos meus irmãos, pelo carinho e pela compreensão.

À Organização de Estados Americanos (OEA), pela oportunidade.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pelo apoio e por proporcionar um ambiente propício para a aprendizagem.

Ao Professor Maurício Dutra Costa, por me acolher, ensinar e apoiar desde o primeiro dia, pela paciência, pelos conselhos, pela dedicação e pela ajuda na pesquisa.

Aos Professores Gilberto de Oliveira Mendes e Marcos Rogério Tótola, pela ajuda na condução do trabalho.

Ao Professor Júlio César Lima Neves, pelas importantes contribuições para o aprimoramento deste trabalho.

Aos Professores do Departamento de Microbiologia, pelo ensino e pela contribuição na minha formação.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, pela assistência e pela dedicação.

Ao Argemiro, Jaqueline, Victor e a todos os colegas do Laboratório de Ecologia Microbiana, pelo apoio e pela ajuda em todo momento.

Aos amigos, pelos lindos momentos que ficarão comigo a vida toda.

Ao Brasil, pela oportunidade de crescer pessoal e profissionalmente.

BIOGRAFIA

Gustavo Andrés Iglesias Barrera, Natural de Temuco, Chile. Filho de Gustavo Eduardo Iglesias Riquelme e Maritza Soledad Barrera Solis, nasceu em 03 de fevereiro de 1993. Formou-se em Agronomia pela Universidade Austral de Chile em 2017. Durante a graduação, em 2014, realizou intercâmbio acadêmico na Universidade Federal do Paraná, em Curitiba, Estado do Paraná. Iniciou o mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Estado de Minas Gerais, em março do ano 2018, concluindo o curso em fevereiro de 2020.

RESUMO

IGLESIAS-BARRERA, Gustavo Andres, Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Potencial de liberação de fosfato pela microbiota do solo suprida com diferentes fontes de carbono.** Orientador: Maurício Dutra Costa.

Com vistas a sustentar a crescente demanda mundial por alimentos, a utilização de grande quantidade de adubos na agricultura tornou-se prática comum do manejo das lavouras. Em cenário de limitada disponibilidade de fontes naturais de P, a ampla utilização de adubos fosfatados na agricultura brasileira tem sido posta em questão em razão da elevada capacidade da maioria dos solos nacionais de adsorver fosfatos na matriz mineral. Nesse contexto, microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) têm sido estudados visando ao desenvolvimento de técnicas biotecnológicas que permitam o aproveitamento agrícola de apatitas pouco reativas, a melhoria da eficiência dos adubos fosfatados e a reversão da forte adsorção de P no solo. Os MSF habitam principalmente a rizosfera, estando sujeitos às flutuações quali-quantitativas das deposições de C radiculares. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi o de estudar o potencial de liberação de fosfato a partir de um Latossolo Vermelho, originário de Patos de Minas, MG, pela microbiota do solo suprida com diferentes fontes de C comumente presentes nos exsudados radiculares. O potencial de disponibilização de P foi avaliado em amostras de solo incubadas em meio NBRIP, a 25 °C por 15 dias, suplementado com 3,99 g L⁻¹ de C na forma de ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos, sendo cada composto testado individualmente ou em combinações específicas. Avaliou-se, também, o número de unidades formadoras de colônias de MSF no solo tratado com os compostos orgânicos que levaram à maior liberação de P. Esses mesmos compostos foram também testados em sistema de stirred-flow para se estimar a liberação de P independente da atividade microbiana. Sete compostos aumentaram significativamente a liberação de P: quatro ácidos orgânicos (ácidos málico, fumárico, aconítico e lático), um açúcar (manose) e dois aminoácidos (ácido aspártico e lisina). O ácido málico levou à maior concentração de P disponível no sobrenadante, correspondendo a 91,56 µg g⁻¹, seguido da manose, com 8,25 µg g⁻¹, e do ácido aspártico, com 7,81 µg g⁻¹. Proporção significativa do P disponibilizado é imobilizado na biomassa microbiana do solo. Os tratamentos com solo suplementado com ácido málico, manose e ácido aspártico apresentaram números de unidades formadoras de colônia (UFC) de MSF significativamente superiores ao controle, sem a adição desses compostos. A maior percentagem de MSF em relação ao número total de UFC no solo foi encontrada nos tratamentos com ácido málico e correspondeu a 89,7 %. No sistema de stirred-flow, o composto

mais eficiente em liberar P do solo foi o ácido málico, com 36,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ ao final de 180 min de fluxo da solução contendo o composto. As combinações dos compostos mais eficientes promoveram níveis de disponibilização de P inferiores àqueles obtidos nos tratamentos com ácido málico sozinho. Conclui-se que alguns compostos típicos da rizosfera, quando adicionados ao solo, podem aumentar a disponibilidade de P. A liberação de P ocorre por mecanismos dependentes e independentes da atividade microbiana. O ácido málico e a manose aumentam as populações de MSF no solo. Parte significativa do P disponibilizados em função da adição de compostos orgânicos ao solo é imobilizada na biomassa microbiana, tornando-se reservatório lábil desse nutriente. Pesquisas futuras deverão ser realizadas para se determinar os efeitos diretos e indiretos desses compostos sobre os reservatórios de P do solo. Esses dados podem contribuir para a seleção de plantas e microrganismos mais aptos a explorar as formas de P do solo menos disponíveis, aumentando a eficiência dos adubos fosfatados.

PALAVRAS-CHAVE: Rizosfera. Exsudatos radiculares. Solubilização de fosfato. Ácidos orgânicos. Açúcares. Aminoácidos. P microbiano

ABSTRACT

IGLESIAS-BARRERA, Gustavo Andres, Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Potential soil phosphate release by the soil microbiota supplied with different carbon source.** Advisor: Maurício Dutra Costa.

In order to sustain a growing demand for food in the world, the use of large amounts of fertilizers in agriculture has become a common crop management practice. In a scenario of limited availability of natural P sources, the widespread use of phosphate fertilizers in Brazilian agriculture has been put to question since most Brazilian soils can strongly adsorb phosphates in the mineral matrix. In this context, phosphate solubilizing microorganisms (PSM) have been studied aiming at the development of biotechnological techniques that allow the agricultural use of low reactive apatites, the improvement of phosphate fertilizer efficiency, and the reversion of strong P adsorption in the soil. PSM are mainly rhizosphere inhabitants, being subject to qualitative and quantitative fluctuations in root carbon depositions. Thus, the objective of this work was to study the potential phosphate release from a red Oxisol from Patos de Minas, MG, by the soil microbiota supplied with different carbon sources commonly present in root exudates. The potential for P release was evaluated in soil samples incubated with NBRIP medium, at 25 ° C for 15 days, supplemented with 3.99 g L⁻¹ of carbon as organic acids, sugars, and amino acids, each compound being tested individually or in specific combinations. The number of colony forming units (CFU) of PSM in the soil treated with the organic compounds that led to the highest P release was also evaluated. The same compounds were also tested in a stirred-flow system to evaluate microbial activity-independent P release. Seven compounds significantly increased P release: four organic acids (malic, fumaric, aconitic, and lactic acids), one sugar (mannose) and two amino acids (aspartic acid and lysine). Malic acid led to the highest concentration of P available in the supernatant of 91.56 µg g⁻¹, followed by mannose, with 8.25 µg g⁻¹, and aspartic acid, with 7.81 µg g⁻¹. A significant part of the released P is immobilized in the soil microbial biomass. The treatments with soil supplemented with malic acid, mannose, and aspartic acid showed significantly higher numbers of PSM CFU compared to the control without the addition of these compounds. The highest percentage of PSM in relation to the total number of CFU in the soil was found in the treatment with malic acid and corresponded to 89.7 %. In the stirred-flow system, the most efficient compound in releasing P from the soil was malic acid, with 36.4 µg g⁻¹ after 180 min of flow of the solution containing the compound. The combinations of the most efficient compounds did not promote levels of P release higher than those obtained in the treatments with malic acid alone. It is

concluded that some compounds typical of the rhizosphere, when added to the soil, can increase P release. P release takes place by microbe-dependent and microbe-independent mechanisms. Malic acid, mannose and aspartic acid increase PSM populations in the soil. A significant part of the P released due to the addition of organic compounds to the soil is immobilized in the microbial biomass, becoming a labile reservoir of this nutrient. Additional research should be carried out to determine the direct and indirect effects of these compounds on soil P reservoirs. These data can contribute to the selection of plants and microorganisms capable of exploring the less available forms of soil P, increasing phosphate fertilizer efficiency.

KEYWORDS: Rhizosphere. Roots exudates. Phosphate solubilization. Organic acids. Sugars. Amino acids. P microbial biomass

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. CAPÍTULO I. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3. CAPÍTULO II. POTENCIAL DE LIBERAÇÃO DE FOSFATO PELA MICROBIOTA DO SOLO SUPRIDA COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO.....	26
3.1 RESUMO	28
3.2 ABSTRACT	28
3.3 INTRODUÇÃO	29
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.4.1 Seleção de compostos indutores de liberação de P no solo.....	32
3.4.2 Liberação de P dependente da atividade microbiana ao longo do tempo.....	3
3.4.3 Dinâmica de liberação de P em sistema stirred-flow.....	33
3.4.4 Populações de MSF em solo suplementado com compostos orgânicos selecionados.....	34
3.4.5 Influência da combinação de compostos orgânicos selecionados sobre a liberação de P.....	35
3.4.6 Técnicas analíticas	35
3.4.7 Delineamento experimental e análises estatísticas	35
3.5 RESULTADOS.....	37
3.5.1 Seleção de compostos indutores de liberação de P no solo.....	37
3.5.2 Liberação de P dependente da atividade microbiana ao longo do tempo.....	42
3.5.3 Dinâmica de liberação de P em sistema stirred-flow.....	44
3.5.4 Populações de MSF em solo suplementado com compostos orgânicos selecionados.....	46

3.5.5	Influência da combinação de compostos orgânicos selecionados sobre a liberação de P em sistema de incubação saturado	46
3.6	DISCUSSÃO	49
3.7	CONCLUSÕES.....	53
3.8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

A agricultura do século XXI encontra-se em face de grandes desafios para atender à crescente demanda da população mundial por produtos agropecuários. No ano de 2018, o planeta atingiu a marca de 7,2 bilhões de habitantes. Estima-se que essa população será duplicada nos próximos 60 anos. A crescente população demanda aumentos progressivos na produção de alimentos, madeira, biodiesel, dentre outros produtos agrícolas e florestais, levando a pressões por incursões agrícolas nas áreas remanescentes dos biomas naturais e à perspectiva de exaustão de recursos não-renováveis, como os minerais e rochas utilizados na fabricação de adubos.

Na agricultura tradicional, elevadas quantidades de fertilizantes são aplicadas periodicamente aos solos visando-se atingir o pleno potencial produtivo das culturas. Dentre os macronutrientes utilizados em maiores quantidades nos cultivos agrícolas, encontram-se o N e o P, que são os mais limitantes à produção vegetal. Tendo em conta que o P é recurso não renovável e que seus reservatórios são limitados, há crescente preocupação mundial no sentido de se promover a adoção de práticas que permitam a eficiente utilização desse nutriente na agricultura. Nesse cenário, algumas ferramentas biotecnológicas vêm emergindo como alternativa para o incremento da eficiência de uso dos fertilizantes fosfatados e para produção agrícola sustentável. Dentre as estratégias biotecnológicas mais promissoras, destaca-se o uso de microrganismos do solo com o potencial de promover o crescimento vegetal por meio de variados mecanismos, a exemplo da produção de fitormônios, do antagonismo a patógenos e da transformação de reservatórios de nutrientes pouco reativos em formas disponíveis para as plantas.

Um importante grupo microbiano com capacidade de promover o crescimento vegetal são os microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF). Os MSF participam das transformações de P no solo atuando nos processos de solubilização das formas inorgânicas e na mineralização das formas orgânicas do nutriente. O processo de solubilização microbiana de fosfato é realizado pela liberação de íons H^+ e ácidos orgânicos pelos MSF. Em geral, os fosfatos naturais apresentam maior solubilidade em meios com pH ácidos. Já os ácidos orgânicos complexam os cátions da matriz mineral dos fosfatos naturais, deslocando o equilíbrio químico no sentido da liberação do P em solução. A mineralização de formas orgânicas de P é realizada por meio de enzimas denominadas genericamente de fosfatases.

No solo, os MSF habitam principalmente a rizosfera das plantas. Nesse local, o aporte

de C reduzido pode corresponder a até 40 % do total de C fixado. As deposições de C na rizosfera incluem diferentes compostos, a exemplo dos ácidos orgânicos, açúcares, aminoácidos, reguladores de crescimento, dentre outros. A maior disponibilidade desses compostos na rizosfera promove maior atividade microbiana, tornando esse local o sítio de maior potencial de mineralização, solubilização e, ou dessorção de P. A identidade dos compostos orgânicos exsudados pelas raízes que afetam esses processos na rizosfera é desconhecida. Da mesma forma, ainda permanece sem elucidação se a presença de determinados exsudados radiculares pode contribuir de forma significativa para o estabelecimento e multiplicação de MSF no solo.

O entendimento dos efeitos de compostos comumente encontrados na rizosfera sobre os processos de disponibilização microbiana de P no solo pode levar à seleção de plantas e microrganismos que permitam o aproveitamento mais eficiente dos adubos fosfatados usados na agricultura e a mobilização dos reservatórios de P mais recalcitrantes. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi o de estudar o potencial de liberação de fosfato a partir de um Latossolo Vermelho, originário de Patos de Minas, MG, pela microbiota do solo suprida com diferentes fontes de C comumente presentes nos exsudatos radiculares.

2. CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

O P é o segundo nutriente mais abundante nos tecidos vegetais, com quantidades na matéria seca inferiores somente às do nitrogênio (Nesme et al., 2018). O elemento é essencial para o crescimento vegetal e para o funcionamento de muitos processos metabólicos celulares, sendo também componente estrutural de fosfolipídios, ácidos nucleicos e coenzimas (Hawkesford et al., 2011). O P é fundamental nas reações de transferência de energia nas células, sendo constituinte de moléculas importantes, a exemplo do ATP. Da mesma forma, o elemento é fundamental para muitos processos enzimáticos, atuando como substrato de muitas reações bioquímicas (Hawkesford et al., 2011; Shen et al., 2011).

O P é absorvido pela planta na forma de ortofosfato [H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}] (Novais et al., 2007). Em geral, durante o crescimento, as espécies vegetais requerem de 3 a 5 mg g^{-1} de P na massa seca (Shen et al., 2011). A concentrações acima de 10 mg g^{-1} , sintomas de fitotoxicidade passam a ser observados (Shen et al., 2011). A deficiência de P provoca redução da multiplicação celular, com conseqüente diminuição da expansão do limbo foliar e do número de folhas. Nessas condições, as concentrações foliares de clorofila tendem a aumentar (Novais et al., 2007; Richardson et al., 2009). Os principais sintomas de deficiência de P incluem o nanismo e a pigmentação arroxeadada das folhas basais (Ha e Tran, 2014).

O P é encontrado em formas inorgânicas e orgânicas no solo (Youssef et al., 2018). As formas inorgânicas correspondem de 35 a 75 % do P total (Shen et al., 2011). Na fração inorgânica, os principais minerais primários fosfatados são as apatitas, estrengitas e variscitas (Shen et al., 2011). Esses minerais são caracterizados por serem altamente estáveis, com liberação de P no solo muito lenta (Belchior et al., 2012). Já os minerais fosfatados secundários, ou seja, os fosfatos de Fe, Al e Ca, possuem capacidade de liberação de P variável em função da composição química e das condições do solo (Hawkesford et al., 2011). No solos brasileiros são encontrados majoritariamente os fosfatos de Fe e Al, enquanto que naqueles com histórico de agricultura intensiva e calagem, os fosfatos de Ca são encontrados em pequenas quantidades (Hawkesford et al., 2011).

A fração orgânica de P no solo é dividida em formas estáveis, a exemplo dos fitatos e fosfonatos, e de formas ativas, tais como os polifosfatos orgânicos (Weihrach e Opp, 2018). A matéria orgânica e a biomassa microbiana representam também importante reservatório de P orgânico no solo (Stewart e Tiessen, 1987). Os teores de P microbiano variam de 10 a 90 kg ha^{-1} a depender do tipo de solo, da disponibilidade de outros nutrientes, do pH, dentre outros

fatores (Smith e Paul, 1990; Martinazzo et al., 2007). Já a matéria orgânica dos solos varia de 9 a 45 g kg⁻¹ (Dieckow et al., 2009; Dick et al., 2010).

O P é pouco móvel no solo, sendo rapidamente adsorvido à matriz mineral ou precipitado em formas pouco solúveis (Belchior et al., 2012; Youssef et al., 2018). As formas inorgânicas de P no solo podem ser classificadas como lábeis ou não lábeis (Novais et al., 2007). O P-lábil corresponde àquele que se encontra fracamente ligado à fração mineral, estando em equilíbrio com a solução do solo (Shen et al., 2011). O P-não lábil corresponde à fração do elemento fortemente adsorvida às argilas, formando ligações de alta energia. Esse fenômeno, denominado fixação de P, leva ao sequestro do elemento na matriz mineral do solo, tornando-o indisponível para as plantas (Novais et al., 2007). O mecanismo mais provável de formação da fração de P-não lábil envolve o estabelecimento de duas ligações covalentes entre o fosfato e a superfície das argilas (Novais et al., 2007).

A maioria dos solos brasileiros apresentam elevada capacidade de adsorção de P (Eduah et al., 2019). Grande parte do nutriente aplicado ao solo fica retida na fase sólida, com baixo aproveitamento pelas plantas (Roy et al., 2016). Em estudo realizado com ³²P, demonstrou-se que a eficiência de aproveitamento do P, após a aplicação do nutriente como superfosfato triplo, foi de 7 a 9,8 % (Franzini et al., 2009). Essa característica contribui para a redução da eficiência econômica e da sustentabilidade dos sistemas agrícolas brasileiros. A título de exemplo, a cada ano, somente no Estado de Minas Gerais, mais de 15 Kg ha⁻¹ de P são fixados nos solos (Roy et al., 2016). Em todo o País, esse problema atinge cifras significativas, fato que têm sido alvo de preocupação em razão das jazidas de fosfatos naturais serem recursos não renováveis (Roy et al., 2016).

No solo, a microbiota participa ativamente das transformações do P (Richardson, 2001). Um dos papéis mais importantes dos microrganismos relaciona-se à capacidade microbiana de solubilizar formas inorgânicas do elemento e de mineralizar as orgânicas, aumentando a disponibilidade do nutriente no solo (Alori et al., 2017a). Microrganismos que atuam na solubilização de P a partir de fontes inorgânicas são chamados de microrganismos solubilizadores de fosfato [MSF] (Berg, 2009; Mendes et al., 2014).

Os MSF são taxonomicamente diversos e englobam fungos filamentosos ou leveduriformes e bactérias que são isolados diretamente do solo ou de outros ambientes (Oliveira et al., 2009; Alori et al., 2017b). Diversos gêneros de fungos, tais como *Aspergillus* e *Colletotrichum*, e de bactérias, a exemplo de *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pochonia* e *Pseudomonas*, têm sido estudados como solubilizadores de fosfato e, na atualidade, isolados eficientes no processo são utilizados na produção agrícola e florestal. (Oliveira et al., 2009;

Sharma et al., 2013; Hiruma et al., 2016; Sarabia et al., 2017; Suelen et al., 2018). Esses microrganismos aumentam a disponibilidade de P a partir de reservatórios pouco reativos. (Afzal et al., 2019; Ferrol et al., 2019). A diversidade de MSF propicia diferentes mecanismos de disponibilização de P (Sharma et al., 2013; Mendes et al., 2014), os quais irão depender das formas do elemento no solo e das condições do ambiente, tais como pH, salinidade, temperatura, disponibilidade de C, dentre outras (Duffy et al., 2005; Figueiredo et al., 2016).

As formas inorgânicas pouco solúveis podem ser solubilizadas mediante a liberação microbiana de substâncias com a capacidade de dissolver minerais, tais como ácidos orgânicos e sideróforos (Ahemad e Kibret, 2014). Essas substâncias complexam os cátions que estão ligados ao fosfato, tomando-o livre e disponível para absorção pelas plantas ou pela microbiota do solo (Oliveira et al., 2009; Alori et al., 2017a). A solubilização de fosfatos naturais também pode acontecer pela extrusão de prótons concomitante à respiração aeróbica ou à absorção de NH_4^+ (Sharma et al., 2013). Em geral, a solubilidade dos fosfatos aumenta em meios com menores valores de pH (Lindsay, 1979). No entanto, o efeito do pH na solubilização de fosfatos é altamente variável dependendo da fonte de P, em alguns relatos, não foram observadas correlações inversas entre o pH do meio e a concentração de P em solução. (Sato e Comeford, 2005; Jamal et al., 2018).

Ácidos orgânicos produzidos por microrganismos, tais como os ácidos oxálico e cítrico, são eficientes na solubilização de fosfatos de rocha (Vyas e Gulati, 2009; Mendes et al., 2014; Nascimento, 2018). A produção de ácidos orgânicos por MSF tem sido relatada principalmente em fungos filamentosos (Scervino et al., 2010). Da mesma forma, bactérias rizosféricas podem também efetuar a produção desses metabólitos (Scervino et al., 2010; Sarabia et al., 2018a). Os efeitos diretos e indiretos da produção microbiana de ácidos orgânicos nas interações ecológicas entre as populações de MSF não são ainda conhecidos.

Existem diversos relatos de microrganismos capazes de solubilizar minerais primários e secundários de P (Souchie et al., 2005; Wang et al., 2005; Hameeda et al., 2006; Oliveira et al., 2009; Sharma et al., 2013; Mendes et al., 2014; Sarabia et al., 2018b). Recentemente, Nascimento (2018) evidenciou a capacidade de dessorção de P do solo por *Aspergillus niger*. O fungo foi capaz dessorver in vitro cerca de 18 a 23 % do P após 40 dias de contato do elemento com o solo. Em face do fato de que os MSF habitam a rizosfera, é possível que os exsudatos radiculares sejam agentes potencializadores dessa atividade de dessorção. No entanto, pouco se sabe sobre a capacidade desses microrganismos de disponibilizarem P no ambiente rizosférico em função do aporte de exsudatos radiculares. A rizosfera deve ser o principal sítio de solubilização de P a partir de diferentes reservatórios do elemento presentes no solo. Porém, a

magnitude do processo, bem como a natureza dos compostos rizosféricos eficazes em desencadear esse processo *in situ* ainda são desconhecidas.

As formas orgânicas de P representam a maior fração do nutriente no solo, representado até 75 % do P total (Marschner et al., 2005). No Brasil, os valores médios de P orgânico estão na faixa de 60 % do P total (Novais et al., 2007). A passagem do P das formas orgânicas para a inorgânica é chamada de mineralização, sendo estritamente um processo enzimático (Shen et al., 2011). Os microrganismos do solo são os principais agentes envolvidos na mineralização de P, sendo responsáveis pela produção e liberação de enzimas envolvidas no processo (Alori et al., 2017a). As enzimas responsáveis pela mineralização de P são denominadas genericamente de fosfatases. Esse tipo de enzima pode ainda ser subdividido em fitases, fosfomonoesterases, fosfodiesterases, fosfotriesterases e metafosfatases, dentre outros (Mcgill e Cole, 1981; Novais et al., 2007; Orozco-mosqueda et al., 2018). As fosfatases atuam catalisando a hidrólise da molécula de fosfato orgânico, com a liberação de ortofosfato (Hou et al., 2015). As fosfatases podem ser classificadas em ácidas e alcalinas a depender do ótimo de pH para a atividade (Herbien e Neal, 1990). Correlações positivas entre a disponibilidade de C orgânico no solo e a atividade de fosfatases são frequentemente relatadas na literatura, sendo que as maiores atividades dessas enzimas têm sido observadas nas camadas superficiais do solo (Novais et al., 2007; Belchior et al., 2012; Leite et al., 2018)

A rizosfera pode ser conceituada como a zona do solo que sofre a influências das raízes das plantas (Hartmann et al., 2008). As plantas têm a capacidade de regular a exsudação de compostos para esse local no solo, a depender das necessidades metabólicas e das condições às quais estiverem submetidas (Sasse et al., 2018). Alguns dados experimentais demonstram que, quando sob forte demanda de nutrientes, plantas em competição induzem a microbiota rizosférica a oxidar a matéria orgânica do solo, elevando os níveis de mineralização de nutrientes (Keiluweit et al., 2015). Do C fixado pelas plantas, 20 a 40 % são transferidos para a rizosfera (Sasse et al., 2018), tornando essa região do solo um sítio de elevada atividade biológica. Maiores populações de fungos e bactérias são comumente encontradas nesse local em comparação ao solo não-rizosférico. (Jones et al., 2009; Singh et al., 2017; Zahra et al., 2019).

Os MSF são habitantes comuns encontrados na rizosfera das plantas e podem ser fortemente influenciados pelos compostos orgânicos exsudados pelas raízes (Sharma et al., 2013). O papel dos exsudatos radiculares no recrutamento de MSF para a rizosfera e no estímulo à disponibilização de P para as plantas permanece desconhecido. O conhecimento dessas relações pode contribuir para o desenvolvimento de tecnologias que aumentem a

eficiência de utilização de adubos fosfatados, assim como para a seleção de plantas e microrganismos que consigam mobilizar as fontes de P pouco disponíveis no solo, com ganhos na promoção de crescimento vegetal e na sustentabilidade dos ecossistemas agrícolas (García-fraile et al., 2015; Gopalakrishnan et al., 2018; Numan et al., 2018).

A maioria dos estudos da interação entre microrganismos e compostos rizosféricos focalizam a microbiota patogênica ou simbiótica, enquanto as relações entre esses compostos e os processos de liberação de P na rizosfera pela microbiota permanece pouco explorada, especialmente nos solos brasileiros. Determinados compostos exsudados na rizosfera regulam a colonização e a estruturação das comunidades microbianas desse local, promovendo a ocorrência de processos associados à microbiota colonizadora (Rudrappa et al., 2008). Em plantas da família Fabaceae, flavonoides exsudados pela planta atuam como moléculas-sinal para a colonização de bactérias noduladoras (Sugiyama, 2019). Também tem sido comprovado que o ácido hidroxâmico e aminoácidos, a exemplo do triptofano, aumentam a colonização de bactérias promotoras de crescimento vegetal (Rasmann e Turlings, 2016). Em *Arabidopsis thaliana*, a exsudação de ácido salicílico determina, em parte, a composição das comunidades de microrganismos rizosféricos dessa espécie (Glavina et al., 2015). Monômeros de cutina atuam como sinal na formação de associações micorrízicas e a exsudação de terpenos atrai nematoides entomófagos para a rizosfera (Venturi e Keel, 2016; Kuzyakov e Razavi, 2019).

A determinação do perfil de compostos exsudados por uma determinada espécie vegetal é trabalho complexo. Em geral, três grandes grupos de substâncias são encontrados em maior quantidade na rizosfera, correspondendo aos açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos. (Chaparro et al., 2013; Tawaraya et al., 2014; Kawasaki et al., 2016). A composição dos exsudados radiculares é bastante variável e depende da espécie vegetal, da sua nutrição e fenologia, dentre outros fatores (Canarini et al., 2019). Os aminoácidos exsudados em maior concentração pelas plantas são a asparagina, a prolina, a valina, a tirosina e a alanina. Os aminoácidos arginina, metionina, fenilalanina, cisteína e triptofano são encontrados em concentrações mínimas. (Krafczyk et al., 1984; Fan et al., 2001; Hromádko et al., 2010; Canarini et al., 2016; Kawasaki et al., 2016).

Em relação aos açúcares, destacam-se principalmente a glicose, a sacarose e a frutose. Outros açúcares, tais como a arabinose, a xilose, a galactose e a manose, são encontrados em menores concentrações (Bacilio-jimenez et al., 2003; Jackson e Krishnaswamy, 2014; Canarini et al., 2016; Kawasaki et al., 2016).

O último grupo importante de compostos rizosféricos engloba os ácidos orgânicos. Os ácidos cítrico, málico, acético e fumárico são encontrados em maiores concentrações, enquanto

os ácidos oxálico, tartárico e pirúvico, dentre outros, são menos abundantes (Fan et al., 2001;

Tawaraya et al., 2014; Kawasaki et al., 2016). Os ácidos orgânicos são compostos reconhecidamente importantes para a aquisição de nutrientes pelas plantas e pela microbiota do solo (Hue, 1991; Mendes et al., 2014). Esses compostos atuam na solubilização de minerais e, a exemplo do ácido oxálico, na desestabilização de complexos organo-minerais do solo, aumentando a disponibilidade de matéria orgânica para o processo de mineralização (Jones e Darrah, 1994; Keiluweit et al., 2015). Muitos ácidos orgânicos estão envolvidos na solubilização de apatitas e fosfatos secundários *in vitro*, a exemplo dos ácidos cítrico, oxálico, e itacônico (Marschner et al., 2005; Mendes et al., 2014; Jamal et al., 2018). Em sistemas de fluxo contínuo sob agitação (*stirred flow*), o ácido oxálico mostrou-se o mais eficaz na liberação de P a partir de um Latossolo Vermelho-Amarelo submetido à adsorção de P por 40 dias (Nascimento, 2018). Nesse caso, a liberação de P estava associada à acidez da solução contendo ácido oxálico e da capacidade do composto de complexar cátions do solo (Nascimento, 2018).

O aporte de C reduzido na rizosfera corresponde a até 40 % do total de C fixado pela planta. A maior disponibilidade de C nesse local promove a atividade microbiana, tornando-o sítio favorável para a ocorrência de mineralização, solubilização e, ou dessorção de fosfato. A identidade dos compostos que afetam esses processos é desconhecida. Além disso, não se sabe se a presença de determinados exsudatos radiculares pode contribuir de forma significativa para o recrutamento de MSF na rizosfera. Assim, o entendimento dos efeitos de compostos rizosféricos sobre os processos de disponibilização microbiana de P no solo pode levar à seleção de plantas e microrganismos que permitam o desenvolvimento de práticas biotecnológicas visando ao aproveitamento mais eficiente dos adubos fosfatados e a mobilização dos reservatórios menos reativos de P solo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afzal I, Khan Z, Sikandar S, Shahzad S. Plant beneficial endophytic bacteria : Mechanisms , diversity , host range and genetic determinants. *Microbiol Res.* 2019;221:36–49.
- Ahemad M, Kibret A. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria : current perspective. *J King Saud Univ - Sci. King Saud University;* 2014;26:1–20.
- Alori ET, Glick BR, Babalola OO. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Front Microbiol.* 2017a;8:1–8.
- Bacilio-jimenez M, Aguilar-flores S, Ventura-zapata E, Perez-campos E, Bouquelet S, Zenteno E. Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. *Plant Soil.* 2003;249:271–277.
- Belchior D, Kumar A, Ribeiro I, Ferreira R, Novais D, Hugo V, Venegas A. Agriculture , Ecosystems and Environment Phosphorus saturation of a tropical soil and related P leaching caused by poultry litter addition. *Agric Ecosyst Environ.* 2012;162:15–23.
- Berg G. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health : perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009;84:11–18.
- Braga J, Defelipo B. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solos e plantas. *Rev ceres.* 1974;21:73–85.
- Caixeta S, Mendes GDO, Silva UC, Silva IR, Ribeiro júnior JI, Dutra Costa M. Decreased mineral availability enhances rock phosphate solubilization efficiency in *Aspergillus niger*. *Ann Microbiol.* 2014;65:745–751.
- Canarini A, Kaiser C, Merchant A, Richter A, Wanek W. Root exudation of primary metabolites : mechanisms and their roles in plant responses to environmental stimuli. *Front Plant Sci.* 2019;10:157.
- Canarini A, Merchant A, Dijkstra FA. Rhizosphere drought effects on *helianthus annuus* and glycine max metabolites : from phloem to root exudates. *Rhizosphere.* 2016;2:85–97.
- Carminati A, Moradi AB, Vetterlein D, Vontobel P, Lehmann E, Weller U, Vogel HJ, Oswald SE. Dynamics of soil water content in the rhizosphere. *Plant Soil.* 2010;332:163–176.
- Chaparro JM, Badri D V, Bakker MG, Sugiyama A, Manter DK, Vivanco JM. Root exudation of phytochemicals in *arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. *Plos one.* 2013;8:1–10.
- Dick DP, Martinazzo R, Knicker H, Almeida PSG. Matéria orgânica em quatro tipos de solos Brasileiros: composição química e sorção de atrazina. *Quim Nova.* 2010;33:14–19.
- Dieckow J, Bayer C, Conceição PC, Zanatta JA, Martin-Neto L, Milori DBM, Salton JC, MacEdo MM, Mielniczuk J, Hernani LC. Land use, tillage, texture and organic matter stock and composition in tropical and subtropical Brazilian soils. *Eur J Soil Sci.* 2009;60:240–249.
- Duffy B, Nowak J, Cle C. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases : principles , mechanisms of action , and future prospects. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:4951–4959.

- Eduah JO, Nartey EK, Abekoe MK, Breuning-madsen H, Andersen MN. Phosphorus retention and availability in three contrasting soils amended with rice husk and corn cob biochar at varying pyrolysis temperatures. *Geoderma*.2019;341:10–17.
- Fan TW, Lane AN, Shenker M, Bartley JP, Crowley D, Higashi RM. Comprehensive chemical profiling of gramineous plant root exudates using high-resolution NMR and MS. *Phytochemistry*. 2001;57:209–221.
- Ferrol N, Azcón-aguilar C, Pérez-tienda J. Arbuscular mycorrhizas as key players in sustainable plant phosphorus acquisition : An overview on the mechanisms involved. *Plant Sci*. Elsevier; 2019;280:441–447.
- Figueiredo M do VB, Bonifacio A, Rodrigues AC, Araujo FF. Plant growth-promoting rhizobacteria: key mechanisms of action. *Science* 2016;23–37.
- Franzini VI, Muraoka T, Manuel H, León C, Mendes L. Eficiência de fosfato natural reativo aplicado em misturas com superfosfato triplo em milho e soja. *Pesqui Agropecu Bras*. 2009;44:1092–1099.
- García-fraile P, Menéndez E, Rivas R. Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *Bioengineering*. 2015;2:183–205.
- Glavina T, Jones CD, Lebeis SL, Paredes SH, Lundberg DS, Breakfield N, Gehring J, McDonald M, Malfatti S, Glavina del Río T, Jones CD, Tringe SG, Dangl JL. Salicylic acid modulates colonization of the root microbiome by specific bacterial taxa. *Science*. 2015;349:860–864.
- Gopalakrishnan S, Srinivas V, Vemula A, Samineni S. Influence of diazotrophic bacteria on nodulation , nitrogen fixation , growth promotion and yield traits in five cultivars of chickpea. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2018;15:35–42.
- Ha S, Tran L. Understanding plant responses to phosphorus starvation for improvement of plant tolerance to phosphorus deficiency by biotechnological approaches. *Crit Rev Biotechnol*. 2014;34:16–30.
- Hameeda B, Reddy YH, Rupela OP, Kumar GN, Reddy G. Effect of carbon substrates on rock phosphate solubilization by bacteria from composts and macrofauna. *Curr Microbiol* 2006;53:298–302.
- Hartmann A, Rothballer M, Schmid M. Lorenz Hiltner , a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Sci*. 2008;312:7–14.
- Hawkesford M, Horst W, Kichey T, Lambers H, Schjoerring J, Møller IS, White P. Functions of Macronutrients [Internet]. *Marschner’s Miner. Nutr. High. Plants*. 2011:243-265
- Hedley MJ, Stewart JWB. Method to measure microbial phosphate in soils. *Soil Biol Biochem*. 1982;14:377–385.
- Herbien SA, Neal JL. Soil pH and phosphatase activity. *Commun Soil Sci Plant Anal*. 1990;21:439–456.
- Hiruma K, Gerlach N, Bucher M, Connell RJO, Schulze-lefert P, Nakano RT, Bucher M, Connell RJO, Schulze-lefert P. Root endophyte colletotrichum tofieldiae confers plant fitness benefits that are phosphate status dependent. *Cell*. 2016;165:464–474.
- Hou E, Chen C, Wen D, Liu X. Phosphatase activity in relation to key litter and soil properties in mature subtropical forests in China. *Sci Total Environ*. 2015;515–516.

- Hromádka L, Vranová V, Techer D, Laval-Gilly P, Rejšek K, Formánek P, Falla J. Composition of root exudates of *Miscanthus × Giganteus* greif et deu. *Sborník mendelovy univerzity v brně*. 2010;58:71–76.
- Hue N V. Effects of organic acids/anions on p sorption and phytoavailability in soils with different mineralogies. *Soil Sci*. 1991;152:463–471.
- Jackson KM, Krishnaswamy I. Metabolic profiling of rice root exudates and its impact on rhizosphere microbial dynamics under aerobic conditions metabolic profiling of rice root exudates and its impact on rhizosphere microbial dynamics under aerobic conditions. *J Agric Sci*. 2014;777–781.
- Jamal A, Khan A, Sharif M, Jamal H. Application of different organic acids on phosphorus solubility from rock phosphate. *J Hortic plant Res*. 2018;2:43–48.
- Jones DL, Darrah PR. Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. *Plant Soil*. 1994;166:247–257.
- Jones DL, Nguyen C, Finlay RD. Carbon flow in the rhizosphere : carbon trading at the soil – root interface. 2009;5–33.
- Kawasaki A, Donn S, Ryan PR, Mathesius U, Devilla R, Jones A, Watt M. Microbiome and exudates of the root and rhizosphere of *brachypodium distachyon* , a model for wheat. *Plos One*. 2016;11:10.
- Keiluweit M, Bougoure JJ, Nico PS, Pett-Ridge J, Weber PK, Kleber M. Mineral protection of soil carbon counteracted by root exudates. *Nat Clim Chang*. 2015;5:588–595.
- Krafczyk I, Trolldenier G, Beringer H. Soluble root exudates of maize: influence of potassium supply and rhizosphere microorganism. *Soil Biol Biochem*. 1984;16:315–322.
- Kuzyakov Y, Razavi BS. Rhizosphere size and shape : temporal dynamics and spatial stationarity. *Soil Biol Biochem*. 2019;135:343–360.
- Leite MVM, Bobu L, Espíndola SP, Campos MRC, Azevedo LCB, Ferreira AS. Modeling of soil phosphatase activity in land use ecosystems and topsoil layers in the Brazilian Cerrado. *Ecol Modell*. 2018;385:182–188.
- Marschner P, Solaiman Z, Rengel Z. Growth, phosphorus uptake, and rhizosphere microbial-community composition of a phosphorus-efficient wheat cultivar in soils differing in pH. *J Plant Nutr Soil Sci*. 2005;168:343–351.
- Martinazzo R, Santos DR dos, Gatiboni LC, Brunetto G, Kaminski J, R Fósforo microbiano do solo sob sistema plantio direto em resposta à adição. *Rev Bras ciencias do solo*. 2007;31:563–570.
- Mcgill WB, Cole C V. Comparative aspects of cycling of organic C, N, S And P Through soil organic matter. *Geoderma*. 1981;26:267–286.
- Mendes GDO, Moreira De Freitas AL, Liparini Pereira O, Ribeiro Da Silva I, Bojkov Vassilev N, Dutra Costa M. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Ann Microbiol*. 2014a;64:239–249.
- Nascimento J. Solubilização de fosfatos de rocha e dessorção de fosforo no solo por acidos organicos e *Aspergillus niger*. [thesis] Univesidade Federal de Viçosa; 2018.

- Nesme T, Metson GS, Bennett EM. Global phosphorus flows through agricultural trade. *Glob Environ Chang.* 2018;50:133–141.
- Novais R., Alvarez V., Barros N., Fontes RL., Cantarutti R., Neves JC. Fertilidade do solo. *Soc. Bras. Ciência do Solo.* 2007.
- Numan M, Bashir S, Khan Y, Mumtaz R. Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants : A review. *Microbiol Res.* 2018;209:21–32.
- Oliveira CA, Alves VMC, Marriel IE, Gomes EA, Scotti MR, Carneiro NP, Guimara CT. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biol Biochem J.* 2009;41:1782–1787.
- Orozco-mosqueda C, Rocha-granados C, Glick BR, Santoyo G. Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. *Microbiol Res.* 2018;208:25–31.
- Rasmann S, Turlings TCJ. Root signals that mediate mutualistic interactions in the rhizosphere. *Curr Opin Plant Biol.* 2016;32:62–68.
- Reddy KR, Patrick WH. Effect of alternate aerobic and anaerobic conditions on redox potential, organic matter decomposition and nitrogen loss in a flooded soil. *Soil Biol Biochem.* 1975;7:87–94.
- Richardson AE. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aust J Plant Physiol.* 2001;28:897–906.
- Richardson AE, Barea J, Mcneill AM, Prigent-combaret C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil.* 2009;321:305–339.
- Roy ED, Richards PD, Martinelli LA, Coletta L Della, Lins SRM, Vazquez FF, Willig E, Spera SA, VanWey LK, Porder S. The phosphorus cost of agricultural intensification in the tropics. *Nat Plants.* 2016;2:1-5
- Rudrappa T, Czymbek KJ, Paré PW, Bais HP. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiol.* 2008;148:1547–1556.
- Sarabia M, Cazares S, González-rodríguez A, Mora F. Rhizosphere Plant growth promotion traits of rhizosphere yeasts and their response to soil characteristics and crop cycle in maize agroecosystems. *Rhizosphere.* 2018a;6:67–73.
- Sarabia M, Cornejo P, Azcón R, Carreón-abud Y, Larsen J. Rhizosphere Mineral phosphorus fertilization modulates interactions between maize , rhizosphere yeasts and arbuscular mycorrhizal fungi. *Rhizosphere.* 2017;4:89–93.
- Sarabia M, Jakobsen I, Grønlund M, Carreón-abud Y, Larsen J. Rhizosphere yeasts improve P uptake of a maize arbuscular mycorrhizal association. *Appl Soil Ecol. Elsevier;* 2018b;125:18–25.
- Sasse J, Martinoia E, Northen T. Feed Your Friends : Do plant exudates shape the root microbiome ? *Trends Plant Sci.* 2018;23:25–41.
- Sato S, Comeford N. Influence of soil pH on inorganic phosphorus sorption and desorption in humid Brazilian ultisol. *R Bras Ci solo.* 2005;29:685–694.

- Scervino JM, Mesa MP, della Mónica I, Recchi M, Moreno NS, Godeas A. Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. *Biol Fertil Soils*. 2010;46:755–763.
- Sharma S, Sayyed RZ, Trivedi M, Thivakaran A. Phosphate solubilizing microbes : sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer plus*. 2013;2:587–601.
- Shen J, Yuan L, Zhang J, Li H, Bai Z, Chen X, Zhang W, Zhang F. Phosphorus dynamics: From soil to plant. *Plant Physiol*. 2011;156:997–1005.
- Singh V, Kumari S, Prakash J, Kumar A, Aeron A, Kumar P, Kumar J, Pattanayak A, Naveed M, Dotaniya ML. Plant beneficial rhizospheric microorganism (PBRM) strategies to improve nutrients use efficiency : A review. *Ecol Eng*. 2017;107:8–32.
- Smith J., Paul E. The significance of soil microbial biomass estimations. *Soil Biochem*. 1990;357–396.
- Souchie EL, Azcón R, Barea JM, Saggin-Júnior OJ, Da Silva EMR. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. *Pesqui Agropecu Bras*. 2005;40:1149–1152.
- Stewart JWB, Tiessen H. Dynamics of soil organic phosphorus. *Biogeochemistry*. 1987;60:41–60.
- Suelen T, Monteiro A, Vasconcelos S, Ney I, Mello K De, Coutinho B, Catarina M, Kasuya M, Victor J, Araújo D. Nematophagous fungi increasing phosphorus uptake and promoting plant. *Biol Control*. 2018;123:71–75.
- Sugiyama A. The soybean rhizosphere : metabolites , microbes , and beyond — a review. *J Adv Res. Cairo University*; 2019;19:67–73.
- Tawaraya K, Horie R, Shinano T, Wagatsuma T, Oikawa A, Tawaraya K, Horie R, Shinano T. Metabolite profiling of soybean root exudates under phosphorus deficiency Metabolite profiling of soybean root exudates under phosphorus deficiency. *Soil Sci Plant Nutr. Taylor & Francis*; 2014;60:679–694.
- Venturi V, Keel C. Signaling in the Rhizosphere. *Trends Plant Sci*. 2016;21:187–198.
- Vyas P, Gulati A. Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. *BMC Microbiol*. 2009;9:174-189
- Wang X, Li Q, Hu H, Zhang T, Zhou Y. Dissolution of kaolinite induced by citric, oxalic, and malic acids. *J Colloid Interface Sci*. 2005;290:481–488.
- Weihrauch C, Opp C. Ecologically relevant phosphorus pools in soils and their dynamics : The story so far. *Geoderma*. 2018;325:183–194.
- Youssef F, Favaretto N, Carlos A, Motta V, Barth G, Democh G. Phosphorus mobility and degree of saturation in oxisol under no-tillage after long-term dairy liquid manure application. *Soil Tillage Res*. 2018;177:45–53.
- Zahra F, Abbas Y, Mahé F, Prin Y. The rhizosphere microbiome : a key component of sustainable cork oak forests in trouble. *For Ecol Manage*. 2019;434:29–39.

3. CAPÍTULO II

Potencial de liberação de fosfato pela microbiota do solo suprida com diferentes fontes de carbono

POTENCIAL DE LIBERAÇÃO DE FOSFATO PELA MICROBIOTA DO SOLO SUPRIDA COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

3.1 RESUMO

A ampla utilização de adubos fosfatados solúveis no Brasil tem sido questionada em função da alta capacidade de adsorção de P da maioria dos solos, o que torna o nutriente indisponível para as plantas. Microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) têm sido estudados visando ao desenvolvimento de tecnologias que permitam o melhor aproveitamento agrícola desses insumos. Os MSF habitam principalmente a rizosfera e estão sujeitos à flutuações nas deposições de C pelas raízes. O objetivo deste trabalho foi o de estudar o potencial de liberação de P a partir de Latossolo Vermelho de Patos de Minas, MG, pela microbiota do solo suprida com diferentes fontes de C presentes nos exsudatos radiculares. O potencial de liberação de P foi avaliado em amostras incubadas a 25 °C por 15 dias, usando-se meio NBRIP suplementado com 3,99 g L⁻¹ de C como ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos. Os compostos que levaram à maior disponibilização de P foram testados em stirred-flow para se estimar a liberação de P independente da atividade microbiana. Os ácidos málico, fumárico, aconítico e lático, a manose, o ácido aspártico e a lisina, promoveram aumentos significativos do P no sobrenadante do meio de incubação. O ácido málico foi o composto mais eficiente, com 91,56 µg g⁻¹ de P solúvel, seguido da manose, com 8,25 µg g⁻¹, e do ácido aspártico, com 7,81 µg g⁻¹. Parte significativa do P solúvel pelos compostos testados foi imobilizada na biomassa microbiana. O ácido málico, a manose e o ácido aspártico estimularam maiores populações de MFS. As combinações de compostos não promoveram níveis de disponibilização de P superiores àqueles obtidos nos tratamentos com ácido málico sozinho. O composto mais eficiente na liberação de P em stirred-flow foi o ácido málico, com 36,4 µg g⁻¹ acumulados ao final de 180 min de fluxo. Conclui-se que compostos rizosféricos podem aumentar a liberação de P. O ácido málico e a manose promoveram o enriquecimento do solo em MSF. Parte significativa do P solúvel em função da adição de compostos orgânicos ao solo é imobilizada na biomassa microbiana, tornando-se reservatório de fácil acessibilidade pelas plantas.

PALAVRAS-CHAVE: rizosfera, exsudatos radiculares, solubilização de fosfato, ácidos orgânicos, açúcares, amino-ácidos, P microbian

POTENTIAL PHOSPHATE RELEASE BY THE SOIL MICROBIOTA SUPPLIED WITH DIFFERENT CARBON SOURCES

3.2 ABSTRACT

The wide use of soluble phosphate fertilizers in Brazil has been put to question due to the high P adsorption capacity of most soils, which makes this nutrient unavailable to plants. Phosphate solubilizing microorganisms (MSF) have been studied aiming at the development of technologies that would allow the best use of these agricultural inputs. MSF inhabit the rhizosphere and are subject to fluctuations in the carbon depositions by the roots. The objective of this work was to study the potential of P release from a red Oxisol from Patos de Minas, MG, by the soil microbiota supplied with different carbon sources commonly present in the root exudates. The potential for P release was evaluated in soil, incubated, at 25 ° C for 15 days, using NBRIP medium supplemented with 3.9 g L⁻¹ of carbon in the form of organic acids, sugars, and amino acids. The compounds that led to the highest release of P were tested in stirred flow to evaluate microbial activity-independent P release. Malic, fumaric, aconitic and lactic acids, mannose, aspartic acid, and lysine, promoted significant increases in P in the supernatant of the incubation medium. Malic acid was the most efficient compound, with 91.56 µg g⁻¹ of P released, followed by mannose, with 8.25 µg g⁻¹, and aspartic acid, with 7.81 µg g⁻¹. A significant part of the P released by the tested compounds was immobilized in the microbial biomass. Malic acid, mannose, and aspartic acid stimulated larger populations of MFS. The combinations of the compounds did not promote levels of P release higher than those obtained in the treatments with malic acid alone. The most efficient compound at the release of P in stirred flow was malic acid, with 36.4 µg g⁻¹ accumulated after 180 min of flow. It is concluded that rhizospheric compounds can increase P release in the soil. Malic acid and mannose promote the enrichment of MSF in the soil. A significant part of the P released due to the addition of organic compounds to the soil is immobilized in the microbial biomass, becoming a reservoir easily accessible by plants.

KEYWORDS: rhizosphere, roots exudates, phosphate solubilization, organic acids, sugars, amino acids, microbial biomass P

3.3 INTRODUÇÃO

A maioria dos solos brasileiros são altamente intemperizados, apresentam elevado conteúdo de oxi-hidróxidos de Fe e Al e elevada capacidade de adsorção de P (Novais et al., 2007). Esse nutriente, quando aplicado em formas solúveis ao solo, reage rapidamente com os minerais de Fe e Al, tornando-se indisponível para as plantas (Shen et al., 2011; Nesme et al., 2018). Em face desse fenômeno, o amplo uso de adubos fosfatados solúveis no Brasil tem sofrido críticas, haja vista as elevadas quantidades de P que ficam retidas e indisponíveis nos solos (Roy et al., 2016). Estima-se que, anualmente, milhares de toneladas de P sejam fixadas nos solos brasileiros (Roy et al., 2016). No Estado de Minas Gerais, cerca de 15 Kg ha⁻¹ de P são adsorvidos irreversivelmente à fração mineral do solo a cada ano (Roy et al., 2016).

O P pode ser encontrado no solo em formas orgânicas e inorgânicas (Shen et al., 2011). A fração orgânica corresponde a formas estáveis, a exemplo dos fitatos e fosfonatos, e a formas ativas, como os polifosfatos orgânicos (Weihrauch e Opp, 2018). A matéria orgânica e a biomassa microbiana representam também importante reservatório de P (Stewart e Tiessen, 1987). A quantidade de P microbiano aí presente pode variar de 10 a 90 kg ha⁻¹. As formas inorgânicas correspondem a minerais primários, a exemplo das apatitas, que são caracterizadas pela baixa reatividade (Hawkesford et al., 2011). Nessa fração, são também encontrados minerais fosfatados secundários, tais como os fosfatos de Fe, Al e Ca, formados a partir da precipitação do ortofosfato com esses elementos. Os fosfatos de Fe e Al predominam em solos ácidos, enquanto que o fosfato de Ca é mais comum em solos alcalinos (Shen et al., 2011). O P que se encontra fracamente ligado às partículas do solo e em equilíbrio com a solução é denominado P-lábil (Novais et al., 2007). Já aquele ligado fortemente à superfície da fração mineral por meio de ligações covalentes de alta energia é denominado P-não lábil.

Do P usado no setor agrícola, somente pequena parte é aproveitada pelas plantas em razão da adsorção do elemento à fase sólida do solo (Roy et al., 2016). Estudos com ³²P mostraram que a eficiência de aproveitamento do P pelas plantas, quando adubadas com superfosfato triplo, variou de 7 a 9,8 % (Franzini et al., 2009). O estudo realizado por Nascimento, (2018) evidenciou a capacidade de dessorção de P do solo por *Aspergillus niger* FS1 in vitro. O fungo foi capaz de dessorver de 18 a 23 % do P após 40 dias de contato do elemento com o solo. Esse fungo é também capaz de solubilizar apatitas de diferentes procedências e graus de reatividade. Esses dados sugerem que alguns microrganismos poderiam ser também capazes de liberar P a partir de reservatórios pouco reativos no solo.

Os microrganismos capazes de solubilizar fontes de P inorgânicas e pouco reativas são chamados de solubilizadores de fosfato (Mendes et al., 2014; Alori et al., 2017a). Esse grupo tem como habitat natural a rizosfera das plantas e participam ativamente das transformações do P por meio de reações de solubilização e de mineralização (Richardson e Simpson, 2011; Sharma et al., 2013; Sarabia et al., 2018b). Os microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) efetuam a dissolução de fosfatos de rocha por meio da extrusão de prótons e da produção de ácidos orgânicos e sideróforos (Jamal et al., 2018; Sato e Comeford, 2005; Glick, 2012; Afzal et al., 2019). Já as formas orgânicas de P no solo podem ser mineralizadas por MSF capazes de produzir fitases, fosfomonoesterases, fosfodiesterases e fosfotriesterases, enzimas que participam no processo de mineralização (Hou et al., 2015; Orozco-mosqueda et al., 2018).

Os MSF são encontrados principalmente na rizosfera, que é definida como a região do solo influenciada pelas raízes das plantas (Hartmann et al., 2008). Os microrganismos da rizosfera são fortemente influenciados pelos exsudados radiculares (Sasse et al., 2018), cuja composição é altamente variável a depender das características fisiológicas da espécie e das condições edafológicas e ambientais (Kawasaki et al., 2016). Os três principais grupos de substâncias exsudadas pelas plantas são os açúcares, os ácidos orgânicos e os aminoácidos (Li et al., 2013; Madhukar et al., 2018).

Estudos têm demonstrado que as plantas possuem mecanismos de recrutamento e estruturação das comunidades microbianas rizosféricas por meio das deposições rizosféricas de C (Hu et al., 2018; Sasse et al., 2018). A interação entre os compostos rizosféricos e a microbiota do solo tem sido estudada principalmente em patógenos e microrganismos simbiotes (Venturi e Keel, 2016; Kant, 2017). Moléculas sinalizadoras específicas exsudadas na rizosfera são essenciais para a colonização de bactérias noduladoras e para a formação de associações micorrízicas (Venturi e Keel, 2016). Da mesma forma, há evidências de que a presença de exsudados específicos favoreçam a multiplicação de microrganismos benéficos ao hospedeiro (Rasmann e Turlings, 2016).

É possível que os exsudados radiculares sejam, da mesma forma, agentes estimuladores das populações de MSF no solo e que contribuam para promover a disponibilização de P por meio de processos de dessorção, solubilização e mineralização. Até o presente, pouco se sabe sobre o papel dos exsudatos radiculares sobre a liberação microbiana de P nos solos. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de estudar o potencial de liberação de P do solo, pela microbiota do solo suprida com diferentes fontes de C comumente presentes nos exsudatos radiculares.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Ecologia Microbiana, do Departamento de Microbiologia, e no Laboratório de Fertilidade do Solo, do Departamento de Solos, ambos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. Em todos os experimentos, utilizaram-se amostras de solo do horizonte A de um Latossolo Vermelho localizado no município de Patos de Minas, MG, este solo apresenta alto conteúdo de P total, permitindo assim o correto desenvolvimento dos experimentos. A caracterização físico-química do solo foi realizada de acordo com EMBRAPA (2011) [Tabela 1].

A menos que detalhado de outra forma abaixo, para avaliação do potencial de disponibilização de fósforo da microbiota do solo e do P microbiano, todos os experimentos foram conduzidos segundo método proposto por Debnath et al. (1994) modificado, consistindo da incubação de 1 g de solo em tubos de rosca contendo 15 mL de meio NBRIP (Nautiyal, 1999), sem a fonte de C e P originais, por 15 dias a 25 °C. A fonte de C do meio NBRIP foi substituída pelos compostos orgânicos, testados individualmente ou em combinações, à concentração equivalente à do meio original de 3,99 g L⁻¹ de C. As amostras permaneceram imersas no meio durante a incubação. Após a incubação, os sobrenadantes obtidos foram filtrados em filtro de papel quantitativo, JP42, com poros de 8 µm, antes da execução dos procedimentos analíticos. Os dados obtidos, quando pertinente, foram expressos com base na massa de solo seco.

Tabela 1. Características físicas e químicas das amostras de solo

Solo	pH H ₂ O	P _{total} ---%---	P -----mg/dm ³ -----	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H ⁺ Al	SB	CTC _t	CTC _T	V -----%-----	m	MO dag/kg	Prem mg/L	Areia -----%-----	Silte	Argila
Patos de Minas	6,3	0,5	51,3	270	11,7	4,2	0,0	4,62	16,5	16,5	21,21	78	0	7,8	16,8	15	31	54

Amostras de solos coletados em Patos de Minas, MG. pH em água - Relação 1:2,5; P - K - Fe - Zn - Mn - Cu - Extrator Mehlich 1; Ca - Mg - Al Extrator: KCl - 1 mol/L; H + Al - Extrator Acetato de Cálcio 0,5 mol/L -pH 7,0; SB = Soma de Bases Trocáveis; CTC_t - Capacidade de Troca Catiônica Efetiva; CTC_T - Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0; V = Índice de Saturação de Bases; m = Índice de Saturação de Alumínio; P-rem = Fósforo Remanescente; Mat. Org. (MO) - Oxidação: Na₂Cr₂O₇ 4N + H₂SO₄ 10 mol L⁻¹; Silte, areia e argila – Método da “Pipeta” segundo EMBRAPA.

3.4.1 Seleção de compostos indutores de liberação de P no solo

Os compostos orgânicos testados individualmente foram os ácidos acético, láctico, pirúvico, aconítico, cítrico, oxálico, succínico, málico, fumárico e itacônico, os açúcares glicose, frutose, sacarose, arabinose, xilose, manose e galactose, e os aminoácidos alanina, valina, leucina, isoleucina, glicina, histidina, arginina, serina, treonina, prolina, metionina, tirosina, lisina, fenilalanina, triptofano, asparagina, glutamina, ácido glutâmico, ácido aspártico. Um tratamento controle, sem adição de fonte de C, foi também incluído. A fim de facilitar a condução do estudo, os compostos orgânicos foram subdivididos em grupos menores (Ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos) e testados em experimentos distintos. Os experimentos foram montados como descrito acima, em sistema de incubação com solo saturado, e após a incubação, o pH e o P solúvel foram avaliados. Em experimentos paralelos, nas mesmas condições, avaliou-se o P da biomassa microbiana do solo. Os compostos que promoveram os maiores valores de P solúvel e de P microbiano foram selecionados para as etapas subsequentes.

3.4.2 Liberação de P dependente da atividade microbiana ao longo do tempo

Os compostos selecionados na etapa anterior foram testados em experimentos montados como descrito acima, em sistema de incubação com solo saturado, sendo os tubos adicionados de amostras de solo não esterilizado ou esterilizado por autoclavagem a 121 °C e 1 atm durante 20 min, por três vezes, com intervalo de 24 h entre cada autoclavagem. Tubos de cada tratamento foram retiradas a cada 3 dias durante 15 dias de incubação. O pH e o P solúvel foram avaliados no mesmo sobrenadante após a filtração. O P da biomassa microbiana foi avaliado em amostras distintas daquelas usadas nas análises anteriores.

3.4.3 Dinâmica de liberação de P em sistema stirred-flow

A cinética de liberação de P do solo foi realizada em sistema de stirred-flow descrito por Strawn e Sparks (1996). Meio grama de solo seco foi acondicionada na câmara do reator e as soluções de extração foram mantidas em fluxo contínuo de 1 ml min⁻¹ durante 180 min e a 600 rpm em constante agitação. Essas soluções foram preparadas em água ultrapura com os compostos orgânicos selecionados na concentração de 10 mmol L⁻¹. Cada composto foi testado individualmente. Água ultrapura com pH 2.0 (HCL) e 7.0 foi também testada como controles.

Alíquotas da solução de extração foram obtidas a cada 2 min, sendo determinado o P solúvel. Com os dados obtidos foram calculadas as seguintes variáveis, de acordo com Nascimento (2018): Porcentagem de liberação de P em relação ao P total do solo (PPsolúvel); taxas mínima (TLMI) e máxima (TLMA) de liberação de P, tempo de estabilização da taxa de liberação de P (TETL) e valor da taxa de liberação na estabilização (TE) (Figura 1).

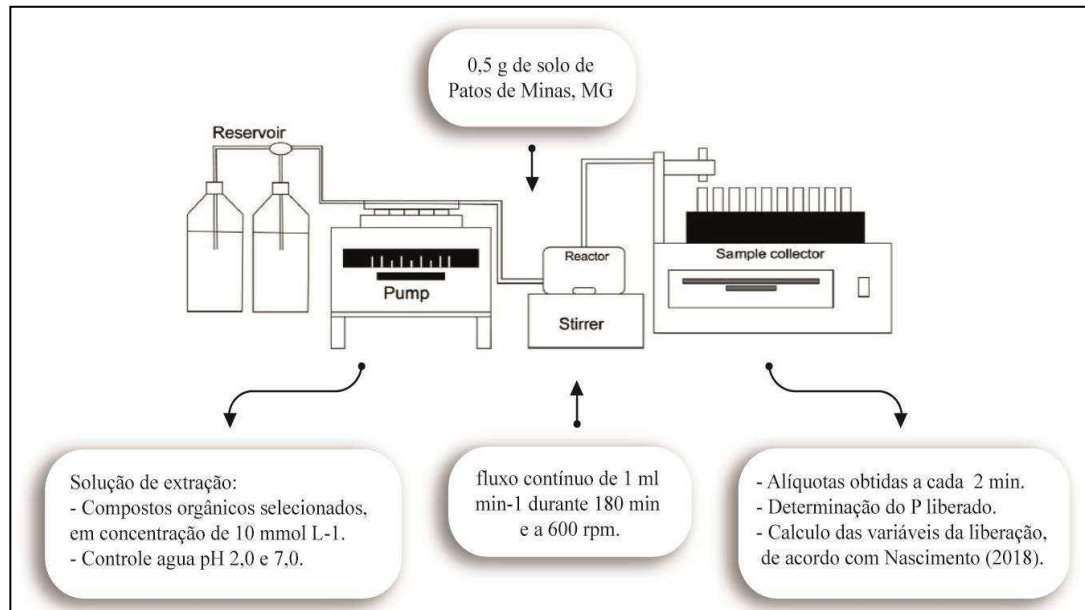


Figura 1. Diagrama metodológico para avaliar a dinâmica de liberação de P em sistema stirred-flow. Fonte: Guedes et al. (2016)

3.4.4 Populações de MSF em solo suplementado com compostos orgânicos selecionados

Para avaliar o efeito dos compostos selecionados na etapa anterior sobre as populações de MSF, um experimento foi montado como descrito acima e, ao final da incubação, procedeu-se a determinação do número de unidades formadoras de colônias totais e solubilizadores de fosfatos. Para tal, os tubos foram agitados vigorosamente e uma alíquota de 1 mL da suspensão de solo foi diluído em 9 mL de solução salina contendo 0,85 % de NaCl. Diluições seriadas foram realizadas até 10^{-6} . Alíquotas de 0,1 ml das diluições foram plaqueadas em ágar NBRIP em triplicata. As placas foram incubadas a 25 °C em BOD e as colônias de microrganismos totais e de MSF foram contadas. Em seguida, determinaram-se as porcentagens de colônias de MSF em relação ao número de colônias totais.

3.4.5 Influência da combinação de compostos orgânicos selecionados sobre a liberação de P

Os compostos selecionados foram testados em todas as combinações possíveis, ou individualmente, combinados dois a dois ou todos agrupados. O sistema de incubação foi como descrito acima. Quando testados individualmente, a concentração de cada composto, em termos de C, correspondeu a 60 mg g⁻¹ de solo. Quando em combinação, frações equivalentes de cada composto foram adicionadas resultando na concentração final de C no meio NBRIP, de 60 mg g⁻¹ de solo. Um tratamento controle, sem adição de fonte de C, foi também incluído. Após a incubação, o pH e o P solúvel foram avaliados no sobrenadante após a filtração. O P da biomassa microbiana foi avaliado no solo em amostras distintas daquelas usadas nas análises anteriores.

3.4.6 Técnicas analíticas

O P solúvel foi analisado pelo método do ácido ascórbico (Braga e Defelipo, 1974) e o pH em potenciômetro de bancada ION pHb800. O P microbiano foi estimado de acordo com o método de Hedley e Stewart (1982) com modificações. Após a incubação, 1 mL de clorofórmio foi adicionado nos tubos de rosca, agitando-se em vórtex a cada 20 s durante 5 min. Tubos-controle, sem adição de clorofórmio, foram manipulados da mesma forma. Quinze mililitros de NaHCO₃ a 1 mol L⁻¹ foram adicionados em ambos os tubos, seguido de agitação por 2 min em vórtex. O sobrenadante foi filtrado e o P determinado como descrito acima. (Braga e Defelipo, 1974.) O P microbiano foi estimado utilizando a seguinte equação:

$$P_{mic} = [(P_{clo} - P_t) / ,] \quad (\text{eq. 1})$$

Onde, P_{mic} = P microbiano (µg g⁻¹), P_{clo} = P medido no tubo com adição com clorofórmio (µg g⁻¹) e P_{ext} = P medido no tubo sem adição de clorofórmio (µg g⁻¹).

3.4.7 Delineamento experimental e análises estatísticas

Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias

comparadas pelo teste de Scott knott a 5 %.

No experimento onde se testou a liberação de P dependente da atividade microbiana ao longo do tempo, utilizou-se delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial do tipo $(4 \times 2 \times 5) \times 3$, onde 4 = fontes de C; 2 = solo esterilizado e não esterilizado; 5 = tempos de avaliação; e 3 = número de repetições. Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA, seguido de análise de regressão. Para esse experimento, os dados registrados ao final da incubação, aos 15 dias, foram submetidos à ANOVA e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Scott knott a 5 % de probabilidade.

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Seleção de compostos indutores de liberação de P no solo

A suplementação do meio NBRIP com diferentes fontes de C, após 15 dias de incubação a 25 °C, promoveu distintos valores de P solúvel e de P microbiano (Figuras 2, 3, 4 e 5). Os ácidos málico, láctico, aconítico e fumárico levaram a valores de P solúvel superiores ao controle sem adição de C, variando de 15,4 a 91,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Figura 2). Em geral, a ordem de eficiência de liberação de P foi a seguinte: ácido málico > ácido aconítico > ácido láctico = ácido fumárico. Os valores de P microbiano superiores ao controle variaram de 65,8 a 191,4 $\mu\text{g g}^{-1}$, sendo os ácidos málico, aconítico, tartárico e fumárico os mais eficientes em promover a imobilização de P na biomassa microbiana (Figura 2). Os valores de P microbiano decresceram na seguinte ordem: ácido málico > ácido aconítico = ácido tartárico = ácido fumárico (Figura 2).

Para os açúcares, nenhum tratamento promoveu valores de P solúvel superiores ao controle, com média de 8,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Figura 3). Já o P microbiano apresentou valores maiores do que os do tratamento controle com NBRIP suplementado com manose, glicose, sacarose, arabinose, xilose, frutose e galactose (Figura 3). Os valores de P microbiano situaram-se na faixa de 52,1 a 170,4 $\mu\text{g g}^{-1}$. A promoção de aumentos no P microbiano decresceu na seguinte ordem: manose > glicose > sacarose > arabinose = xilose > frutose = galactose (Figura 3).

Os aminoácidos foram agrupados em dois conjuntos e testados em experimentos distintos (Figura 4 e 5). No primeiro experimento, a lisina, isoleucina, histidina e arginina promoveu valores de P solúvel superiores aos do controle, com valores na faixa de 3,2 a 4,3 $\mu\text{g g}^{-1}$. Para o P microbiano, os aminoácidos lisina, arginina, isoleucina e histidina promoveram valores significativamente maiores do que os do meio sem adição de C, variando de 54 a 79,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Figura 4). Os aminoácidos mais eficientes em promover aumentos no P microbiano foram: lisina = arginina = isoleucina > histidina (Figura 4). No segundo experimento, para o P solúvel, os aminoácidos asparagina, glicina, glutamina, ácido aspártico e alanina levaram a valores dessa variável superiores aos do controle, na faixa de 2,1 a 7,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Figura 5). Para o P microbiano, os maiores valores foram de 80,8 e 124,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ para os aminoácidos glicina e ácido aspártico, respectivamente (Figura 5).

Para as etapas subsequentes, os compostos com maiores níveis de solubilização de P de cada classe foram selecionados, a saber, o ácido málico, a manose e o ácido aspártico.

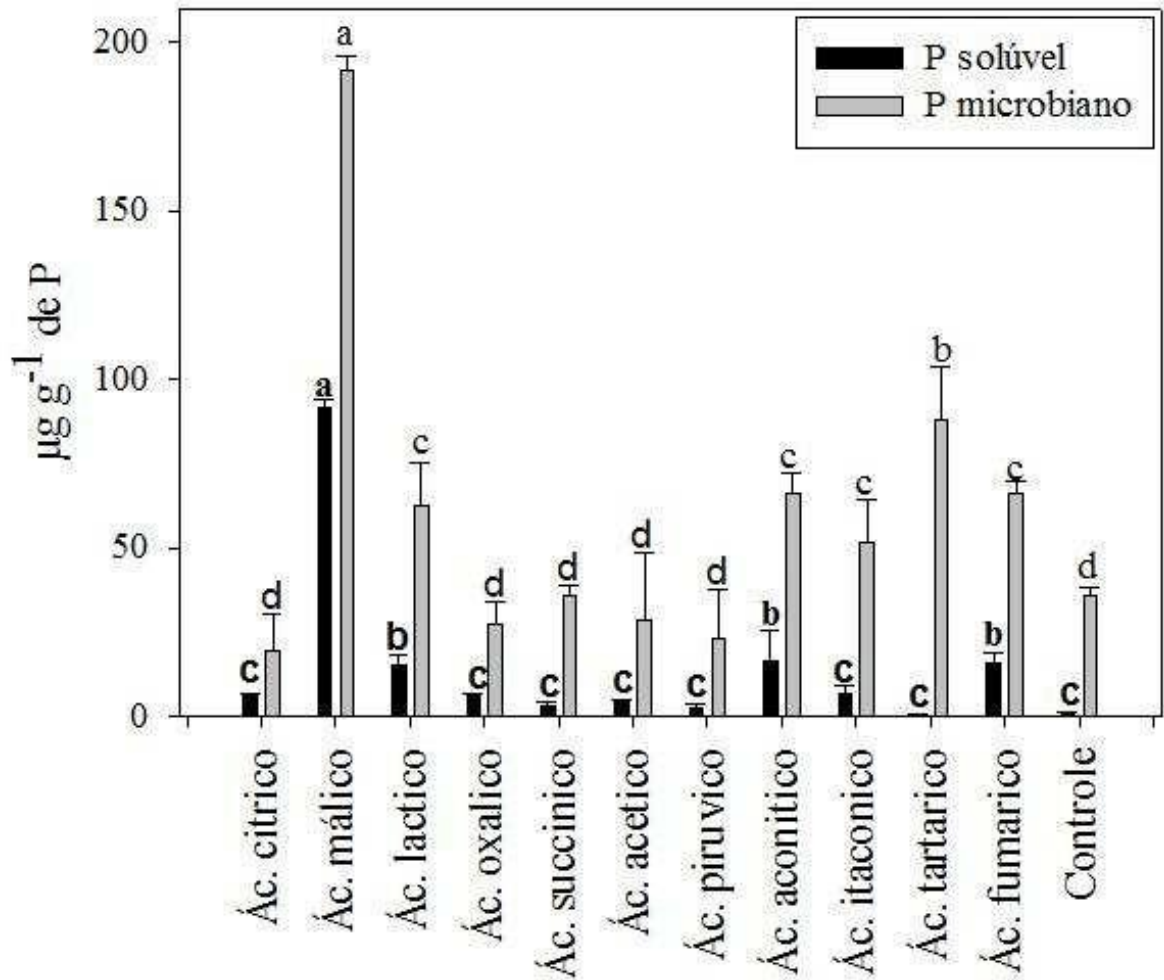


Figura 2. Fósforo solúvel e fósforo microbiano medido no sobrenadante do meio NBRIP modificado, suplementado com diferentes ácidos orgânicos como fonte de carbono, após incubação de amostra de Latossolo Vermelho de Patos de Minas, MG, por 15 dias a 25°C. Colunas da mesma cor e com a mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott knott ($p < 0,05$).

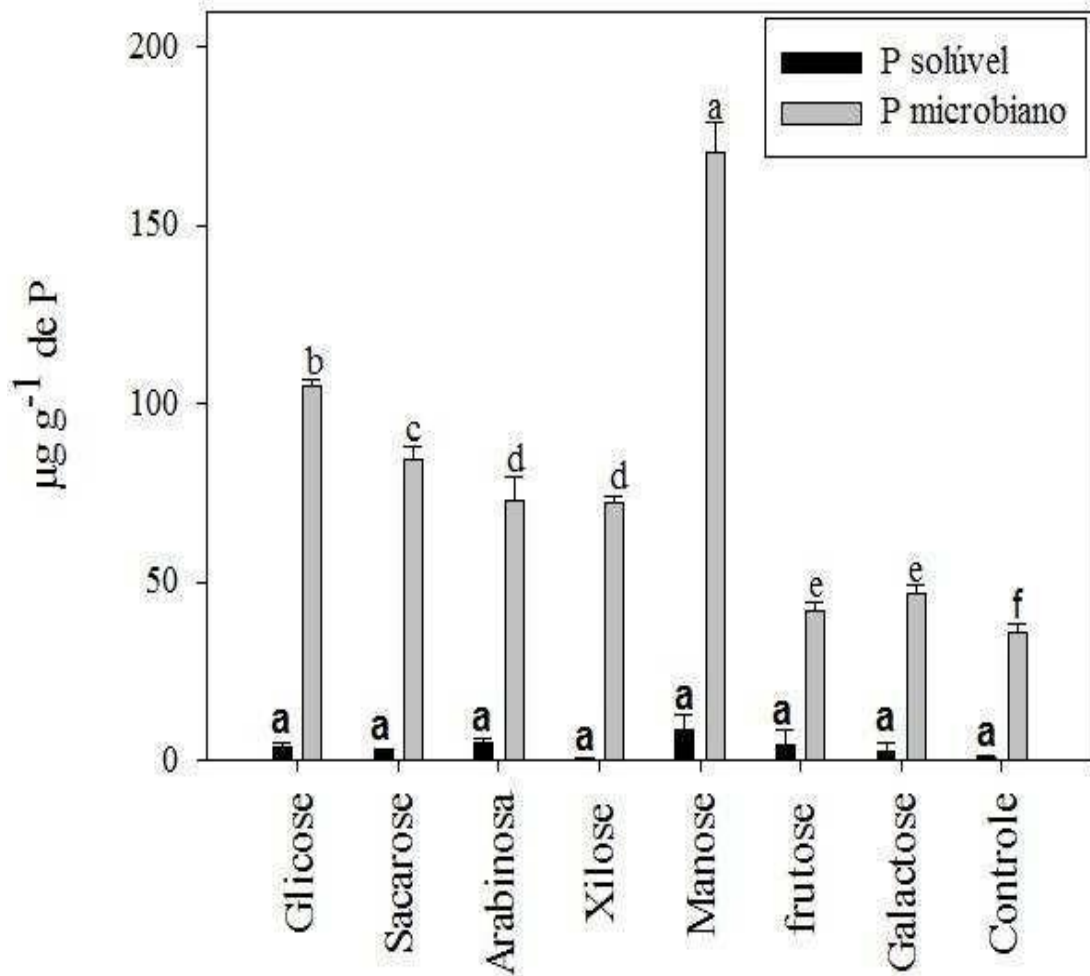


Figura 3. Fósforo solúvel e fósforo microbiano medido no sobrenadante do meio NBRIP modificado, suplementado com diferentes açúcares como fonte de carbono, após incubação de amostra de Latossolo Vermelho de Patos de Minas, MG, por 15 dias a 25°C. Colunas da mesma cor e com a mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott knott ($p < 0,05$).

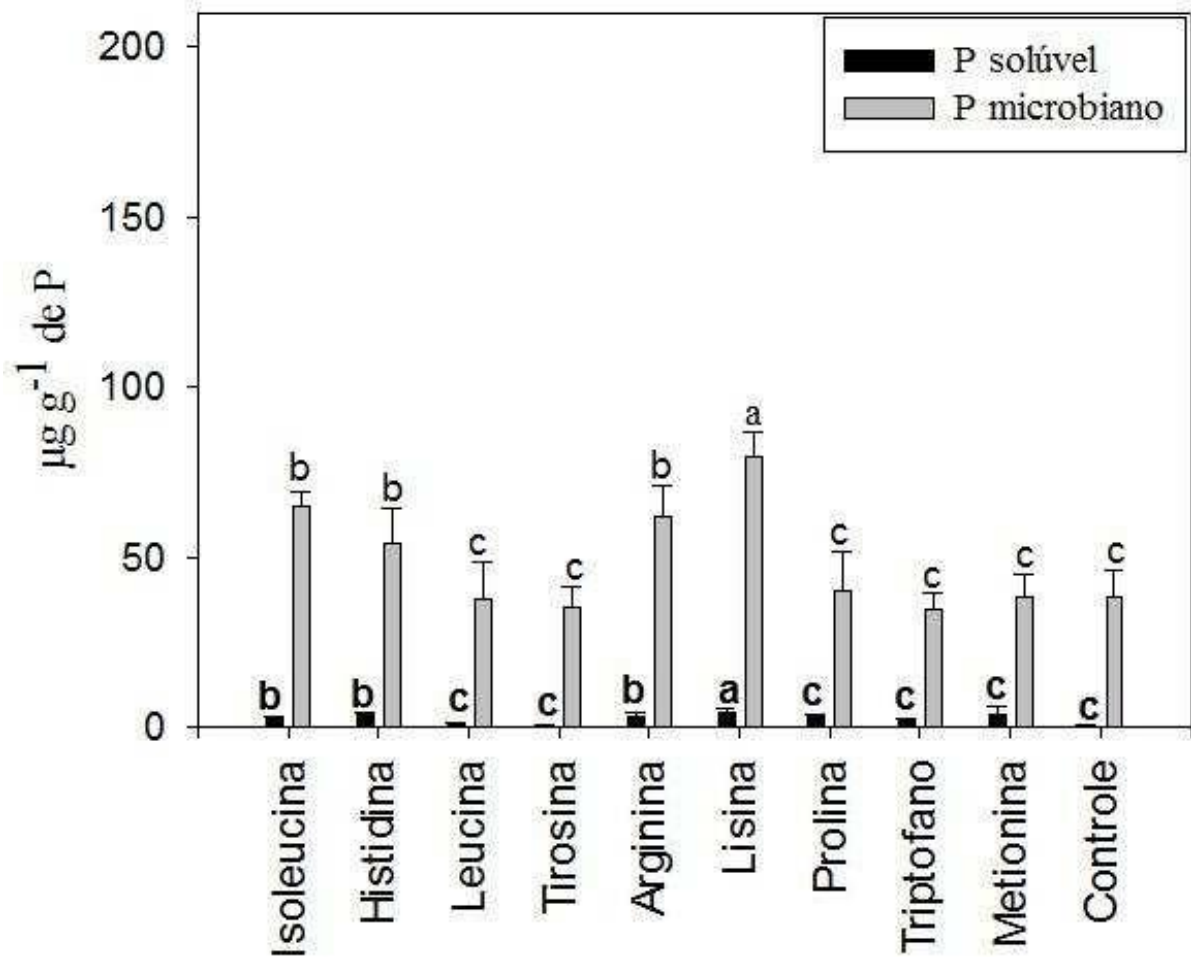


Figura 4. Fósforo solúvel e fósforo microbiano medido no sobrenadante do meio NBRIP modificado, suplementado com diferentes aminoácidos como fonte de carbono, após incubação de amostra de Latossolo Vermelho de Patos de Minas, MG, por 15 dias a 25°C. Colunas da mesma cor e com mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott knott ($p < 0,05$).

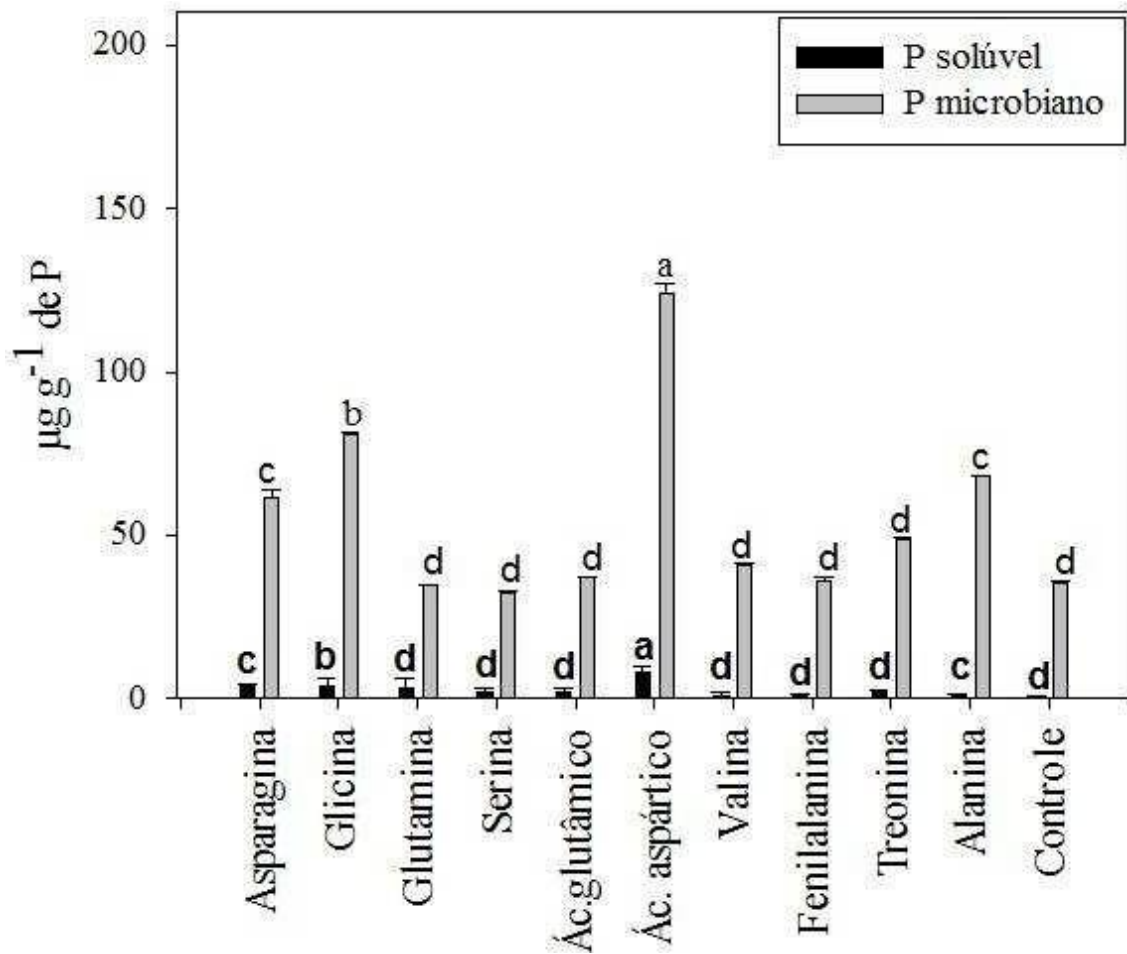


Figura 5. Fósforo solúvel e fósforo microbiano medido no sobrenadante do meio NBRIP modificado, suplementado com diferentes aminoácidos como fonte de carbono, após incubação de amostra de Latossolo Vermelho de Patos de Minas, MG, por 15 dias a 25°C. Colunas da mesma cor e com mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott knott ($p < 0,05$).

3.5.2 Liberação de P dependente da atividade microbiana ao longo do tempo

Durante o período de incubação de 15 dias, a suplementação do meio NBRIP com ácido málico, manose e ácido aspártico levou a distintos comportamentos de liberação de P e de imobilização do elemento na biomassa microbiana (Figura 6a, b, c). O tempo de incubação de 15 dias foi suficiente para se atingir platôs de estabilização das variáveis P solúvel, P microbiano e P solúvel (Figuras 6a, b, c).

Para o P solúvel, não houve diferenças na liberação do elemento aos 15 dias de incubação nos tratamentos com solo esterilizado e não-esterilizado (Figura 6a). Ao se observar a dinâmica do P solúvel ao longo da incubação do solo não estéril (Figura 6a), verifica-se a ocorrência de quatro etapas distintas de liberação de P no sobrenadante: a primeira, de 0 aos 3 dias, a segunda, de 3 aos 9 dias, a terceira, de 9 aos 12 dias, e quarta de 12 aos 15 dias (figura 6a). O composto que levou à maior liberação de P em ambas as condições de esterilização do solo foi o ácido málico, com média final aos 15 dias de incubação de $180,1 \mu\text{g g}^{-1}$ (Figura 6a). Com exceção do ácido málico, somente a manose promoveu valores de P solúvel superiores aos do controle no solo não esterilizado, com $10,7 \mu\text{g g}^{-1}$. No solo esterilizado, os valores de P solúvel nos tratamento com manose e ácido aspártico foram iguais aos do controle, com média de $3,91 \mu\text{g g}^{-1}$ (dados não mostrados).

A suplementação do meio NBRIP com ácido málico, manose e ácido aspártico, nos tratamentos com solo não esterilizado, promoveram aumentos significativos no P microbiano, com valores finais, aos 15 dias de incubação, de 191,5, 170,4 e $124,2 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente (Figura 6b). Os teores de P microbiano atingiram platôs de estabilização a diferentes tempos de incubação, indicando o fim da fase de crescimento microbiano (Figura 6b). A estabilização do P microbiano ocorreu aos três dias de incubação para a manose, aos seis dias para o ácido aspártico e aos nove dias para o ácido málico (Figura 6b). Verificou-se que a suplementação do meio com C levou à imobilização na biomassa microbiana de quantidades de P semelhantes àquelas liberadas no sobrenadante do meio NBRIP, nos tratamentos com ácido málico, e maiores, nos tratamentos com manose e ácido aspártico (Figura 6a, b).

Em geral, os valores de P solúvel obtidos aos 15 dias de incubação, nos tratamentos com solo não esterilizado, foram maiores do que aqueles obtidos com solo esterilizado (Figura 6c). Nesse caso, os valores obtidos corresponderam a 373,8, 181,2 e $127,9 \mu\text{g g}^{-1}$ para os tratamentos com ácido málico, manose e ácido aspártico, respectivamente (Figura 6c).

Para os tratamentos com solo esterilizado, os valores obtidos ao final da incubação

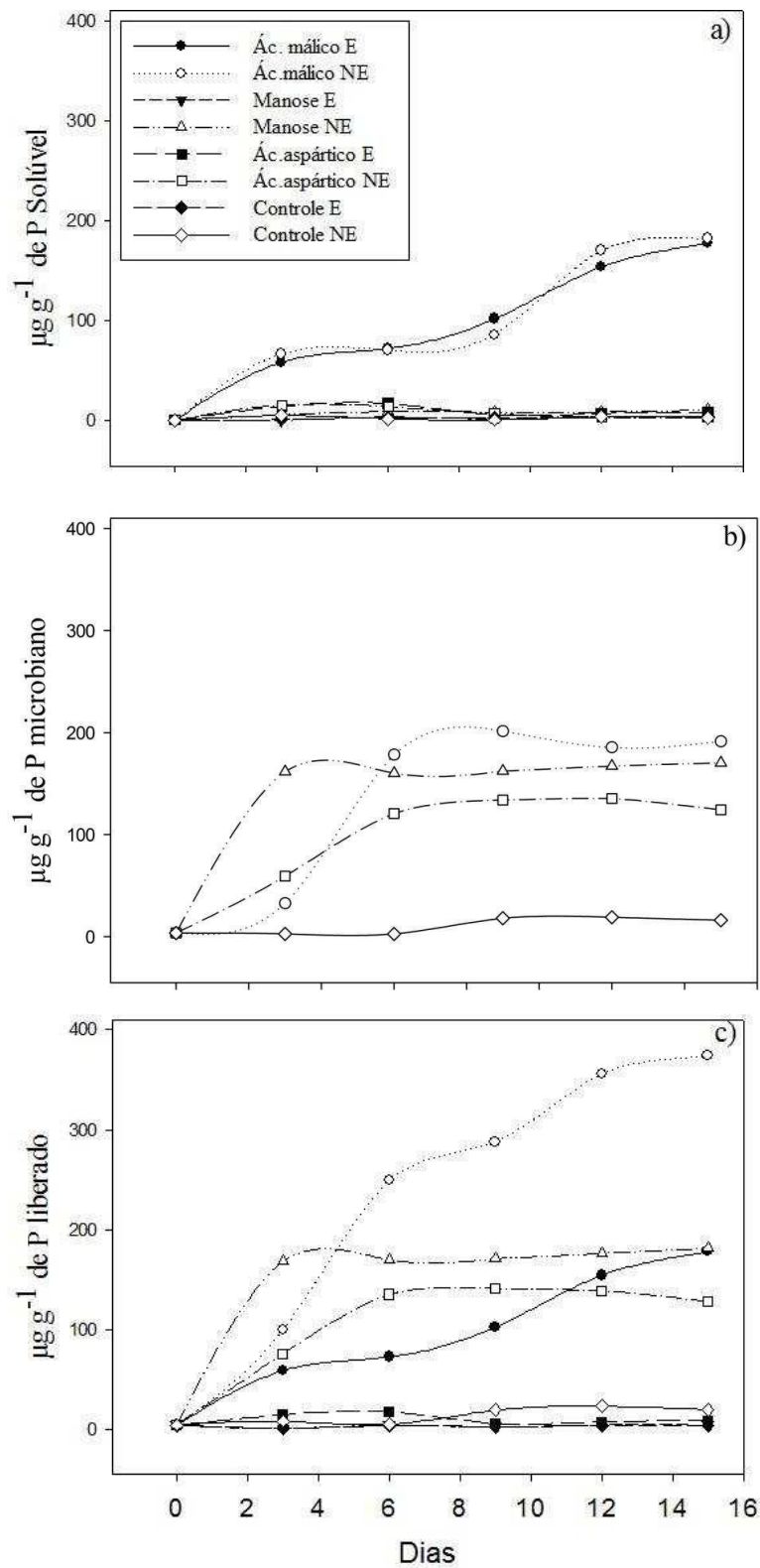


Figura 6. Fósforo solúvel (a), fósforo microbiano (b) e fósforo liberado (c), medido no sobrenadante do meio NBRIP modificado, suplementado com ácido málico, manose ou ácido aspártico como fonte de carbono, durante incubação de amostra de Latossolo Vermelho de Patos de Minas, MG, por 15 dias a 25 °C.

foram de 177,9, 4,05 e 8,34 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o ácido málico, a manose e o ácido aspártico, respectivamente (Figura 6c). O ácido málico, mesmo nos tratamentos com solo esterilizado, promoveu valores de P solúvel consideravelmente altos (Figura 6c).

3.5.3 Dinâmica de liberação de P em sistema stirred-flow

Os compostos selecionados promoveram a liberação de P no sistema de stirred-flow, sendo o ácido málico o composto mais eficiente (Figura 7). As quantidades de P solúvel variaram de 4,8 a 72,7 $\mu\text{g g}^{-1}$, sendo a água a pH 7,0 o tratamento menos eficaz (Tabela 2). A eficiência de liberação de P variou na seguinte ordem: ácido málico > ácido aspártico = água pH 2,0 = manose > água pH 7,0 (Tabela 2). As porcentagens de P solúvel, calculadas com base no P solúvel do solo, variam de 0,09 a 1,45 % (Tabela 2). O ácido málico promoveu os maiores valores de TLMI e de TLMA (Tabela 2). A manose foi o composto que levou aos maiores valores de TETL, no entanto, nesses tratamentos, os demais parâmetros cinéticos foram inferiores aos obtidos com ácido málico (Tabela 2).

A água a pH 2,0 apresentou valores de P solúvel, PPsolúvel, TLMA e TETL inferiores àqueles obtidos com ácido málico e ácido aspártico, indicando que a concentração de H^+ não foi o único fator envolvido na liberação de P a partir do solo (Tabela 2).

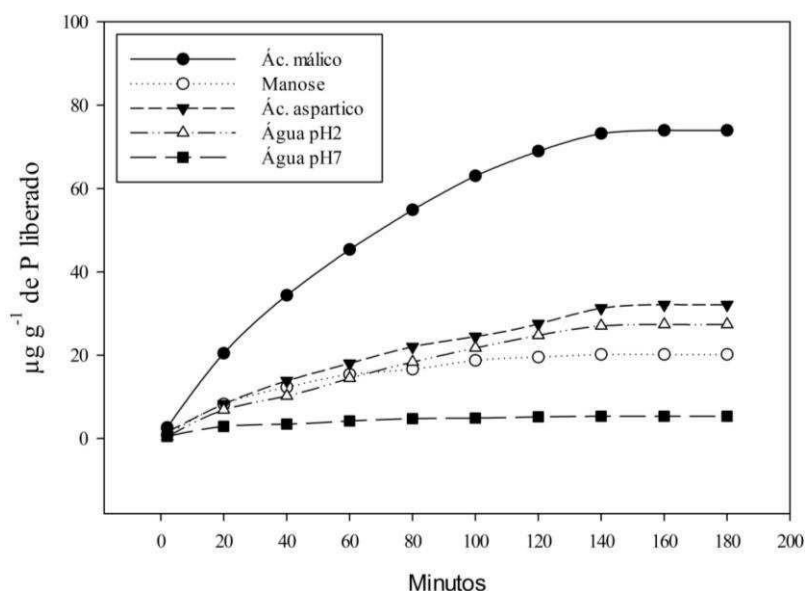


Figura 7. P solúvel de amostras de Latossolo Vermelho de Patos de Minas, MG, em sistema stirred flow, com fluxo contínuo de 1 mL min^{-1} de solução extratora de ácido málico, manose ou ácido aspártico a 10 mmol L^{-1} durante 180 min a 600 rpm. Água a pH 2,0 e água a pH 7,0 foram usadas como controles da liberação de P em função da concentração de H^+ .

Tabela 2. P solúvel, porcentagem de liberação de P em relação ao P total do solo (PPtotal), taxa de liberação mínima (TLMI) e máxima (TLMA), tempo de estabilização das taxas de liberação (TETL) e taxa de estabilização (TE) medidos em sistema de stirred flow, com fluxo contínuo de 1 mL min⁻¹ de solução extratora de ácido málico, manose ou ácido aspártico a 10 mmol L⁻¹ durante 180 min a 600 rpm. Água a pH 2,0 e água a pH 7,0 foram usadas como controles da liberação de P em função da concentração de H⁺.

.SOLUÇÃO EXTRATORA	P SOLÚVEL (µg)	PPtotal (%)	TLMI -1 (µg min⁻¹)	TLMA -1 (µg min⁻¹)	TETL (min)	TE (µg min⁻¹)
Ácido Málico	72,74 a	1,45 a	0,21	1,18	69	0,21
Manose	17,62 c	0,35 c	0,01	0,39	72	0,02
Ácido aspártico	31,22 b	0,62 b	0,10	0,57	62	0,15
Água pH 2,0	29,45 b	0,58 bc	0,21	0,34	43	0,25
Água pH 7,0	4,8 d	0,09 d	0,05	0,43	10	0,07

Nas colunas de P solúvel e PPtotal, os valores de média seguidos da mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott knott (p<0,05).

3.5.4 Populações de MSF em solo suplementado com compostos orgânicos selecionados

A suplementação do meio NBRIP com ácido málico e manose proporcionaram aumentos do número solúvel de UFC de microrganismos no solo em comparação ao tratamento controle, sem adição de C (Figura 8a). Já para o número de UFC de MSF, os três compostos testados promoveram maiores densidades populacionais desses microrganismos (Figura 8b). As porcentagens de MSF obtidas nos tratamentos com suplementação do meio NBRIP e no controle decresceram na seguinte ordem: ácido málico (89,7 %) > manose (79 %) > ácido aspártico (48,2 %) > controle (29,7 %) (Figura 12c).

3.5.5 Influência da combinação de compostos orgânicos selecionados sobre a liberação de P em sistema de incubação saturado

O ácido málico foi o composto que proporcionou maiores valores de P solúvel equivalendo a $60,3 \mu\text{g g}^{-1}$ (Figura 9a). As combinações dois a dois dos compostos selecionados e a dos três juntos não promoveram valores de P solúvel maiores dos que os observados para meio NBRIP suplementado com ácido málico sozinho (Figura 9a). As combinações que propiciaram aumentos do P solúvel significativamente superiores ao controle foram aquelas que continham ácido málico (Figura 9a). Para as combinações de ácido málico + ácido aspártico e ácido málico + manose, os valores de P solúvel corresponderam a $52,7$ e $46,4 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente (Figura 9a). A combinação dos três compostos levou a valores de P disponível inferiores àqueles obtidos nos tratamentos com ácido málico e na combinação ácido málico + ácido aspártico (Figura 9a).

Para o P microbiano, os maiores valores foram observados para o tratamento com ácido málico sozinho e para algumas das combinações que continham esse composto, variando de $91,6$ a $136,9 \mu\text{g g}^{-1}$ (Figura 9b). A combinação do ácido aspártico + manose resultou em valores de P microbiano semelhantes aos do controle (Figura 9b).

Para o P solúvel, as respostas foram semelhantes àquelas obtidas para o P solúvel e para o P microbiano, com valores superiores ao controle, que variaram de $45,7$ a $197,5 \mu\text{g g}^{-1}$ (Figura 9c). Nenhuma combinação de compostos orgânicos promoveu valores de P microbiano e P solúvel superiores aos obtidos nos tratamentos com ácido málico sozinho (Figura 9).

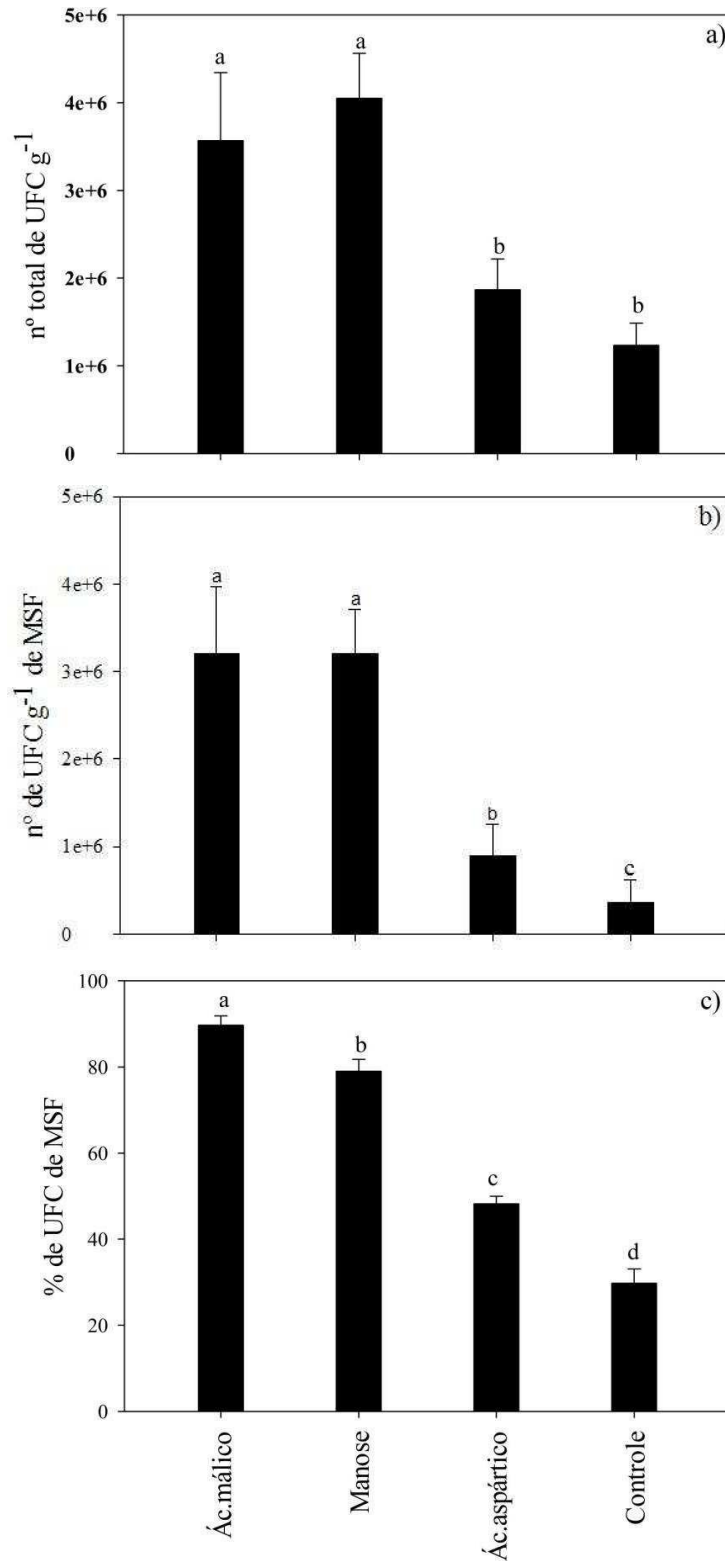


Figura 8. Unidades formadoras de colônias (UFC) [a] totais, número de UFC de microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) [b] e porcentagem de UFC de MSF [c] medidas após a incubação de amostras de Latossolo Vermelho de Patos de Minas, MG, por 15 dias a 25°C, em meio NBRIP modificado, suplementado com ácido málico, manose e ácido aspártico. Um controle sem adição de carbono foi também incluído. Barras com mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott knott ($p < 0,05$).

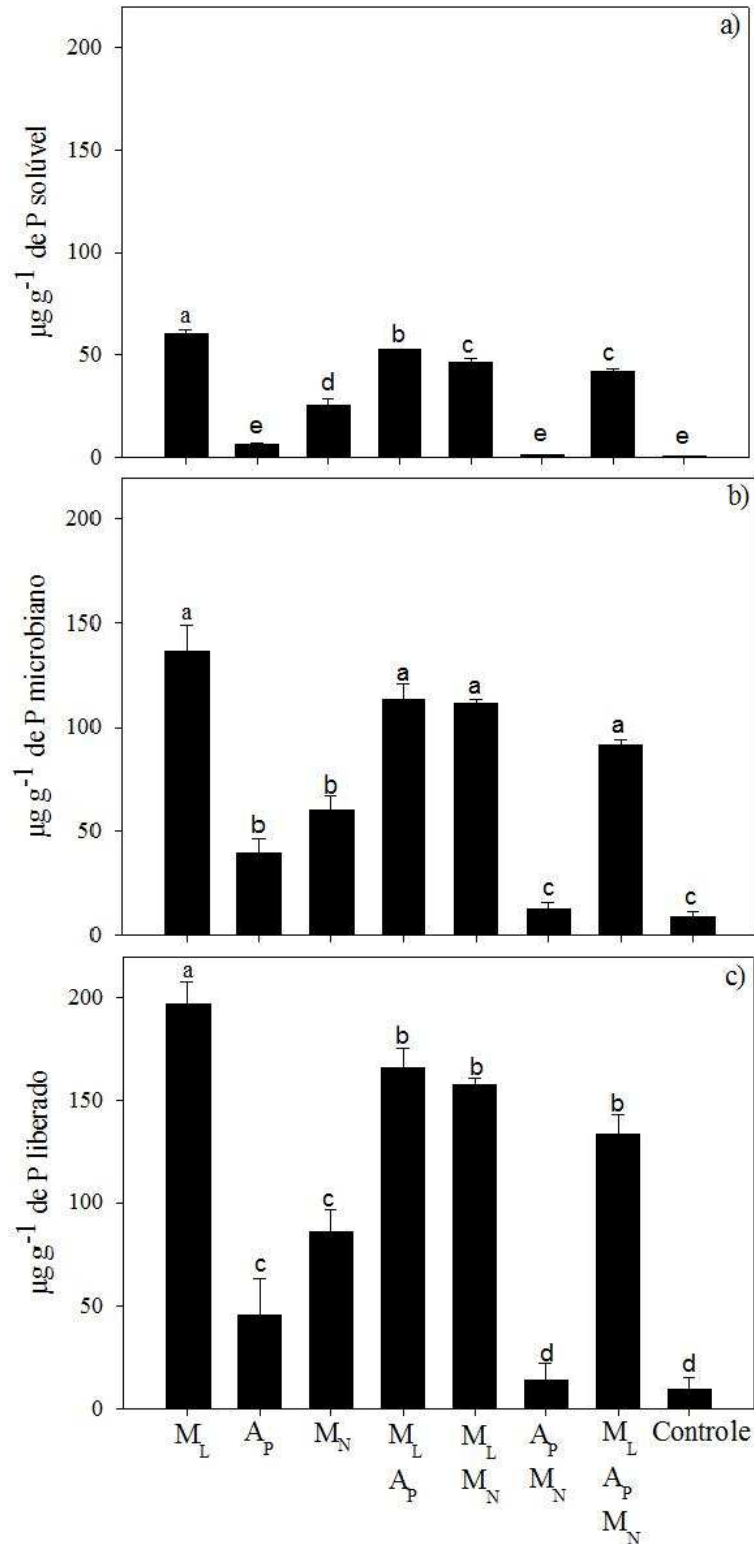


Figura 9. Fósforo solúvel (a), fósforo microbiano (b) e fósforo liberado (c) medidos no sobrenadante do meio NBRIP modificado, suplementado com ácido málico (M_L), manose (M_N) e ácido aspártico (A_P) e suas combinações, após incubação de amostra de Latossolo Vermelho de Patos de Minas, MG, em sistema com solo saturado, por 15 dias a 25°C. Barras com mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott knott ($p < 0,05$).

3.6 DISCUSSÃO

Do total de 39 compostos testados neste trabalho, os ácidos málico, láctico, acenótico, fumárico, a manose, a lisina e o ácido aspártico foram capazes de liberar P das amostras de solo em quantidades significativas no sobrenadante do meio NBRIP ou nos extratos de solo obtidos. O P disponibilizado por esses compostos, por mecanismos diretos e, ou indiretos, correspondeu também ao P microbiano, indicando a ocorrência simultânea de significativa imobilização do nutriente na biomassa microbiana. A imobilização atingiu valores de 67 a 99 % do P total disponibilizado, revelando que a simples medição de P solúvel no sobrenadante do meio, como proposto por Debnath et al., (1994), subestima o liberado de P solúvel pela microbiota nas medições de potencial de solubilização de P do solo. No presente trabalho, o P microbiano foi contabilizado como P disponível em face das rápidas taxas de ciclagem relatadas para biomassa microbiana (Richardson et al, 2009).

A concentração de C do meio de 3,99 g L⁻¹ foi equivalente à utilizada no meio NBRIP na forma de glicose. Esse valor é comumente usado para a determinação do potencial de solubilização de P no solo (Debnath et al., 1994; Massenssini et al., 2015). Os valores adotados no presente trabalho foram maiores do que aqueles comumente relatados para os exsudados radiculares de várias espécies vegetais (Carvalhais et al., 2011; Chaparro et al., 2013; Li et al., 2013; Neumann et al., 2014; Canarini et al., 2019). No entanto, a rizosfera é ambiente estritamente regulado (Sasse et al., 2018), onde os processos de transformação dos nutrientes visam atender tão somente à demanda da planta e da microbiota associada (Jones et al., 2009; Valadares et al., 2018). É pouco provável que concentrações equivalentes às das deposições de C rizosféricas in situ, na faixa micromolar, poderiam liberar quantidades detectáveis de P no curto período de incubação de 15 dias adotado nos experimentos. De fato, em ensaios preliminares, não foram detectados aumentos na disponibilização de P em comparação aos controle sem adição de C, quando as concentrações de ácido málico, manose e ácido aspártico foram inferiores 3 mmol L⁻¹.

O ácido málico foi o composto mais eficiente na disponibilização de P no solo, resultando em valores de P solúvel de 374 µg g⁻¹ (Figura 6c). Esse composto é importante intermediário do ciclo de Krebs (Chi et al., 2014) e tem sido relatado como agente solubilizador de fosfato de rocha in vitro (Panhwar et al., 2013; Behera et al., 2017). O mecanismo de solubilização desse ácido dicarboxílico deve envolver a complexação de Fe, Al e Ca (Timberlake, 1964; Bazin et al., 1995; Kopittke et al., 2017), associado à acidificação do meio.

Interessantemente, plantas sob deficiência de P apresentam exsudação de citrato e malato de vinte a quarenta vezes maior do que quando sob condições normais de disponibilidade do nutriente (Vance et al., 2003). Em conjunto, esses dados sugerem a possibilidade de seleção e melhoramento de plantas e microrganismos que sejam mais eficientes na utilização do P do solo por meio da maior produção de ácido málico.

A manose e o ácido aspártico promoveram valores menores de P solúvel, P microbiano e P total quando comparado ao ácido málico (Figura 6). O açúcar é monossacarídeo da parede celular microbiana (Hibata et al., 2012; Hu et al., 2016). Já o ácido aspártico é um dos aminoácidos encontrados em maior quantidade nos exsudados radiculares de diversas espécies. (Simons et al., 1997; Richardson et al., 2009). Não existem relatos da participação desses compostos nos processos de solubilização de P *in vitro* ou no solo por meio da complexação de cátions. No experimento com stirred-flow, os valores de P obtidos na presença de manose e ácido aspártico não diferiram da água a pH 2,0, indicando que a acidez das soluções, 4,0 e 2,8, respectivamente, deve ter sido o principal fator de disponibilização de P nesse sistema. Assim, hipotetizamos que a liberação de P no solo suplementado com esses compostos está relacionada, de fato, a maiores valores de atividade e biomassa microbianas, ocasionando maior mineralização da matéria orgânica do solo por meio da atividade de fosfatases. Nesses tratamentos, os valores de P solúvel foram menores, enquanto a imobilização do elemento na biomassa microbiana atingiu valores de 94 a 95%.

No tratamento com ácido málico, com avaliações periódicas até os 15 dias de incubação do solo esterilizado, verificou-se a ocorrência de concentrações significativas de P no sobrenadante, indicando a ocorrência de processos de liberação do nutriente independentes da atividade biológica do solo (Figura 6a). No entanto, os valores de P solúvel nesse tratamento foram idênticos ao do tratamento com solo não esterilizado, para o qual se esperava valores de P solúvel maiores em face da atividade biológica aí presente. Ao analisarmos o P microbiano desses tratamentos, verificou-se a ocorrência de elevada imobilização de P para o solo não esterilizado, resultando em valor de P total de 374 $\mu\text{g g}^{-1}$, muito superior ao de 178 $\mu\text{g g}^{-1}$ do solo esterilizado. Com base nesses dados, evidenciou-se que o ácido málico atua diretamente nos reservatórios de P do solo, por mecanismos puramente químicos, e indiretamente, pelo estímulo à atividade de liberação de P da microbiota do solo. Os mecanismos diretos devem envolver a dissolução de minerais primários e secundários de P no solo, a exemplo dos fosfatos de Fe, Al e Ca. Adicionalmente, como relatado para outros ácidos orgânicos (Keiluweit et. al., 2015; (Chowdhury et al., 2014), não se pode descartar a possível ação do ácido málico como

agente desestabilizador de complexos organominerais e agregados do solo com a liberação de P e matéria orgânica para a solução. Essa hipótese deve ser ainda testada.

A ocorrência de quatro fases na dinâmica de liberação de P no sobrenadante foi observada para o tratamento com ácido málico no solo não esterilizado (Figura 6a). A segunda e a quarta fases corresponderam a períodos de estabilização da liberação de P no sobrenadante. Ao analisarmos o P microbiano, verificou-se que essa variável estabilizou-se no período de 6 a 9 dias de incubação. Portanto, a fase de maior crescimento da microbiota, revelada pelo incremento do P microbiano, coincidiu com a primeira fase de estabilização do P solúvel, sugerindo que nessas etapas o P disponibilizado foi imediatamente imobilizado na biomassa microbiana, resultando na estabilização do P solúvel (Figura 6a). Com a estabilização do crescimento microbiano, observou-se novamente aumentos do P solúvel, indicando que a imobilização tornou-se inferior à liberação do elemento no sobrenadante. A permanência da biomassa microbiana na fase estacionária e a retomada do aumento do P solúvel pode ser devido a limitações na disponibilidade de nutrientes minerais. Em estudos *in vitro*, a solubilização de P foi favorecida na fase estacionária, quando, devido a limitações na disponibilidade de nutrientes minerais, o metabolismo microbiano foi dirigido para a produção de ácidos orgânicos, responsáveis pela solubilização de fosfatos, em detrimento da produção de biomassa (Caixeta et al., 2014).

No sistema de stirred-flow, a água a pH 2,0 foi usada como referência para o processo de solubilização de fosfato mediada pela concentração de H⁺ (Nascimento, 2018). A manose e o ácido aspártico apresentaram valores de P solúvel estatisticamente similares ao da água pH 2,0, indicando que a acidez das soluções contendo esses compostos foi um dos mecanismos diretos de liberação de P nesse sistema. O valor de P solúvel com o uso da solução de ácido málico, com pH 2,5, foi 2,47 vezes maior do que aquele obtido com a água pH 2,0, evidenciando que, além da acidificação do meio, o ácido málico disponibilizou P por outros mecanismos, incluindo a complexação de cátions presentes nos minerais primários e secundários do solo. A porcentagem do P total do solo solúvel no stirred-flow variou de 0,35 a 1,45 %, valores inferiores aos encontrados por Nascimento (2018). Esse fato deve-se ao elevado conteúdo de P total do Latossolo Vermelho de Patos (0,5 %) e às diferenças de eficiência de solubilização por diferentes ácidos orgânicos. Em sistemas *in vitro*, sem a presença da microbiota do solo, o ácido oxálico apresenta melhor desempenho que o málico (Mendes et al., 2014; Mansur, 2017; Nascimento, 2018). No entanto, a pequena porcentagem do P solúvel pelo ácido málico no sistema de stirred-flow equivale à liberação significativa de 145 Kg ha⁻¹ de P.

Os compostos testados apresentaram diferentes capacidades de estimular a multiplicação

das populações de microrganismos do solo. O ácido málico foi o mais eficiente promovendo porcentagens de MSF de 89 %, seguido da manose, com 79 %, e do ácido aspártico, com 48 %. Na literatura, as porcentagens de MSF encontradas no solo variam de 0,1 a 8 %, valores inferiores ao de 25 % registrado para o controle sem adição de C usado neste trabalho. Possivelmente, o Latossolo de Patos de Minas, com elevado conteúdo de P total, possua naturalmente populações mais elevadas de MSF. O meio utilizado para a contagem de microrganismos totais e de MSF foi o NBRIP (Nautiyal, 1999) que tem sido amplamente usado para o isolamento e cultivo de MSF (Kumar Johri et al., 1999; Kapri e Tewari, 2010; Park et al., 2011; Mendes et al., 2014; Massenssini et al., 2015; Behera et al., 2017; Li et al., 2017). Assim, alternativamente, o meio NBRIP pode ter favorecido os MSF em relação aos outros grupos de microrganismos presentes no solo. Apesar disso, o estímulo das populações de MSF pelos três compostos testados foi claramente evidenciado, constituindo o primeiro relato da influência positiva do ácido málico, da manose e do ácido aspártico sobre esse grupo de microrganismos. Efeitos benéficos do ácido málico sobre certos grupos de microrganismos do solo já foram relatados anteriormente. Esse composto exsudado na rizosfera de *Arabidopsis thaliana* aumentou a colonização rizosférica de microrganismos benéficos à planta, a exemplo de *Bacillus subtilis*, agente de biocontrole de fitopatógenos. (Rudrappa et al., 2008). É possível que os demais compostos testados e que promoveram aumentos significativos no P solúvel e no P microbiano possam exercer influências semelhantes sobre as populações de MSF. Essa hipótese deverá ser testada em experimentos posteriores. Os dados obtidos no presente trabalho sugerem que plantas com maior exsudação de ácido málico, em condições de deficiência de P, conforme relatado por Vance et al. (2003), possam favorecer diretamente a colonização rizosférica por MSF e, conseqüentemente, a disponibilização de P para a planta.

No experimento de combinação, o ácido málico sozinho foi superior às demais combinações de compostos. As combinações com melhor desempenho foram todas aquelas com ácido málico na composição. Esse composto deve favorecer a disponibilização de P no solo por meio de mecanismos diretos, envolvendo a acidificação do meio, a complexação de cátions e o estímulo à multiplicação de MSF. Outros efeitos indiretos são também possíveis e devem envolver mudanças no metabolismo microbiano, nas interações da microbiota do solo com a matéria orgânica e na atividade de fosfatases. Interessantemente, há relatos de literatura de que esse composto pode ocasionar aumentos no efeito priming rizosférico, levando à maior degradação da matéria orgânica (Chowdhury et al., 2014). No presente trabalho, foi evidenciada a capacidade três compostos, comumente encontrados na rizosfera, de promover aumentos na disponibilização de P a partir do solo. O ácido málico, a manose e o ácido aspártico atuam por

processos de disponibilização de P por meios químicos diretos, assim como indiretamente pela estimulação de comunidades microbianas específicas capazes de solubilizar fosfatos do solo. Estudos posteriores serão necessários para se determinar quais reservatórios de P do solo são acessados por meio da ação direta ou indireta desses compostos. Possivelmente, a dessorção de P pode ser um dos mecanismos envolvidos, haja vista a capacidade do fungo *A. niger* FS1 em dessorver P (Nascimento, 2019). De forma geral, atividade microbiana relatada no presente trabalho aponta para o potencial da microbiota do solo em acessar reservatórios menos lábeis do nutriente, haja vista que as quantidades de P solúvel disponibilizadas, somando-se o P solúvel com o P microbiano, após a adição dos compostos selecionados, foram significativamente maiores do que o P extraído do solo com o extrator de Mehlich 1 (Tabela 1). Assim, microrganismos e plantas capazes de produzir quantidades mais elevadas de ácido málico podem levar à melhoria nas taxas de aproveitamento de adubos fosfatados aplicados ao solo.

3.7 CONCLUSÕES

Compostos comumente exsudados pelas raízes, a exemplo do ácido málico, da manose e do ácido aspártico, quando adicionados ao solo, aumentam a disponibilidade de P em solução e na biomassa microbiana. A disponibilização de P ocorre por mecanismos dependentes e independentes da atividade da microbiota, podendo envolver a acidificação do meio, a complexação de cátions e a estimulação de populações microbianas que atuam no processo. O ácido málico, a manose e o ácido aspártico promovem aumentos nas densidades populacionais de MSF no solo. Parte significativa do P solúvel em função da adição de compostos orgânicos ao solo é imobilizada na biomassa microbiana, tornando-se reservatório lábil desse nutriente. Esses compostos têm maior potencial de liberação de P em ambientes saturados, comuns na rizosfera.

3.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afzal I, Khan Z, Sikandar S, Shahzad S. Plant beneficial endophytic bacteria : Mechanisms , diversity ,host range and genetic determinants. *Microbiol Res.* 2019;221:36–49.
- Alori ET, Glick BR, Babalola OO. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Front Microbiol.* 2017a;8:1–8.
- Bazin H, Bouchu A, Descotes G, Petit-ramel M. Comparison of calcium complexation of some carboxylic acids derived from d-glucose and d-fructose. *Can J Chem.* 1995;73:1338–1347.
- Behera BC, Yadav H, Singh SK, Mishra RR, Sethi BK, Dutta SK, Thatoi HN. Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India. *J Genet Eng Biotechnol.* 2017;15:169–178.
- Braga J, Defelipo B. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solos e plantas. *Rev cereal.* 1974;21:73–85.
- Caixeta S, Mendes GDO, Silva UC, Silva IR, Ribeiro júnior JI, Dutra Costa M. Decreased mineral availability enhances rock phosphate solubilization efficiency in *Aspergillus niger*. *Ann Microbiol.* 2014;65:745–751.
- Canarini A, Kaiser C, Merchant A, Richter A, Wanek W. Root exudation of primary metabolites : mechanisms and their roles in plant responses to environmental stimuli. *Front Plant Sci.* 2019;10:157.
- Canarini A, Merchant A, Dijkstra FA. Rhizosphere drought effects on *helianthus annuus* and glycine max metabolites : from phloem to root exudates. *Rhizosphere.*2016;2:85–97.
- Carminati A, Moradi AB, Vetterlein D, Vontobel P, Lehmann E, Weller U, Vogel HJ, Oswald SE. Dynamics of soil water content in the rhizosphere. *Plant Soil.* 2010;332:163–176.
- Carminati A, Zarebanadkouki M, Kroener E, Ahmed MA, Holz M. Biophysical rhizosphere processes affecting root water uptake. *Ann Bot.* 2016;118:561–571.
- Carvalho LC, Dennis PG, Fedoseyenko D, Hajirezaei M, Borriss R, Wirén N Von. Root exudation of sugars , amino acids , and organic acids by maize as affected by nitrogen , phosphorous , potassium , iron deficiency Root exudation of sugars , amino acids , and organic acids by maize as affected by nitrogen , phosphorus , potassium. 2011;0:1-9.
- Chaparro JM, Badri D V, Bakker MG, Sugiyama A, Manter DK, Vivanco JM. Root exudation of phytochemicals in *arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. *PLoS One.* 2013;8:1–10.
- Chi Z, Wang Z, Wang G, Khan I, Chi Z. Microbial biosynthesis and secretion of l-malic acid and its applications. *Crit Rev Biotechnol.* 2014;8551:1–9.
- Chowdhury S, Farrell M, Bolan N. Priming of soil organic carbon by malic acid addition is differentially affected by nutrient availability. *Soil Biol Biochem.* 2014;77:158–169.
- Debnath A, Das AC, Mukherjee D. Studies on the decomposition of non-conventional organic wastes in. *Microbiol Res.* 1994;149:195–201.

- Ferrol N, Azcón-aguilar C, Pérez-tienda J. Arbuscular mycorrhizas as key players in sustainable plant phosphorus acquisition : An overview on the mechanisms involved. *Plant Sci. Elsevier*; 2019;280:441–447.
- Franzini VI, Muraoka T, Manuel H, León C, Mendes L. Eficiência de fosfato natural reativo aplicado em misturas com superfosfato triplo em milho e soja. *Pesqui Agropecu Bras*. 2009;44:1092–1099.
- García-fraile P, Menéndez E, Rivas R. Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *Bioengineering*. 2015;2:183–205.
- Glick BR. Plant growth-promoting bacteria : mechanisms and applications. *Scientifica* . 2012;2012:1–15.
- González-Méndez B, Webster R, Fiedler S, Siebe C. Changes in soil redox potential in response to flood irrigation with waste water in central Mexico. *Eur J Soil Sci*. 2017;68:886–896.
- Guedes R Melo L, Vergutz L, Rodrigues-Vila A, Covelo F, Fernandes A. Adsorption and desorption kinetics and phosphorus hysteresis in highly weathered soil by stirred flow chamber experiments. *Soil and Tillage Research*. 2016;162:46–54.
- Hartmann A, Rothballer M, Schmid M. Lorenz Hiltner , a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Sci*. 2008;312:7–14.
- Hawkesford M, Horst W, Kichey T, Lambers H, Schjoerring J, Møller IS, White P. Functions of Macronutrients [Internet]. *Marschner's Miner. Nutr. High. Plants*. 2011:243–265
- Hedley MJ, Stewart JWB. Method to measure microbial phosphate in soils. *Soil Biol Biochem*. 1982;14:377–385.
- Hibata BNS, Obayashi HK, Uzuki SS. Review Immunochemistry of pathogenic yeast , *Candida* species , focusing on mannan. *Phys Biol Sci*. 2012;88:250–265.
- Hou E, Chen C, Wen D, Liu X. Phosphatase activity in relation to key litter and soil properties in mature subtropical forests in China. *Sci Total Environ*. 2015;515–516.
- Hu L, Robert CAM, Cadot S, Zhang X, Ye M, Li B, Manzo D, Chervet N, Steinger T, Heijden MGA Van Der, Schlaeppli K, Erb M. Root exudate metabolites drive plant-soil feedbacks on growth and defense by shaping the rhizosphere microbiota. *Nat Commun*. 2018;9:2738.
- Hu X, Shi Y, Zhang P, Miao M, Zhang T, Jiang B. D -mannose : properties , production , and applications : an overview. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2016;15:773–785.
- Ishikawa CM, Bledsoe CS. Seasonal and diurnal patterns of soil water potential in the rhizosphere of blue oaks: Evidence for hydraulic lift. *Oecologia*. 2000;125:459–465.
- Jamal A, Khan A, Sharif M, Jamal H. Application of different organic acids on phosphorus solubility from rock phosphate. *J Hortic plant Res*. 2018;2:43–48.
- Jones DL, Nguyen C, Finlay RD. Carbon flow in the rhizosphere : carbon trading at the soil – root interface. 2009;5–33.
- Kant S. Understanding nitrate uptake, signaling and remobilisation for improving plant nitrogen use efficiency. *Semin Cell Dev Biol*. 2017;74:86–96.

- Kapri A, Tewari L. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* SPP. *Brazilian J Microbiol.* 2010;41.
- Kawasaki A, Donn S, Ryan PR, Mathesius U, Devilla R, Jones A, Watt M. Microbiome and exudates of the root and rhizosphere of *brachypodium distachyon*, a model for wheat. *Plos One.* 2016;11:10.
- King GM, Henry K. Impacts of experimental flooding on microbial communities and methane fluxes in an urban meadow, baton rouge, louisiana. *Front Ecol Evol.* 2019;7:1–13.
- Kolb S, Otte H, Nagel B, Sehnk B. Energy conservation in malolactic fermentation by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus sake*. *Arch Microbiol.* 1992;157:457–463.
- Kopittke PM, Mckenna BA, Karunakaran C, Dynes JJ, Arthur Z, Gianoncelli A, Kourousias G, Menzies NW, Ryan PR, Wang P, Green K, Blamey FPC, Haydon MJ, Arthur A, Johnson T. Aluminum complexation with malate within the root apoplast differs between aluminum resistant and sensitive wheat lines. *Front Plant Sci.* 2017;8:1–11.
- Kumar Johri J, Surange S, Nautiyal CS. Occurrence of salt, ph, and temperature-tolerant, phosphate-solubilizing bacteria in alkaline soils. *Curr Microbiol.* 1999;39:89–93.
- Kunicka-Styczyńska A. Glucose, l-malic acid and ph effect on fermentation products in biological deacidification. *Czech J Food Sci.* 2009;27:319–322.
- Li X, Zhang T, Wang X, Hua K, Zhao L, Han Z. The composition of root exudates from two different resistant peanut cultivars and their effects on the growth of soil-borne pathogen. *Int. J. Biol. Sci* 2013;9:164–173.
- Li Y, Liu X, Hao T, Chen S. Colonization and maize growth promotion induced by phosphate solubilizing bacterial isolates. *Int J Mol Sci.* 2017;18.
- Madhukar SM, Raha P, Singh RK. Identification of amino acids and sugars in root exudate of mungbean. *J Pharmacogn Phytochem* 2018;7:16
- Mansur Murta H. Solubilização de fosfato natural por fungos produtores de ácido oxálico.[thesis] Univ. Fed. Viçosa. 20
- Massenssini AM, Tótola MR, Chaer A, Costa D. Solubilização Potencial de Fosfatos Mediada pela Microbiota Rizosférica de Eucalipto Cultivado em Topossequência Típica da Zona da Mata Mineira. *Rev Bras ciencias do solo.* 2015;39:692–700.
- Mendes GDO, Moreira De Freitas AL, Liparini Pereira O, Ribeiro Da Silva I, Bojkov Vassilev N, Dutra Costa M. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Ann Microbiol.* 2014a;64:239–249.
- Möller K. Effects of anaerobic digestion on soil carbon and nitrogen turnover, N emissions, and soil biological activity. A review. *Agron Sustain Dev.* 2015;35:1021–1041.
- Nascimento J. Solubilização de fosfatos de rocha e dessorção de fosforo no solo por acidos organicos e *Aspergillus niger*. [thesis] Univesidade Federal de Viçosa; 2018.
- Nesme T, Metson GS, Bennett EM. Global phosphorus flows through agricultural trade. *Glob Enviro Chang.* 2018;50:133–141.

- Neumann G, Bott S, Ohler MA. Root exudation and root development of lettuce (*Lactuca sativa* L . cv . Tizian) as affected by different soils. *Front. Microbiol* 2014;5:1–6.
- Novais R., Alvarez V., Barros N., Fontes RL., Cantarutti R., Neves JC. Fertilidade do solo. *Soc. Bras. Ciência do Solo*. 2007.
- Oliveira CA, Alves VMC, Marriel IE, Gomes EA, Scotti MR, Carneiro NP, Guimara CT. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biol Biochem J*. 2009;41:1782–1787.
- Orozco-mosqueda C, Rocha-granados C, Glick BR, Santoyo G. Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. *Microbiol Res*. 2018;208:25–31.
- Panhwar QA, Jusop S, Naher UA, Othman R, Razi MI. Application of potential phosphate-solubilizing bacteria and organic acids on phosphate solubilization from phosphate rock in aerobic rice. *Sci World J*. 2013;2013.
- Papendick RI, Campbell GS. Water potential in the rhizosphere and plant and methods of measurement and experimental control. *Water potencial relations soil Microbiol*. 1975; 39–49.
- Park JH, Bolan N, Megharaj M, Naidu R. Isolation of phosphate solubilizing bacteria and their potential for lead immobilization in soil. *J Hazard Mater*.2011;185:829–836.
- Pezeshki SR, DeLaune RD. Soil oxidation-reduction in wetlands and its impact on plant functioning. *Biology (Basel)*. 2012;1:196–221.
- Randle-Boggis RJ, Ashton PD, Helgason T. Increasing flooding frequency alters soil microbial communities and functions under laboratory conditions. *Microbiologyopen*. 2018;7:1–13.
- Rasmann S, Turlings TCJ. Root signals that mediate mutualistic interactions in the rhizosphere. *Curr Opin Plant Biol*.2016;32:62–68.
- Reddy KR, Patrick WH. Effect of alternate aerobic and anaerobic conditions on redox potential, organic matter decomposition and nitrogen loss in a flooded soil. *Soil Biol Biochem*. 1975;7:87–94.
- Richardson AE, Barea J, Mcneill AM, Prigent-combaret C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil*. 2009;321:305–339.
- Richardson AE, Simpson RJ. Soil microorganisms mediating phosphorus availability. *Plant Physiol*. 2011;156:989–996.
- Roy ED, Richards PD, Martinelli LA, Coletta L Della, Lins SRM, Vazquez FF, Willig E, Spera SA, VanWey LK, Porder S. The phosphorus cost of agricultural intensification in the tropics. *Nat Plants*. 2016;2:1-5
- Rudrappa T, Czymmek KJ, Pará PW, Bais HP. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiol*. 2008;148:1547–1556.
- Ruiz HA, Ferreira GB, Pereira JBM. Estimativa da capacidade de campo de latossolos e neossolos quartzarênicos pela determinação do equivalente de umidade. *Rev Bras Ciência do Solo*. 2003;27:389–393.

- Sarabia M, Cornejo P, Azcón R, Carreón-abud Y, Larsen J. Rhizosphere Mineral phosphorus fertilization modulates interactions between maize , rhizosphere yeasts and arbuscular mycorrhizal fungi. *Rhizosphere*. 2017;4:89–93.
- Sasse J, Martinoia E, Northen T. Feed Your Friends : Do plant exudates shape the root microbiome ? *Trends Plant Sci*. 2018;23:25–41.
- Sato S, Comeford N. Influence of soil pH on inorganic phosphorus soption and desorption in humid Brazilian ultisol. *R Bras Ci solo*. 2005;29:685–694.
- Sauer M, Porro D, Mattanovich D, Branduardi P. Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends Biotechnol*. 2008;26:100–108.
- Sharma S, Sayyed RZ, Trivedi M, Thivakaran A. Phosphate solubilizing microbes : sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer plus*. 2013;2:587–601.
- Shen J, Yuan L, Zhang J, Li H, Bai Z, Chen X, Zhang W, Zhang F. Phosphorus dynamics: From soil to plant. *Plant Physiol*. 2011;156:997–1005.
- Simons M, Permentier HP, Weger LA De, Wijffelman CA, Ben JJ. Amino acid synthesis is necessary for tomato root colonization by pseudomonas fluorescens strain. *Am Phytopathol Soc*. 1997;10:102–106.
- Stewart JWB, Tiessen H. Dynamics of soil organic phosphorus. *Biogeochemistry*. 1987;60:41–60.
- Strawn DG, Sparks DL. Effects of soil organic matter on the kinetics and mechanisms of pb(ii) sorption and desorption in soil. *Soil Sci. Soc. Am. J*. 1996;64:144-156.
- Timberlake C. Timberlake : Iron-Malate and Iron-Citrate Comfilexes. 975. Iron-Malate and Iron-Citrate Complexes. *Dep Agric Hortic Univ brist*. 1964;5078–5085.
- Unger IM, Kennedy AC, Muzika RM. Flooding effects on soil microbial communities. *Appl Soil Ecol*. 2009;42:1–8.
- Valadares RV, César J, Neves L, Costa MD, Smethurst PJ, Peternelli LA, Jesus GL, Cantarutti RB, Silva IR. Modeling rhizosphere carbon and nitrogen cycling in Eucalyptus plantation soil. *Biogeosciences*. 2018;15:4943–4954.
- Vance CP, Uhde-Stone C, Allan DL. Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol*. 2003;157:423–447.
- Venturi V, Keel C. Signaling in the Rhizosphere. *Trends Plant Sci*. 2016;21:187–198.
- Weihrauch C, Opp C. Ecologically relevant phosphorus pools in soils and their dynamics : The story so far. *Geoderma*. 2018;325:183–194.