

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
BACHARELADO EM AGROECOLOGIA

ALINE PONCIO

**SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO NATURAL PARA A CANA-DE-AÇÚCAR  
PELA LEVEDURA RIZOSFÉRICA *Torulaspota globosa***

ARARAS, 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
BACHARELADO EM AGROECOLOGIA

ALINE PONCIO

**SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO NATURAL PARA A CANA-DE-AÇÚCAR  
PELA LEVEDURA RIZOSFÉRICA *Torulaspora globosa***

Trabalho de Conclusão do Curso de  
Bacharelado em Agroecologia apresentado ao  
Centro de Ciências Agrárias para obtenção do  
título de Bacharel em Agroecologia

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Dal'Ava Mariano

ARARAS, 2021

## RESUMO

Muitos solos brasileiros apresentam uma generalizada baixa disponibilidade de fósforo (P) às plantas, condição que leva à necessidade de adubações fosfatadas frequentes para garantir produções agrícolas economicamente viáveis. No entanto, a aplicação contínua de grandes quantidades de P solúvel por longos períodos tem levado a uma alta retenção e ao acúmulo deste nutriente no solo, com baixo aproveitamento pelas plantas ao longo do tempo. Apesar de possuírem baixa solubilidade em água, os fosfatos naturais (FNs) tiveram seu uso aumentado nos últimos anos, por possuírem menor custo e potencial equivalente ao dos fosfatos industrializados. Este potencial não depende apenas de suas características, mas também de atributos do sistema solo-micro-organismo-plantas onde eles são utilizados. Há na rizosfera diversos grupos de micro-organismos que mostram competência para extrair e/ou solubilizar frações de P solo e de FNs inorgânicos de baixa solubilidade, dentre eles fungos e leveduras - são os chamados micro-organismos solubilizadores de fosfato. A partir disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade da levedura em solubilizar o P e disponibilizar para a nutrição de plantas de cana-de-açúcar. Foram realizados experimentos em que a levedura foi cultivada *in vitro* (em laboratório) e *ex vitro* (em casa de vegetação). Durante ensaios *in vitro* em meio de cultura líquido NBRIP tratamentos com adição da levedura e diferentes fontes de fosfato foram testadas em incubação por cinco dias a 25°C e 160 rpm. Foram medidas a concentração de P solúvel (método colorimétrico do azul de molibdênio) e o pH do meio de cultura no dia da montagem dos ensaios e após cinco dias de incubação. Nos ensaios *ex vitro*, plantas de cana-de-açúcar foram cultivadas em vasos com solo fertilizado com FN e inoculado com *Torulaspora globosa*. Vasos com solo sem adição de P e com adição de Fosfato Monocálcico (FM) foram usados como controle. Após o cultivo das plantas foram medidas biomassa seca das raízes e da parte aérea, comprimento das folhas, número de folhas de cada planta, observação de esporos presentes no solo, avaliação da colonização micorrízica e análise da concentração de P e Ca na raiz e na parte aérea das plantas. Durante os ensaios *in vitro* houve uma queda no pH do meio de cultura na presença de FN e levedura. Além disso a levedura *T. globosa* linhagem 6S01 foi responsável por um aumento significativo da concentração de P solúvel no meio de cultura NBRIP nos tratamentos com levedura e com fosfato natural. Nos ensaios *ex vitro* não foi constatada interação significativa entre os fatores fosfato e levedura *T. globosa* linhagem 5S55 nas análises realizadas. Após o cultivo das plantas de cana-de-açúcar, o tratamento com FM apresentou maiores valores de crescimento líquido foliar, biomassa seca e concentração de P na parte aérea. O potencial de solubilização de FNs pela levedura *T. globosa* deve continuar sendo avaliado principalmente em ensaios conduzidos *ex vitro*.

**Palavras-chaves:** relação solo-plantas, micro-organismos solubilizadores de fosfato, fosfato natural, solubilização, cana-de-açúcar.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Tubos Eppendorf com amostras dos tratamentos com *T. globosa* linhagem 6S01 em meio de cultura NBRIP seguindo o método colorimétrico do azul de molibdênio. A coloração azul é resultante da reação do meio de cultura na presença de fósforo solúvel. Na imagem, a letra B é referente ao tratamento controle (meio de cultura sem levedura e sem fosfato), a letra L é referente aos tratamentos com levedura e sem fosfato e as letras Fn são referentes aos tratamentos sem levedura e com fosfato.....16
- Figura 2.** 2A. Minitoletes de cana-de-açúcar colocados para brotar em bandeja com vermiculita umedecida.....19
- Figura 3.** (a) Amostra de solo rizosférico utilizada na análise; (b) Lavagem da amostra de solo; (c) e (d) Peneira de retenção de esporos; (e) Solução de sacarose; (f) Coleta de amostra de suspensão retida na peneira.....20
- Figura 4.** (a) Sachês com tecido tule amarrados com barbante com as amostras de raízes; (b) Hidróxido de Potássio (KOH) utilizado na clarificação das raízes; (c) Sachês mergulhados em KOH 10% por 80 minutos a 70°C para remoção do conteúdo citoplasmático das raízes; (d) Solução em banho-maria; (e) Tinta de caneta em solução de ácido acético; (f) Raízes coradas....21
- Figura 5.** Concentrações de P em meio de cultura NBRIP após adição do Fosfato Natural de Itafós ao meio e cultivo de duas espécies de micro-organismos (*A. niger* linhagem CCT4355 e *T. globosa* linhagem 6S01) por 5 dias em temperatura de 25°C. Média e erro-padrão da média de 5 repetições. Letras distintas sobre as barras indicam valores estatisticamente diferentes.....23
- Figura 6.** Concentrações de P em meio de cultura NBRIP após adição das diferentes fontes de fosfato ao meio e cultivo da levedura *T. globosa* linhagem 6S01. Análises realizadas no primeiro dia de experimento e após cinco dias em incubação. Média e erro-padrão da média de 5 repetições.....24
- Figura 7.** Concentrações de P em meio de cultura NBRIP após adição das diferentes fontes de fosfato ao meio e presença ou ausência da levedura *T. globosa* linhagem 6S01. Valores referentes a todos os tratamentos. Análises realizadas após cinco dias em incubação. Média e erro-padrão da média de 5 repetições. Letras distintas sobre as barras indicam valores estatisticamente diferentes. Dentro de cada ensaio (fosfato), letras maiúsculas comparam os tratamentos com fosfato enquanto letras minúsculas comparam os tratamentos sem fosfato.....25
- Figura 8.** Resultados do pH do meio de cultura NBRIP nos ensaios com Fosfato de Araxá, Fosfato Tricálcico e Fosfato de Itafós. Valores de pH do início e do final do período de cinco dias de crescimento da levedura no tratamento com levedura e com fosfato. Média e erro-padrão da média de 5 repetições.....26
- Figura 9.** Resultados do pH do meio de cultura NBRIP após cinco dias de crescimento da levedura nos ensaios com Fosfato de Araxá, Fosfato Tricálcico e Fosfato de Itafós e presença ou ausência da levedura *T. globosa* linhagem 6S01. Valores referentes a todos os tratamentos. Média e erro-padrão da média de 5 repetições. Letras distintas sobre as barras indicam valores estatisticamente diferentes. Dentro de cada ensaio (fosfato), letras maiúsculas comparam os tratamentos com fosfato enquanto letras minúsculas comparam os tratamentos sem fosfato.....27
- Figura 10.** Biomassa seca da parte aérea e raiz de cana-de-açúcar crescida com três fontes de

fosfato [sem fosfato (SP), fosfato de rocha (FR) e fosfato monocálcico (FM)]. Barras mostram a média e as linhas verticais o erro-padrão da média de 4 repetições. Dentro das partes da planta (parte aérea e raiz) letras distintas sobre as barras indicam valores estatisticamente diferentes (teste de Tukey a 5% de probabilidade) .....	29
<b>Figura 11.</b> Crescimento líquido foliar em centímetros. Valores obtidos a partir da diferença entre o comprimento de folhas inicial (dia do plantio) e final (após 62 dias de cultivo). Barras mostram a média e as linhas verticais o erro-padrão da média de 4 repetições. Letras distintas sobre as barras indicam valores estatisticamente diferentes (teste de Tukey a 5% de probabilidade).....	30
<b>Figura 12.</b> Relação raiz/parte aérea. Resultados obtidos pelo quociente entre os valores de biomassa seca das raízes e da parte aérea da planta. Barras mostram a média e as linhas verticais o erro-padrão da média de 4 repetições. Letras distintas sobre as barras indicam valores estatisticamente diferentes (teste de Tukey a 5% de probabilidade).....	31
<b>Figura 13.</b> Concentração de P (13I) e de Ca (13II) (g/Kg) na parte aérea e raízes das plantas. Barras mostram a média e as linhas verticais o erro-padrão da média de 3 repetições. Letras distintas sobre as barras indicam valores estatisticamente diferentes (teste de Tukey a 5% de probabilidade).....	32
<b>Figura 14.</b> Imagens obtidas durante a avaliação de colonização micorrízica.....	33
<b>Figura 15.</b> Imagens obtidas durante a avaliação de colonização micorrízica.....	34

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Atributos químicos do Neossolo Quartzarênico coletado para os ensaios.....	17
<b>Tabela 2.</b> Índice de Eficiência Agronômica (%) do Fosfato Natural de Itafós ( $IEA = [(biomassa\ FR - biomassa\ SP)/(biomassa\ FM - biomassa\ SP)] \times 100$ ). Valores considerando a produção de biomassa total (raiz + parte aérea) de 3 repetições por tratamento, conteúdo de P total (raiz + parte aérea) de 3 repetições e conteúdo total de Ca (raiz + parte aérea) de 3 repetições..	32

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	08
2. OBJETIVO.....	13
2.1. Objetivo geral.....	13
2.2. Objetivos específicos.....	13
2.3. Hipóteses.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Experimentos <i>in vitro</i> .....	13
3.2. Experimentos <i>ex vitro</i> .....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1. Resultados obtidos nos experimentos <i>in vitro</i> .....	22
4.2. Resultados obtidos nos experimentos <i>ex vitro</i> .....	27
5. CONCLUSÃO.....	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

---

O uso de fertilizantes fosfatados no Brasil vem aumentando continuamente desde a década de 1960. O aumento das quantidades aplicadas se deu devido ao aumento da área cultivada, com forte demanda de fertilizantes nas áreas de expansão de solos pouco férteis, e à intensificação de uso do solo como por exemplo em casos de dois cultivos no mesmo ano agrícola. Embora este uso crescente tenha contribuído incontestavelmente para a revolução verde no país, ele também foi responsável pelo acúmulo do elemento no solo ao longo dos últimos 50-60 anos. As quantidades aplicadas têm sido de pelo menos duas vezes a demanda da planta e o excesso anual de fósforo (P), calculado como a diferença entre o total de P aplicado (como fertilizantes minerais e resíduos orgânicos) e o retirado na forma de colheita e exportado do solo (conteúdo de P em grãos e outros produtos colhidos), representou aproximadamente 70% do total de P aplicado como fertilizante em 2016 e revelou o quanto o uso de P é ineficiente na agricultura brasileira (Withers et al., 2018).

Além da baixa eficiência de uso, o Brasil não tem autossuficiência na produção deste importante insumo agrícola. Devido à baixa solubilidade dos compostos de P nas rochas ígneas brasileiras (fosfatos de ferro e de alumínio, em sua maioria) e ao alto custo de processamento das mesmas, a indústria do fertilizante fosfatado do país supre somente uma fração da demanda interna de P e atualmente 60% do fertilizante fosfatado mineral usado na agricultura brasileira é importado (Fonseca, 2018). A alta demanda por fertilizante fosfatado e a dependência de importações coloca o país em situação de vulnerabilidade, sujeito a variações bruscas nos preços e a escassez do produto no mercado internacional (Withers et al., 2014; 2018). Alternativas devem ser encontradas, portanto, para reduzir a dependência externa de P e para usar o P aplicado ou a ser aplicado no solo com mais efetividade.

As maiores quantidades de fertilizantes fosfatados aplicados nos solos brasileiros são para as três principais culturas agrícolas do país – milho, soja e cana-de-açúcar. Quantidades típicas aplicadas na cana-de-açúcar são de 50 a 80kg P/ha no plantio (cana planta) e de 10 a 15kg P/ha anualmente na cana soca. As principais fontes de P utilizadas na agricultura são os fosfatos naturais (rochas moídas), os termofosfatos (produzidos por processo térmico), os fosfatos totalmente acidulados (produzidos por acidulação total) e os fosfatos alternativos (parcialmente acidulados e compactados) (Prochnow et

al., 2004). Nestes materiais fertilizantes, os compostos que contêm P variam significativamente em forma química e solubilidade em água. Consequentemente, a intensidade de liberação e a quantidade de P liberada no solo em um dado intervalo de tempo variam entre os fertilizantes.

Apesar de possuírem baixa solubilidade em água e, em tese, um menor desempenho agrônômico, os fosfatos naturais tiveram seu uso aumentado nos últimos anos. O maior consumo desses fertilizantes fosfatados naturais é devido ao menor custo por unidade de P e ao potencial de fornecimento de P equivalente ao dos fertilizantes solúveis, como os superfosfatos (Chagas, 2014; Chien et al., 2011; Horowitz e Meurer, 2004; Pavinato et al., 2017; Stamford et al., 2016). Além do potencial equivalente, tem sido defendido que a rápida dissolução dos fosfatos solúveis pode produzir concentrações de P na solução do solo maiores do que aquelas demandadas pelas plantas, criando então condições para uma alta adsorção e fixação de P pelo solo, algo que aconteceria em menor intensidade com os fosfatos naturais, de dissolução mais lenta (Novais et al., 2007). Supondo que isto de fato ocorra e seja significativo, e que o fornecimento de P pelos fosfatos naturais consiga atender a demanda da planta, o emprego de fontes contendo compostos de menor solubilidade poderia, portanto, representar um ganho de eficiência no uso deste importante nutriente, cujas reservas naturais encontram-se em exaustão (Reijnders, 2014).

O cumprimento do potencial de fornecimento de P para as plantas não depende exclusivamente de características do fosfato natural, mas também de atributos do sistema solo-planta-micro-organismo onde ele é utilizado. Por exemplo, a capacidade de espécies de micro-organismos e de plantas de adquirir P das diferentes fontes minerais e orgânicas varia significativamente. Esta habilidade diferencial observada entre as espécies está relacionada com a variação do pH do meio (rizosfera, no caso de plantas), com a produção e liberação de ácidos carboxílicos e fenólicos e de fosfatases e com a alteração da composição da solução do solo na interface solo-raiz, em particular com o esgotamento de Ca e P da solução (Faucon et al., 2017; Hallama et al., 2019; Lambers et al., 2008; Menezes-Blackburn et al., 2018; Moreira e Siqueira, 2006).

Micro-organismos desempenham papel fundamental no ciclo biogeoquímico do P na pedosfera. Eles estão envolvidos em processos importantes como assimilação e síntese de compostos orgânicos de P, produção de fosfatases e mineralização de moléculas contendo P, aquisição e transporte de P para as raízes e produção de ácidos

orgânicos e inorgânicos de baixo peso molecular que deslocam P adsorvido nos colóides do solo, solubilizam compostos inorgânicos pouco solúveis de P e complexam metais como Fe e Al, que precipitam P e o tornam menos disponível (Arcand e Schneider, 2006; Giles et al., 2014; Hallama et al., 2019; Marra et al., 2012; Richardson et al., 2011; Stamford et al., 2007; Whitelaw, 1999).

Assim como bactérias e fungos multicelulares, leveduras são micro-organismos amplamente encontrados nos solos. Estudos da ecologia destes fungos unicelulares revelaram que eles se encontram em populações mais numerosas na rizosfera do que no solo distante da raiz, que estão envolvidos em processos essenciais do solo como formação e manutenção da estrutura do solo, ciclagem de carbono, energia e nutrientes minerais, e crescimento e nutrição das plantas, através da produção de reguladores de crescimento e da operação de processos que alteram a disponibilidade de nutrientes no solo (Botha, 2011; Hesham e Mohamed, 2011). Leveduras dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulaspota* e *Williopsis* mostram competência para extrair P de compostos e de fosfatos inorgânicos naturais de baixa solubilidade do solo e, embora a base mecanística da mobilização de P não esteja completamente entendida, a liberação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular e íons H<sup>+</sup> tem sido apontada como o principal mecanismo responsável pelo fenômeno de mobilização (Cy et al., 2018; Fu et al., 2016; Mundra et al., 2011; Sarabia et al., 2018).

No solo e na rizosfera, leveduras interagem também com uma ampla variedade de micro-organismos. As interações podem estimular a ação dos micro-organismos envolvidos mutuamente e refletir positivamente no desenvolvimento das plantas. Exemplificando, plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus mosseae* e simultaneamente com a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* apresentaram maior crescimento e melhor estado nutricional por nitrogênio (N) e P do que aquelas inoculadas somente com o fungo ou aquelas sem nenhuma inoculação (Boby et al., 2008). Ainda neste estudo, a coinoculação deste fungo com outras espécies de leveduras também resultou em aumento de crescimento do feijão-caupi, mas a interação de maior êxito foi aquela com *R. mucilaginosa*. Os autores do estudo ponderaram que a promoção do crescimento vegetal pela levedura se deu de forma indireta, ou seja, através da produção pela levedura da vitamina B12, que estimulou a ação do fungo micorrízico e este o crescimento das plantas. Resultados semelhantes a estes também foram obtidos em pesquisa com milho inoculado com o fungo micorrízico

arbuscular *Rhizophagus irregularis* e com as leveduras *Candida railenensis* ou *Cryptococcus flavus*. Neste caso, a promoção do crescimento do milho se deu pelo aumento da aquisição de P do solo (Sarabia et al., 2018).

A diversidade de espécies e de processos de interesse exercidos pelas leveduras e por outros grupos de micro-organismos tem motivado pesquisas para o desenvolvimento de fertilizantes biológicos para estimular o crescimento vegetal, aumentar a produtividade e, supostamente, manter a sustentabilidade dos agroecossistemas (Miransari, 2010; Whitelaw, 1999; Zhang, 2002; Zhang et al., 2018). Em seu trabalho de dissertação, concluído no *campus* Araras da UFSCar, Rocha (2017) observou habilidade superior da levedura *Torulaspora globosa* – linhagem 6S01 na solubilização de Fosfato Tricálcico [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ], um composto fosfatado de baixa solubilidade em água (0,02g/L). Esta linhagem foi isolada da rizosfera de plantas de milho cultivadas em um Latossolo do *campus* Araras tradicionalmente cultivado com cana-de-açúcar. Ao longo de cinco dias de crescimento em meio de cultura líquido, os micro-organismos desta linhagem solubilizaram em torno de 30% do total de P do fosfato tricálcico adicionado ao meio. Quanto às condições ambientais para a execução desta competência, a linhagem se mostrou pouco sensível aos valores de acidez (pH 3 a 7), temperatura (20 a 30°C) e velocidade de agitação do meio de cultura (0 a 200rpm).

Outros trabalhos recentes, que estudaram fontes de fosfato natural, avaliaram o potencial agrônomo de se utilizar fontes de P pouco solúveis. Lopes et al. (2022) estudaram o potencial do Fosfato Natural de Itafós em diferentes cultivos consorciados, utilizando plantas com maior capacidade de aquisição de P intercaladas em com plantas com menor habilidade. Paredes Filho et al. (2020) avaliaram a capacidade de solubilização do Fosfato Natural de Araxá por bactérias isoladas do solo *in vitro* e *ex vitro*. No ensaio *in vitro* foram observados resultados semelhantes ao deste trabalho, em que as quatro cepas bacterianas aumentaram a disponibilidade de P no meio de cultura quando comparado com o tratamento controle (sem inoculação).

Sarabia et al. (2018) avaliaram espécies de leveduras isoladas da rizosfera de milho, como *Candida railenensis* e *Clavispora lusitaniae*, que foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio *in vitro* e promover o crescimento de plântulas de milho, verificados por meio do aumento do peso seco da raiz e da parte aérea das plantas (Sarabia et al., 2018). Moreira (2019) discute que algumas espécies de leveduras solubilizadoras de fosfato podem associar-se a fungos micorrízicos arbusculares no solo rizosférico. Isso

pode beneficiar a absorção de P pela planta. No trabalho de Sarabia et al. (2017) a inoculação combinada das espécies *Cryptococcus flavus* e *Candida railenensis* com o fungo micorrízico *Rhizophagus irregularis* promoveu o crescimento de plântulas de milho, aumentando o comprimento das raízes e o conteúdo de P na parte aérea da planta.

Os estudos de solubilização de fosfatos por micro-organismos têm sido geralmente realizados em laboratório, como por exemplo em frascos de vidro e sob condições ambientais bem controladas, nos chamados experimentos de bancada ou *in vitro*. Comparados a estes, são poucos os estudos que estenderam os testes para condições de campo ou pelo menos para condições mais próximas daquelas encontradas nos solos, como foram os estudos de Stamford et al. (2007, 2008, 2016). Ensaaios com o uso de solo como substrato de crescimento de micro-organismos são importantes para vencer os principais desafios do desenvolvimento e do emprego de fertilizantes biológicos, dentre eles, i) aumentar a sobrevivência e a colonização dos micro-organismos introduzidos na rizosfera, aumentando seu poder de competição com a população indígena do solo, e ii) produzir boa disponibilidade de nutrientes no solo, reduzindo o estresse mineral e propiciando condições nutricionais adequadas ao crescimento e desempenho dos micro-organismos.

Muitos esforços têm sido realizados com o objetivo de aumentar a eficiência das rochas fosfatadas como materiais fornecedores de P, seja diretamente para o solo ou para a indústria de fertilizantes, bem como a eficiência dos fertilizantes manufaturados aplicados ao solo. O entendimento da dinâmica do P no sistema solo-planta-micro-organismo pode trazer avanços reais para aperfeiçoar a gestão das práticas de fornecimento e conservação do P no solo, visando o aumento da eficiência de uso deste nutriente e, assim, a produtividade das espécies vegetais cultivadas.

Inoculantes com micro-organismos têm sido propostos como componentes fundamentais de sistemas de manejo integrado de nutrientes em agroecossistemas, muito embora o desenvolvimento dos mesmos em escala comercial seja ainda bem incipiente. O principal interesse de pesquisa em muitas partes do mundo é o desenvolvimento de inoculantes contendo organismos que se estabeleçam bem na rizosfera, que formem associações benéficas não-específicas com um grupo variado de plantas, e que possam ser produzidos em laboratório em grandes quantidades (Hallama et al., 2019).

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi estudar a aquisição de P solubilizado pela levedura *Torulaspóra globosa* proveniente de uma fonte de fosfato natural para plantas de cana-de-açúcar.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade da solubilização *in vitro* de fosfato natural pela levedura *Torulaspóra globosa*;
- Medir o crescimento e a avaliar a nutrição por P de plantas jovens de cana-de-açúcar inoculadas com a levedura *Torulaspóra globosa* e crescidas em solo fertilizado com fosfato natural.

### 2.3 Hipóteses

Duas hipóteses foram testadas:

- Por solubilizar fosfatos de cálcio, a levedura *Torulaspóra globosa* solubiliza o Fosfato Natural de Itafós, uma vez que o mesmo tem fosfato de cálcio em sua constituição;
- A levedura *Torulaspóra globosa* aumenta a aquisição de P por plantas de cana-de-açúcar inoculadas com a levedura e cultivadas em solo fertilizado com o Fosfato Natural de Itafós.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

---

O projeto foi desenvolvido na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), no Centro de Ciências Agrárias (CCA), na cidade de Araras interior do estado de São Paulo. Os materiais e métodos utilizados nas duas etapas de experimentação do projeto são descritos a seguir. Ao todo foram realizados dois experimentos *in vitro* (em laboratório) e dois *ex vitro* (em casa de vegetação). O primeiro experimento foi desenvolvido como iniciação científica voluntária e a partir dos resultados obtidos foi escrito um projeto de iniciação científica financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp).

### 3.1. Experimentos *in vitro*

No primeiro experimento *in vitro* foi utilizada a linhagem 6S01 da levedura *T. globosa*, esta linhagem foi isolada de solo cultivado com milho. No segundo experimento foi utilizada a linhagem 5S55 isolada de solo cultivado com cana-de-açúcar. Ambas as linhagens estão presentes no banco de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (Lamam) do CCA. Os ensaios foram realizados em meio de cultura líquido NBRIP (*National Botanical Research Institute Phosphate*), em frascos Erlenmeyer de 125mL, com 50mL de meio de cultura com a seguinte composição (em g/L): 10 glicose; 5 cloreto de magnésio hidratado; 0,20 cloreto de potássio; 0,25 sulfato de magnésio hidratado e 0,10 sulfato de amônio. Para preparo do inóculo, a levedura mantida em ágar YEPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) inclinado foi repicada por estria de isolamento para placas de Petri contendo ágar YEPD, constituição (em g/L) 10 extrato de levedura; 20 dextrose; 20 peptona; 20 ágar. As placas foram incubadas durante dois dias a 25°C. Após o crescimento na placa, os micro-organismos foram repicados para tubos Falcon contendo 10mL de caldo YEPD, com auxílio de uma alça de inoculação, e mantidos em incubação em mesa agitadora a 25°C e 160rpm durante três dias.

Após esse período, os tubos Falcon foram colocados em centrífuga sob rotação de 3600rpm, por três minutos. A biomassa decantada foi suspensa em solução salina estéril (NaCl 0,85%) e a concentração de células na suspensão foi padronizada por contagem de células totais em câmara de Neubauer, conforme metodologia de Dias e Schwan (2010). Para os tratamentos com a presença da levedura, uma alíquota da solução padronizada de células foi inoculada em cada Erlenmeyer para obtenção da concentração final de  $10^5$  células por mL de meio de cultura. Foi calculada a quantidade de P para cada fonte de fosfato, e, aos tratamentos com adição de fosfato foram adicionados ao meio de cultura suas respectivas fontes (Fosfato Tricálcico ou fosfato natural). Foram distribuídos 50mL de meio de cultura NBRIP nos Erlenmeyers de capacidade de 125mL. Os frascos foram então submetidos a condições de 25°C e 160 rpm durante 5 dias de incubação em mesa agitadora. Foram avaliadas as variáveis teor de P solúvel e pH no meio de cultura. Para determinação do P solúvel foi empregada a metodologia de Strickland e Parsons (1960), através do método colorimétrico do azul de molibdênio (descrita abaixo). Os frascos foram etiquetados de acordo com os tratamentos em delineamento inteiramente casualizado.

No primeiro experimento foram utilizados dois micro-organismos, o fungo filamentoso *Aspergillus niger* linhagem CCT4355 já conhecido pelo seu potencial de solubilização e a levedura *Torulaspota globosa* linhagem 6S01 *in vitro*. O mesmo conjunto de tratamentos descrito abaixo foi adotado para ambos os micro-organismos. Foram realizadas cinco repetições em delineamento inteiramente casualizado, sendo constituídos por:

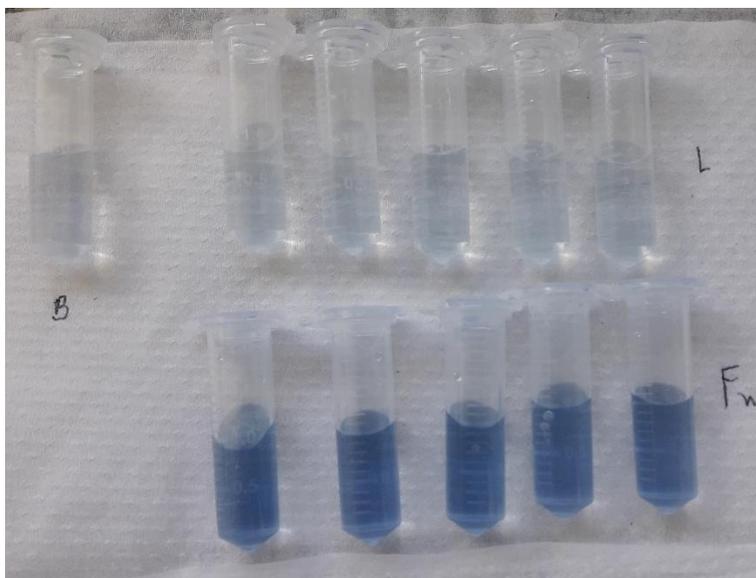
- a) meio de cultura com levedura e sem fosfato natural;
- b) meio de cultura com levedura e com fosfato natural;
- c) meio de cultura sem levedura e com fosfato natural;
- d) meio de cultura sem levedura e sem fosfato;
- e) meio de cultura com levedura e com fosfato tricálcico;

No segundo experimento *in vitro* foi utilizado somente um micro-organismo (levedura *T. globosa*) e seguindo as recomendações de Bashan et al. (2013), foi adicionado mais um fosfato natural além daquele já utilizado inicialmente, visando uma análise mais completa da capacidade de solubilização de fosfatos pela levedura estudada. O fosfato adicionado é chamado de Fosfato de Araxá. Ao todos foram utilizados o fosfato tricálcico (tratamento referência), e os fosfatos naturais: Fosfato de Itafós e Fosfato de Araxá. Todos foram peneirados e somente a fração composta de partículas de tamanho inferior a 0,30mm foi utilizada nos ensaios. Foram realizadas cinco repetições em delineamento inteiramente casualizado, sendo constituídos por:

- a) meio de cultura com levedura e fosfato;
- b) meio de cultura sem levedura e com fosfato;
- c) meio de cultura com levedura e sem fosfato;
- d) meio de cultura sem levedura e sem fosfato.

Para o método colorimétrico do azul de molibdênio foram preparados quatro reagentes, sendo eles molibdato de amônio, solução dos ácidos sulfúrico e ascórbico e tartarato de antimônio de potássio. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta, foi adicionada uma amostra de 1,5mL correspondente a cada tratamento em tubos Eppendorf de 2mL. Estes foram centrifugados por três minutos a 3600rpm para precipitar células e P insolúvel. Em novos tubos Eppendorf foram adicionados 1mL do sobrenadante das amostras. Por fim, os reagentes preparados foram misturados entre si e 0,1mL foi

adicionado em cada Eppendorf contendo sobrenadante das amostras. Nestes tubos Eppendorf contendo as amostras com os reagentes misturados desenvolveu-se a coloração azul, cuja intensidade do azul varia proporcionalmente com a concentração de P solúvel presente (Figura 1).



**Figura 1.** Tubos Eppendorf com amostras dos tratamentos com *T. globosa* linhagem 6S01 em meio de cultura NBRIP seguindo o método colorimétrico do azul de molibdênio. A coloração azul é resultante da reação do meio de cultura na presença de fósforo solúvel. Na imagem, a letra B é referente ao tratamento controle (meio de cultura sem levedura e sem fosfato), a letra L é referente aos tratamentos com levedura e sem fosfato e as letras Fn são referentes aos tratamentos sem levedura e com fosfato.

Após quinze minutos foi medida a absorvância. Cada conteúdo dos tubos Eppendorf foi passado para a cubeta e colocado no interior do espectrofotômetro em que o comprimento de onda para P foi de 880nm. O resultado obtido para absorvância foi comparado aos valores de uma curva padrão, confeccionada por Rocha (2017) com concentrações conhecidas de fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Strickland & Parson, 1960). Também foi medido o pH das amostras com o uso de um pHmetro.

### 3.2. Experimentos *ex vitro*

**Material vegetal** - No primeiro experimento *ex vitro* o material vegetal utilizado foi a variedade de cana-de-açúcar RB7515, amplamente cultivada no estado de São Paulo. Foram colocados 46 minitoletes de cana-de-açúcar para brotar em bandejas com vermiculita, estas foram umedecidas com solução de 170mg/L de sulfato de cálcio

dihidratado. Depois, as bandejas foram ensacadas e colocadas na estufa incubadora a 30°C e 12 horas de fotoperíodo.

**Solo** - O solo usado foi um Neossolo Quartzarênico órtico (RQo), com 92% de areia, 1% de silte, 7% de argila e 0,8% de matéria orgânica e os seguintes valores dos atributos químicos (Tabela 1).

Tabela 1. Atributos químicos do Neossolo Quartzarênico coletado para os ensaios

Acidez	P	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H + Al	SB	t	T	V	m
pH-CaCl <sub>2</sub>	mg/dm <sup>3</sup>	-----				mmol/dm <sup>3</sup>	-----				---- % ----
4,7	6,0	0,6	5,0	3,0	0,8	13,0	8,6	9,4	21,6	40	9

Observa-se que é um solo com baixo teor de argila e, conseqüentemente, com menor potencial de adsorção e fixação de P. Espera-se, portanto, que este solo seja um dreno pequeno do P solubilizado relativamente ao dreno representado pelos micro-organismos e pela planta. Estes atributos do solo foram medidos por Lopes (2018).

Antes de seu uso, o solo foi peneirado, homogeneizado e incubado com carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>) para neutralização da acidez, propiciando condições adequadas para o crescimento das plantas e dos micro-organismos. Foi utilizada como referência curva de titulação obtida por um teste de incubação com CaCO<sub>3</sub> realizada por Lopes (2018). Em princípio, baixas concentrações de Ca em solução contribuem para a dissolução dos fosfatos de cálcio do material usado como fonte de P.

Após ter parte de sua acidez neutralizada com CaCO<sub>3</sub>, o solo foi fertilizado com macro e micronutrientes, seguindo as sugestões de Raij et al. (1996) e Malavolta (1980) com as seguintes concentrações (em mg/kg): N = 150; P = 87; K = 150; Mg = 50; S = 50; B = 0,5; Cu = 1,5; Fe = 5,0 (como Fe-EDTA); Mn = 3,0; Mo = 0,1 e Zn = 5,0. O objetivo desta fertilização foi diminuir a condição de baixa fertilidade nativa do solo e criar condições para um melhor crescimento das plantas e dos micro-organismos. O P foi adicionado com o uso de diferentes fontes, conforme especificado adiante. Após adição de CaCO<sub>3</sub> ao solo, a concentração de Ca alcançou o valor aproximado de 170mg/kg. No primeiro experimento foram utilizadas porções de 1,5 kg de solo para cada repetição e no segundo foram utilizadas porções de 2 kg de solo para cada repetição.

**Tratamentos relacionados a P** – Os tratamentos relacionados a P foram compostos pelo não fornecimento do nutriente, pelo fornecimento do nutriente com o uso de

uma fonte solúvel em água e pelo fornecimento com o uso de uma fonte de baixa solubilidade em água, constituída pelo fosfato natural descrito a seguir. O fosfato monocalcico  $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}]$ , fonte solúvel em água, foi usado para criar uma concentração de 87 mg/kg de P (200 mg/kg de  $\text{P}_2\text{O}_5$ ) no solo. Este tratamento foi considerado o tratamento referência.

Um fosfato natural foi testado como fonte alternativa de P para as plantas. Este material é oriundo de rochas sedimentares extraídas no Estado de Tocantins. O material é chamado de Fosfato de Itafós e tem sido objeto de estudo quanto ao potencial de fornecimento de P às plantas (Chaves et al., 2011; Souza et al., 2014). Tal fosfato tem um teor total de P de 13,5% de  $\text{P}_2\text{O}_5$ , teor de P solúvel em ácido cítrico de 8,1% de  $\text{P}_2\text{O}_5$  e teor de P solúvel em ácido fórmico de 8,0% de  $\text{P}_2\text{O}_5$ . As doses deste fosfato foram calculadas para fornecer 100% da quantia de P fornecida pelo fosfato monocalcico. Para este cálculo foi considerado o teor total de P do fosfato natural, conforme convenção da literatura no assunto (Prochnow et al., 2004).

**Crescimento das plantas em vasos com solo** - No primeiro experimento as mudas de cana-de-açúcar foram formadas a partir de minitoletes, colocados para brotar em bandeja com vermiculita umedecida com solução de sulfato de cálcio 1,0mM (Figura 2). Após brotação, as mudas mais homogêneas foram selecionadas para transferência para os vasos e inoculadas no sistema radicular com uma alíquota da solução com células em suspensão, aplicada na proporção de  $10^6$  células/planta. Uma segunda alíquota contendo células dos micro-organismos foi aplicada no solo do vaso, com o uso de pipeta e próximo às raízes das plantas, 7 dias após o seu transplântio para os vasos. No segundo experimento as mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar foram adquiridas e já possuíam desenvolvimento de raízes. As mudas foram transplantadas para os vasos e aos tratamentos com a presença de micro-organismo, foi aplicada uma alíquota de 3 mL contendo células de *T. globosa* em concentração de  $10^9$ . Para ambos experimentos a concentração de células foi padronizada por contagem de células totais na câmara de Neubauer. Ao final do plantio foi adicionado 160 mL de água. Todos os vasos foram pesados e o valor encontrado foi utilizado como peso referência para a irrigação.



**Figura 2.** Minitoletes de cana-de-açúcar colocados para brotar em bandeja com vermiculita umedecida.

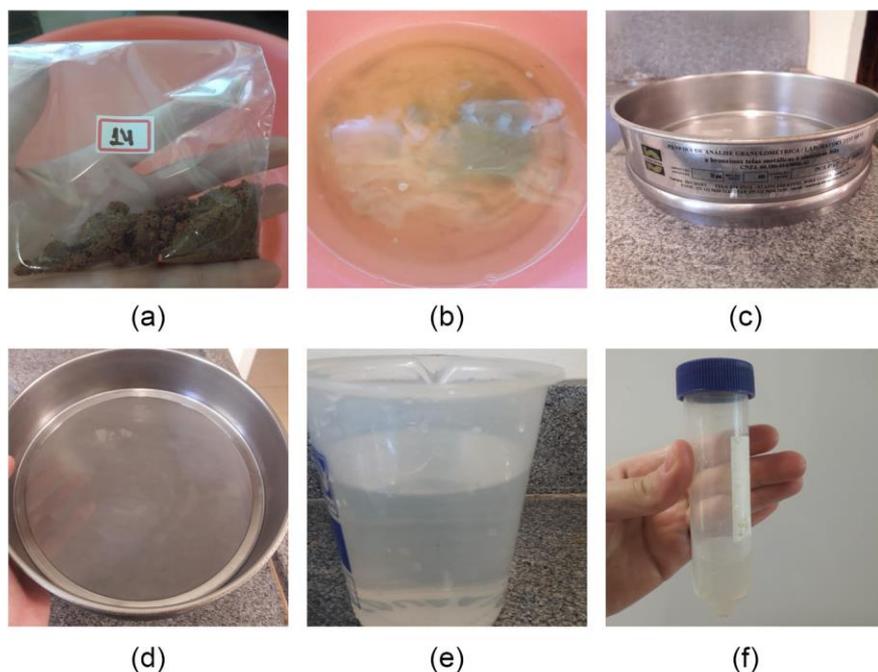
No primeiro experimento as plantas foram cultivadas durante 50 dias e no segundo durante 62 dias. Ao final do cultivo as plantas foram colhidas dos vasos e separadas em parte aérea e raiz, separadas individualmente em sacos de papel, secadas em estufa de circulação forçada de ar a 65°C por 72 horas e pesadas para obtenção da biomassa seca. Também foram medidos o comprimento das folhas e o número de folhas de cada planta.

Os tratamentos foram delimitados em quatro repetições e constituídos pela presença ou ausência da levedura e variando a presença ou ausência das diferentes fontes de fosfato, totalizando em 24 vasos:

- sem fosfato e sem levedura (SP);
- sem fosfato e com levedura (SP);
- com fosfato natural de Itafós sem levedura (FR);
- com fosfato natural de Itafós com levedura (FR);
- com fosfato monocálcico e sem levedura (FM);
- com fosfato monocálcico e com levedura (FM).

Além das avaliações anteriores, no segundo experimento *ex vitro* também foram realizadas observação em lupa de esporos presentes no solo, avaliação da colonização micorrízica e análise da concentração de P e Ca na raiz e na parte aérea (caule e folhas) das plantas. Para a observação de esporos foi utilizada a peneira de 38µm específica para retenção de esporos de fungos micorrízicos. Foram separadas amostras de 10 g de solo dos vasos. As amostras foram colocadas em uma bacia e lavadas em água corrente de

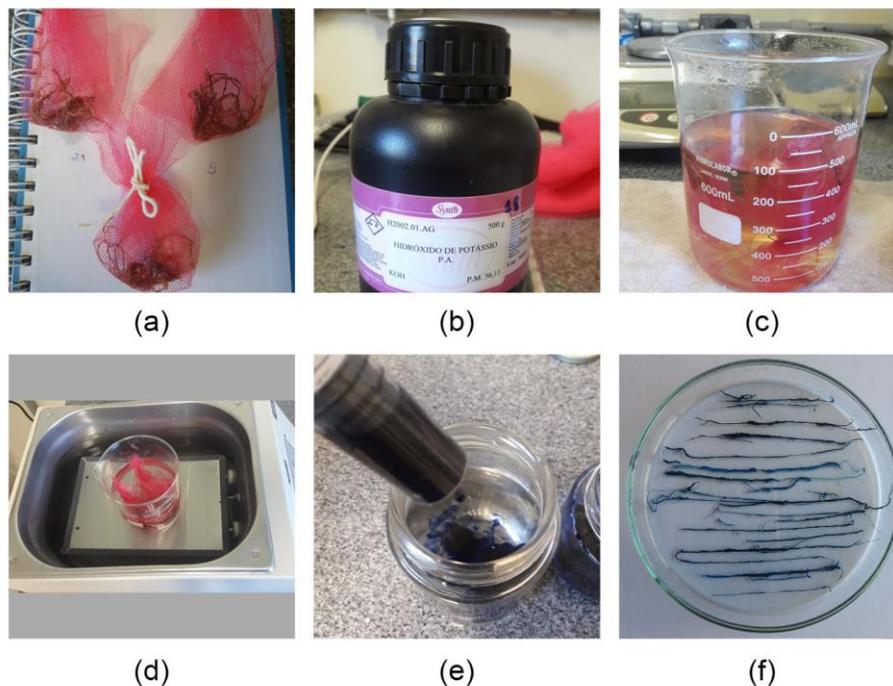
acordo com a metodologia de Gerdemann e Nicolson (1963). O sobrenadante foi recuperado na peneira. Esse processo foi realizado três vezes. O sobrenadante restante foi passado para um tubo Falcon. Após alguns minutos, o sobrenadante foi descartado e o restante da amostra foi misturado com a solução de sacarose. Novamente após alguns minutos o sobrenadante foi descartado e o restante da amostra foi observado em lupa e/ou microscópio. Algumas imagens desta metodologia são apresentadas na Figura 3.



**Figura 3.** (a) Amostra de solo rizosférico utilizada na análise; (b) Lavagem da amostra de solo; (c) e (d) Peneira de retenção de esporos; (e) Solução de sacarose; (f) Coleta de amostra de suspensão retida na peneira.

A avaliação da colonização micorrízica foi realizada em subamostras de 1,0 g de raízes finas clarificadas com KOH e coloridas com tinta de caneta tinteiro. Para conservação, as raízes foram colocadas em saquinhos de plástico contendo álcool 70%. Para a avaliação, foi utilizada a metodologia empregada por Hardoim (2006), que cultivou cana-de-açúcar pelo mesmo período em sua pesquisa. Para isso, foram realizados sachês com tecido tule amarrados com barbante. Os sachês com raízes foram mergulhados em KOH 10% por 80 minutos a 70°C para remoção do conteúdo citoplasmático das raízes. Após, as raízes foram coradas com tinta de caneta à 5% (v/v) em solução de ácido acético à 70°C por 8 minutos (Figura 4). Utilizando microscópio, as raízes foram observadas a

fim de observar a presença de estruturas fúngicas como esporos, vesículas, arbúsculos e hifas.



**Figura 4.** (a) Sachês com tecido tule amarrados com barbante com as amostras de raízes; (b) Hidróxido de Potássio (KOH) utilizado na clarificação das raízes; (c) Sachês mergulhados em KOH 10% por 80 minutos a 70°C para remoção do conteúdo citoplasmático das raízes; (d) Solução em banho-maria; (e) Tinta de caneta em solução de ácido acético; (f) Raízes coradas.

Para o segundo experimento *ex vitro* também foi calculada a relação raiz/parte aérea (R/PA) pelo quociente entre os valores de biomassa seca das raízes e da parte aérea da planta. E o índice de eficiência agrônômica (IEA) como  $IEA = [(biomassa\ FR - biomassa\ SP)/(biomassa\ FM - biomassa\ SP)] \times 100$ , em que biomassa é a valor obtido pela soma de biomassa da parte aérea mais biomassa da raiz (g por planta) em cada tratamento. Também, com a medição da parte aérea das folhas das plantas foi obtido valores de crescimento líquido foliar (cm). A medição foi realizada a partir da base das folhas, próximo a superfície do vaso. Todas as folhas de cada planta foram medidas e o valor final é a média de valores encontrados. Por exemplo, para uma planta com cinco folhas, o resultado foi a média encontrada para os cinco valores em centímetros. Esta medição ocorreu no dia do plantio e novamente após 62 dias de cultivo.

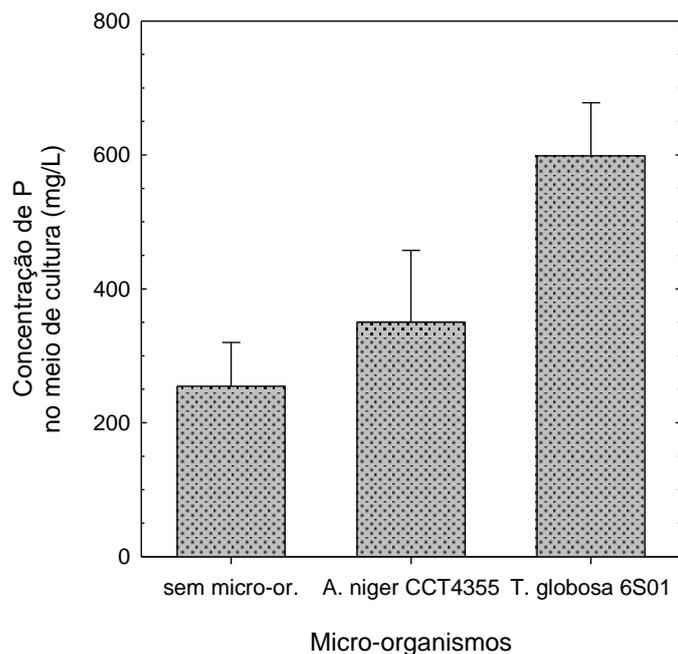
Os dados obtidos ao longo do projeto foram estudados inicialmente com análise estatística descritiva e organizados em tabelas. Parâmetros como média e desvio-padrão da média são apresentados em gráficos e figuras. Numa segunda etapa da análise, os

dados coletados foram submetidos a análises de variância e testes de média no software R. Os resultados produzidos por estas análises são apresentados também em gráficos construídos no software SigmaPlot.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

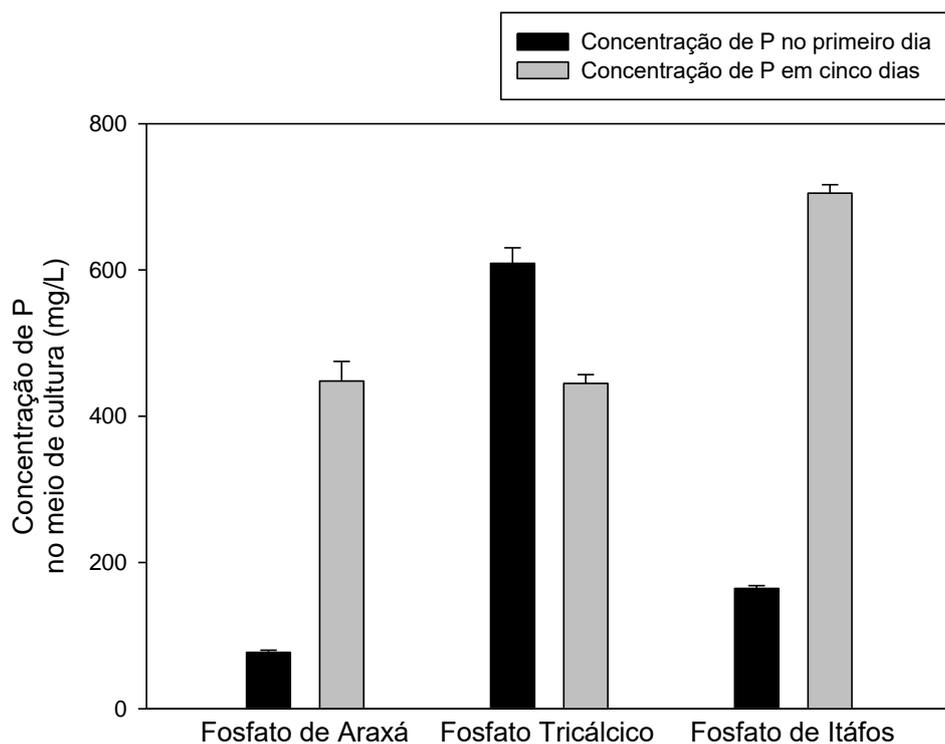
### **4.1. Resultados obtidos nos experimentos *in vitro***

Os resultados apresentados na Figura 5 foram obtidos no primeiro experimento *in vitro* realizado. Eles demonstram que a levedura *T. globosa* linhagem 6S01 foi responsável por um aumento significativo da concentração de P solúvel no meio de cultura, elevando a concentração deste nutriente em solução em 135% em relação ao meio sem micro-organismo. Este aumento foi também bastante superior ao observado para o fungo filamentosso *A. niger*, que elevou a concentração de P solúvel no meio em 37% comparado ao meio sem micro-organismo. A concentração de P solúvel foi medida no primeiro dia de ensaio, logo após a montagem do mesmo, e após cinco dias em incubação. Esta medição foi realizada em dois momentos visando ter parâmetros adequados para comparar os resultados entre os fosfatos e os tratamentos, já que os fosfatos de baixa solubilidade podem possuir uma pequena parcela de solubilidade inicial em água, sem a necessidade da ação da levedura ou de outros micro-organismos. A medição do pH também foi realizada em dois momentos para comparar o potencial de acidificação do meio de cultura pela levedura, já que esta ação ocorre ao longo de seu crescimento.



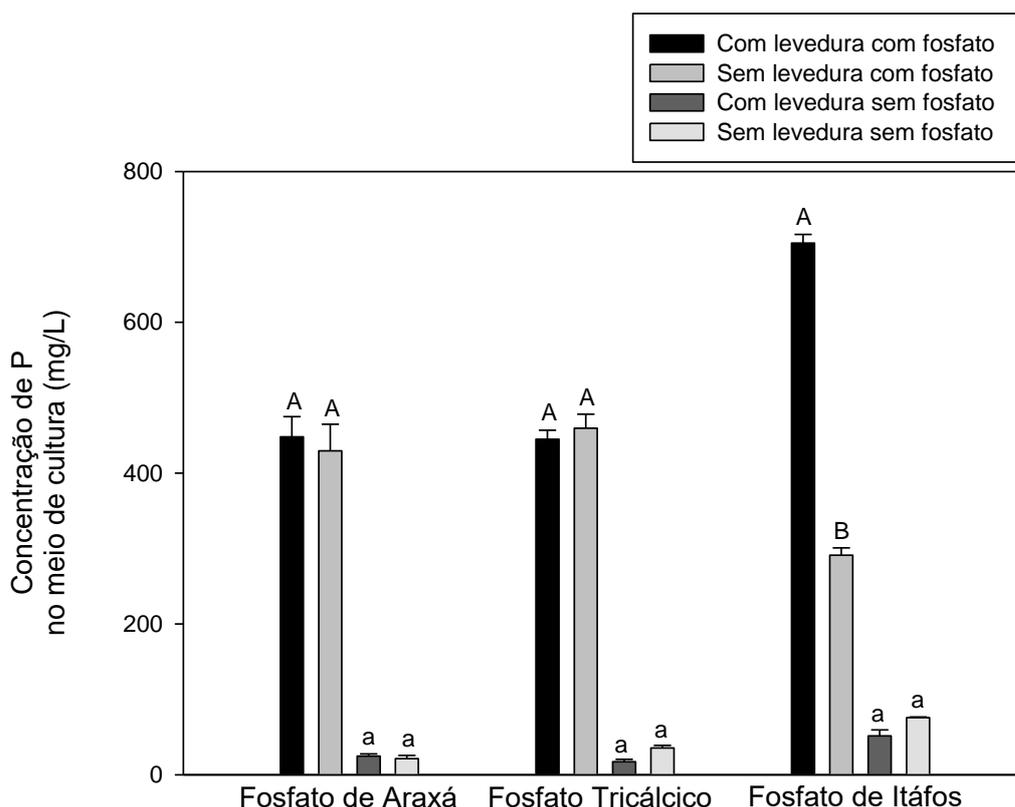
**Figura 5.** Concentrações de P em meio de cultura NBRIP após adição do Fosfato Natural de Itafós ao meio e cultivo de duas espécies de micro-organismos (*A. niger* linhagem CCT4355 e *T. globosa* linhagem 6S01) por 5 dias em temperatura de 25°C. Média e erro-padrão da média de 5 repetições. Letras distintas sobre as barras indicam valores estatisticamente diferentes.

Os resultados apresentados na Figura 6 são referentes ao segundo experimento realizado *in vitro*. O gráfico mostra os resultados obtidos para cada fonte de fosfato testada no primeiro dia e após cinco dias de incubação. Novamente a levedura *T. globosa* linhagem 6S01 foi responsável por um aumento da concentração de P solúvel no meio de cultura NBRIP nos tratamentos com levedura e com fosfato natural. O inverso foi observado para os tratamentos que receberam Fosfato Tricálcico, em que no primeiro dia do ensaio a concentração de P no meio foi maior que após cinco dias de incubação. Isso pode ser explicado pelo consumo que o próprio micro-organismo realiza deste nutriente no meio de cultura.



**Figura 6.** Concentrações de P em meio de cultura NBRIP após adição das diferentes fontes de fosfato ao meio e cultivo da levedura *T. globosa* linhagem 6S01. Análises realizadas no primeiro dia de experimento e após cinco dias em incubação. Média e erro-padrão da média de 5 repetições.

A Figura 7 também é referente ao segundo experimento *in vitro* realizado. São apresentados os resultados de concentração de P no meio de cultura, obtidos nos quatro tratamentos após cinco dias em incubação. É possível comparar os resultados entre os tratamentos para cada fonte de fosfato e entender se a levedura influenciou ou não na concentração de P no meio. O tratamento com levedura e com Fosfato de Itáfos apresentou aumento da concentração de P em 242% em relação ao tratamento de meio de cultura sem levedura e com Fosfato de Itáfos. E o tratamento de meio de cultura com levedura e com Fosfato de Araxá possui aumento da concentração de P em 104% em relação ao tratamento de meio de cultura sem levedura e com Fosfato de Araxá. Já os tratamentos com o Fosfato Tricálcico possuíram valores inversos, com maior concentração do fosfato no tratamento sem adição da levedura.

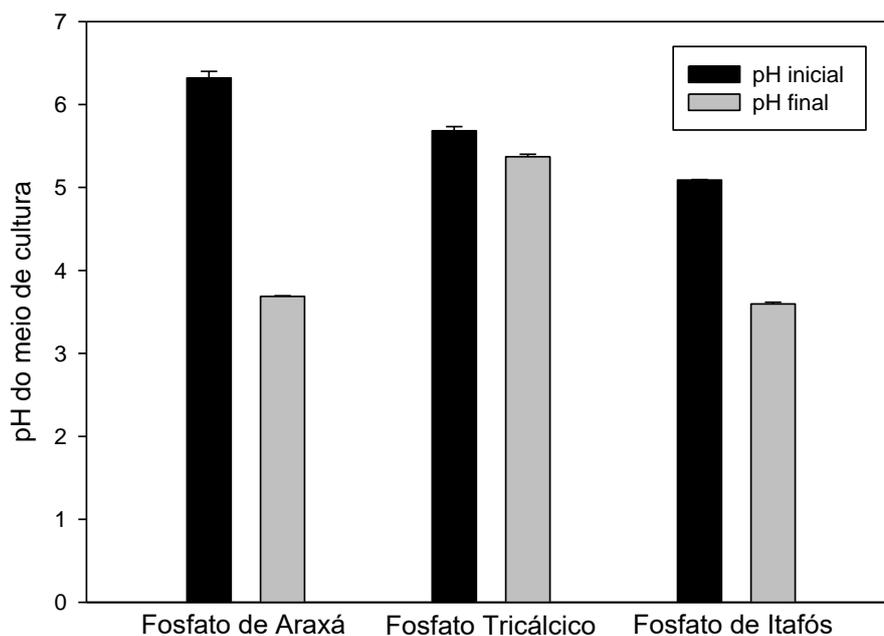


**Figura 7.** Concentrações de P em meio de cultura NBRIP após adição das diferentes fontes de fosfato ao meio e presença ou ausência da levedura *T. globosa* linhagem 6S01. Valores referentes a todos os tratamentos. Análises realizadas após cinco dias em incubação. Média e erro-padrão da média de 5 repetições. Letras distintas sobre as barras indicam valores estatisticamente diferentes. Dentro de cada ensaio (fosfato), letras maiúsculas comparam os tratamentos com fosfato enquanto letras minúsculas comparam os tratamentos sem fosfato.

Os micro-organismos podem usar diversos mecanismos para a mobilização de P de compostos de baixa solubilidade. Dentre eles há a liberação de moléculas orgânicas, que podem complexar formas adsorvidas ou precipitadas de fosfato inorgânico, tornando-as disponíveis para as plantas. A acidificação do meio de crescimento é outro dos mecanismos conhecidos de solubilização de minerais por organismos biológicos como plantas e micro-organismos (Whitelaw, 1999).

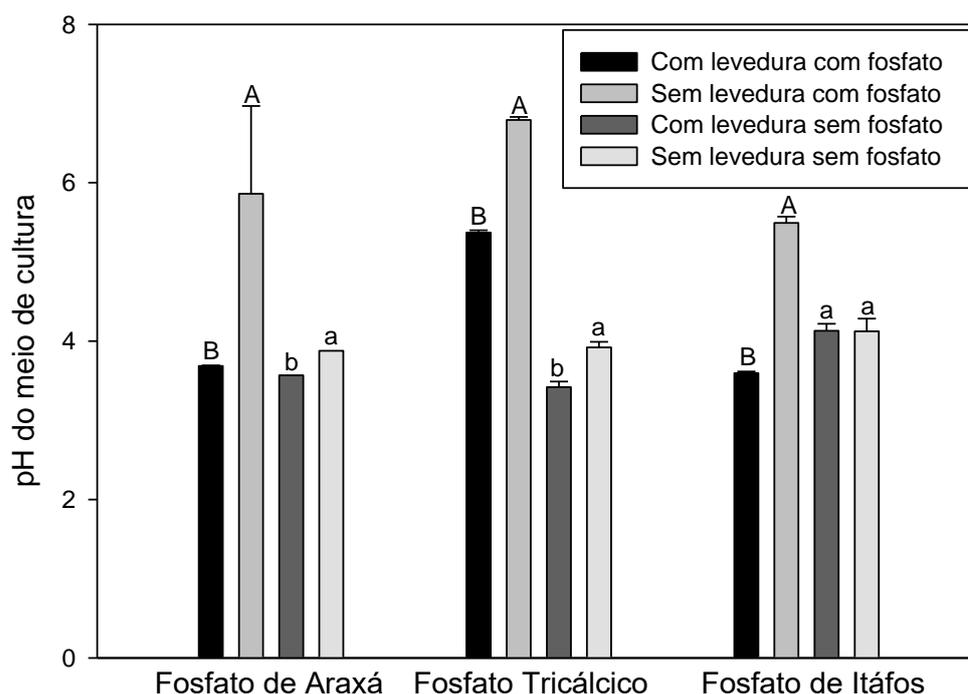
A Figura 8 é referente ao segundo experimento realizado e mostra os resultados do pH do meio de cultura logo após a montagem do ensaio (pH inicial) e após cinco dias em incubação (pH final) nos tratamentos que tiveram adição da levedura. Foi possível observar que nos ensaios com os fosfatos naturais de Araxá e de Itafós houve um aumento da acidez do meio entre o início e o término do período de crescimento da levedura. Estudo com solubilização de fosfatos naturais da literatura mostram uma queda no pH, que varia em média três unidades, nos ensaios com fosfato e com levedura em meio de

cultura (XIAO et al., 2008). Já no ensaio com Fosfato Tricálcico do presente estudo a acidificação do meio foi, proporcionalmente, mais reduzida. A dissertação de Rocha (2017) obteve resultados semelhantes quanto a acidificação do meio de cultura na presença do Fosfato Tricálcico, sendo que o pH final foi maior, em função de mecanismos como consumo de ácidos orgânicos, formação de compostos, lise e/ou morte de células que atuam na alcalinidade do meio.



**Figura 8.** Resultados do pH do meio de cultura NBRIP nos ensaios com Fosfato de Araxá, Fosfato Tricálcico e Fosfato de Itafós. Valores de pH do início e do final do período de cinco dias de crescimento da levedura no tratamento com levedura e com fosfato. Média e erro-padrão da média de 5 repetições.

A Figura 9 também é referente ao segundo experimento *in vitro* e apresenta os resultados de pH do meio de cultura após cinco dias em incubação para todos os tratamentos. Novamente é possível observar que nos ensaios com os fosfatos naturais de Araxá e de Itafós houve um aumento da acidez do meio quando há presença da levedura *T. globosa* e fosfato em relação aos tratamentos sem levedura com fosfato.



**Figura 9.** Resultados do pH do meio de cultura NBRIP após cinco dias de crescimento da levedura nos ensaios com Fosfato de Araxá, Fosfato Tricálcico e Fosfato de Itafós e presença ou ausência da levedura *T. globosa* linhagem 6S01. Valores referentes a todos os tratamentos. Média e erro-padrão da média de 5 repetições. Letras distintas sobre as barras indicam valores estatisticamente diferentes. Dentro de cada ensaio (fosfato), letras maiúsculas comparam os tratamentos com fosfato enquanto letras minúsculas comparam os tratamentos sem fosfato.

No presente trabalho, a avaliação de concentração de P solúvel no meio de cultura mostraram eficiência na solubilização das fontes de fosfato natural testadas e as análises de pH, por sua vez, sugerem que a eficiência da solubilização está relacionada a acidificação do meio. Mais estudos devem ser conduzidos para identificar os ácidos ou outras substâncias que atuam como agentes da solubilização assim como a condução de outros testes para aplicações industriais e agrícolas da levedura.

#### 4.2. Resultados obtidos nos experimentos *ex vitro*

Nos experimentos *in vitro* do presente trabalho e na dissertação de Rocha (2017), os ensaios realizados revelaram boa capacidade de solubilização de fosfatos de cálcio pela levedura *T. globosa*. A partir disso, a hipótese testada na etapa *ex vitro* do projeto é que a *T. globosa* aumenta a aquisição de P por plantas de cana-de-açúcar inoculadas com a levedura e cultivadas em solo fertilizado com o fosfato natural. Portanto, melhoraria o

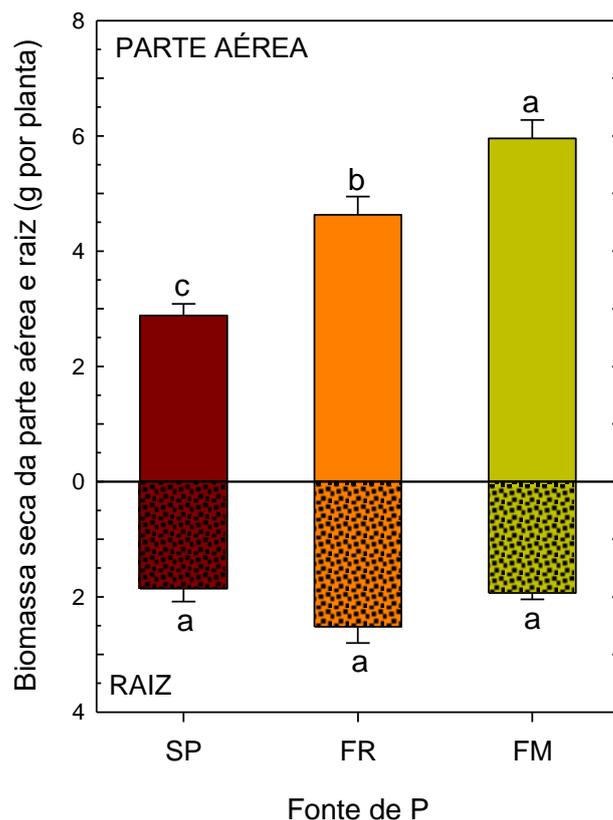
suprimento de P para as raízes das plantas, e poderia ter efeito benéfico no crescimento vegetal de cana-de-açúcar.

O primeiro experimento conduzido *ex vitro* do presente trabalho ocorreu com mudas obtidas a partir da brotação de minitoletes de cana-de-açúcar. Observou-se que as mudas apresentaram heterogeneidade no crescimento, sendo esta uma dificuldade encontrada logo no início do período de cultivo das plantas. Após 50 dias de cultivo em vasos com solo fertilizado, foi avaliado o crescimento líquido foliar, número de folhas e biomassa seca da parte aérea. Houve pouca variação no crescimento e acúmulo de biomassa das plantas entre os tratamentos. Os resultados sugerem que não houve falta significativa de P para as plantas no período de cultivo de 50 dias, mesmo no tratamento onde se esperava que isto ocorresse (tratamento com adição de fosfato natural sem levedura). Se esta hipótese estiver correta, ainda que a levedura tenha solubilizado o fosfato natural e aumentado o suprimento de P para a planta (tratamento com adição de fosfato natural e adição de levedura), isso não foi suficiente para causar diferença em relação ao tratamento sem a presença do micro-organismo.

No segundo experimento realizado *ex vitro* ocorreram outras avaliações que serão apresentadas abaixo. Entretanto, após o período de cultivo de 62 dias, também não foi observada interação significativa entre os fatores fosfato e levedura. A falta de interação entre os fatores pode ser justificada pelo pouco tempo de cultivo das plantas. Assim como observado por Paredes Filho et al. (2020) no experimento *ex vitro*, o valor de P disponível no solo pode aumentar com o tempo, exigindo, portanto, mais pesquisas. Também como discutido por Gatiboni et al. (2008), em solos com baixo teor de P e de resíduos de plantas, o P microbiano tem pouca importância para a nutrição das plantas.

Os próximos resultados apresentados são referentes ao segundo experimento realizado com a levedura *T. globosa* linhagem 5S55.

A Figura 10 apresenta os dados obtidos da biomassa seca da parte aérea e raiz das plantas de cana-de-açúcar. A maior média encontrada para valores da parte aérea foi com o tratamento que recebeu fosfato monocálcico (FM). Isso pode ser explicado pela maior oferta de P prontamente disponível neste tratamento, garantindo maior crescimento da planta. Não houve diferença estatística na biomassa seca de raiz entre os tratamentos. Porém, a média do tratamento que recebeu fosfato de rocha (FR) elevou a biomassa seca de raiz em 30% em relação ao tratamento com FM.

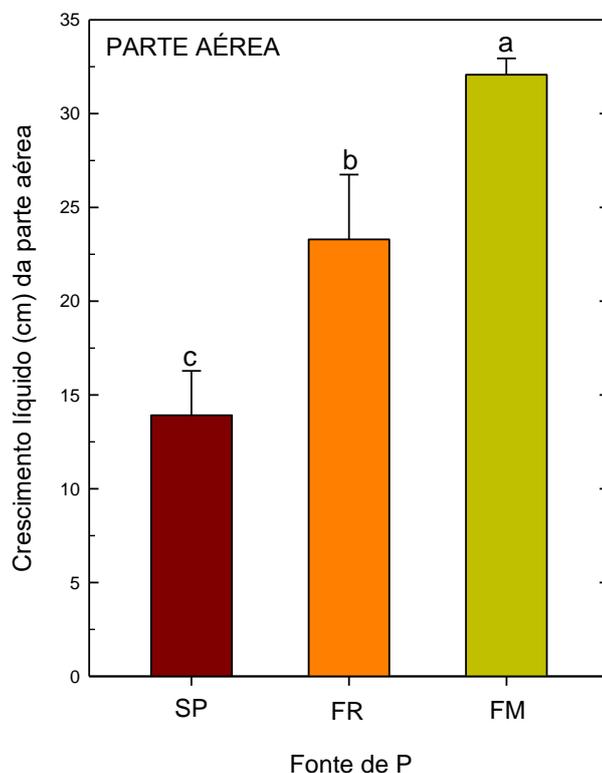


**Figura 10.** Biomassa seca da parte aérea e raiz de cana-de-açúcar crescida com três fontes de fósforo [sem fósforo (SP), fósforo de rocha (FR) e fósforo monocálcico (FM)]. Barras mostram a média e as linhas verticais o erro-padrão da média de 4 repetições. Dentro das partes da planta (parte aérea e raiz) letras distintas sobre as barras indicam valores estatisticamente diferentes (teste de Tukey a 5% de probabilidade).

Não houve interação entre os fatores levedura e fonte de P para os resultados de biomassa seca. Mesmo assim, houve melhor resultado na parte aérea do tratamento que recebeu fósforo natural (FR) em comparação com o tratamento na ausência de fósforo (SP). O Fósforo Natural de Itafós (FR) tem, portanto, potencial de fornecimento de P mesmo sem a ação de solubilização da levedura apresentada anteriormente *in vitro*. Nestas condições de cultivo de cana-de-açúcar, o tratamento com FM teve o melhor resultado. Porém, fontes de fósforo prontamente solúveis apresentam efeitos negativos a longo prazo, devido a reações de retenção no solo, tornando-se indisponível às plantas ao longo do tempo. Esse efeito de disponibilidade imediata ocorre em menor intensidade com fontes menos solúveis, como os fosfatos naturais (Chagas, 2014).

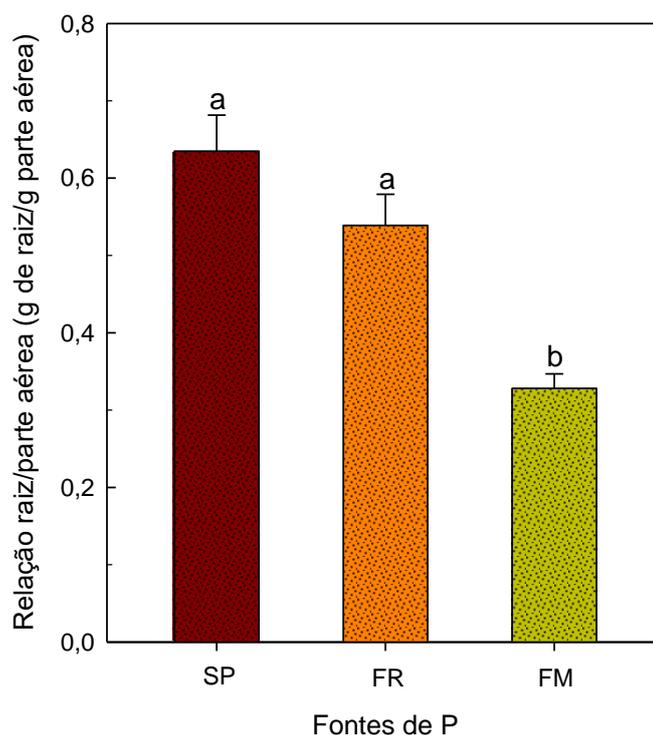
No teste de Tukey a 5% de probabilidade os resultados de número de folhas são estatisticamente iguais entre os tratamentos e não houve interação entre os fatores levedura e fontes de fósforo. Plantas de todos os tratamentos tiveram 6 folhas, em média.

A Figura 11 mostra o crescimento líquido foliar das plantas de cana-de-açúcar. Os resultados abaixo mostram a média da diferença entre as duas medições. O tratamento com adição de FM teve maior crescimento líquido foliar, seguido do tratamento com adição de fosfato de rocha (FR), que se mostrou capaz de fornecer o nutriente quanto comparado ao tratamento sem adição de P (SP).



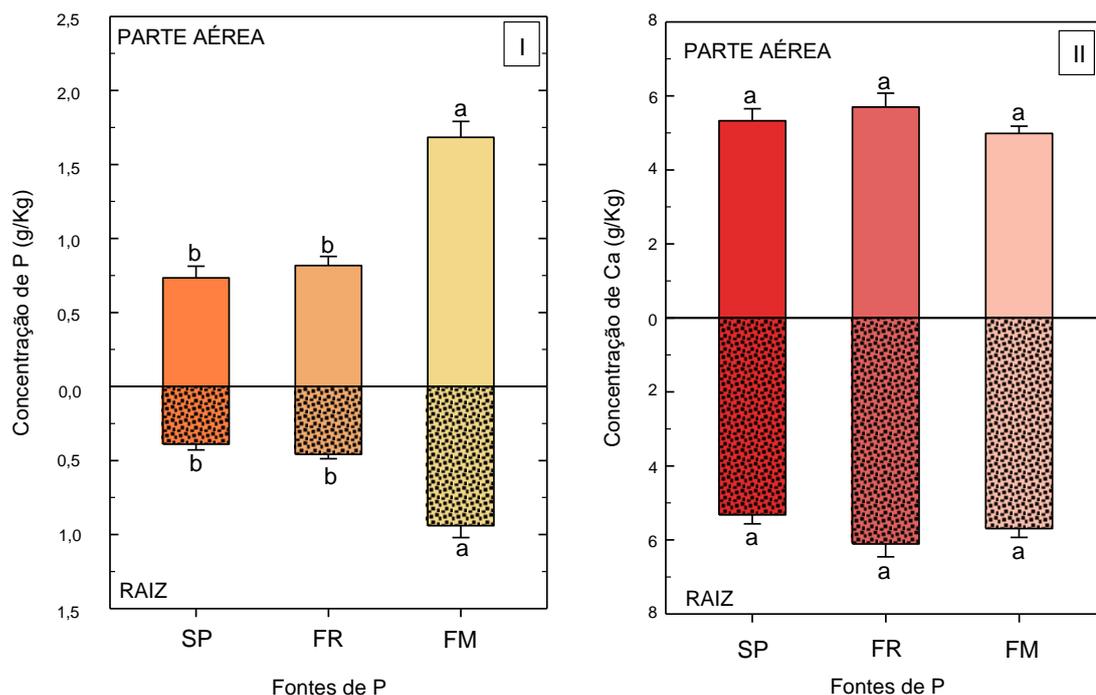
**Figura 11.** Crescimento líquido foliar em centímetros. Valores obtidos a partir da diferença entre o comprimento de folhas inicial (dia do plantio) e final (após 62 dias de cultivo). Barras mostram a média e as linhas verticais o erro-padrão da média de 4 repetições. Letras distintas sobre as barras indicam valores estatisticamente diferentes (teste de Tukey a 5% de probabilidade).

A Figura 12 apresenta os resultados da relação raiz/parte aérea da biomassa seca das plantas. Nos tratamentos SP e com adição de FR houve maior média em relação ao tratamento com adição de FM. Isso pode ter ocorrido porque no tratamento com FM as plantas estavam em condições mais favoráveis, que proporcionaram, como visto anteriormente, maior crescimento líquido foliar. O crescimento das raízes responde ao ambiente do solo, o que propicia plasticidade na forma, no tamanho e na distribuição do sistema radicular. Em condições de estresse, como a falta de um macronutriente, as plantas podem alocar mais recursos para as raízes. Esta maior alocação visa formar mais raízes e aumentar o volume de solo explorado, em busca de maior suprimento de P.



**Figura 12.** Relação raiz/parte aérea. Resultados obtidos pelo quociente entre os valores de biomassa seca das raízes e da parte aérea da planta. Barras mostram a média e as linhas verticais o erro-padrão da média de 4 repetições. Letras distintas sobre as barras indicam valores estatisticamente diferentes (teste de Tukey a 5% de probabilidade).

Concentrações de P e Ca (g/Kg) foram avaliadas após a secagem da parte aérea e raízes das plantas. Os resultados de concentração destes nutrientes não apresentaram interação significativa entre os fatores fosfato e levedura. As fontes de P tiveram efeito significativo sobre a concentração de P, mas não sobre a concentração de Ca nas plantas. O tratamento com adição de FM apresentou concentração de P tanto na parte aérea quanto nas raízes significativamente superior àquelas observadas nas outras fontes de P (Figura 13I). Houve baixa concentração de P no tratamento com adição de FR, acusando baixa eficiência, nestas condições, da capacidade de solubilização deste nutriente pela levedura *T. globosa*. Tellechea (2007) também não observou aumento no conteúdo de P da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar com inoculação de bactérias, porém tais conteúdos aumentaram proporcionalmente à medida em que se aumentou as doses de P no solo. As médias de concentração de Ca da parte aérea e raiz não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 13II).



**Figura 13.** Concentração de P (13I) e de Ca (13II) (g/Kg) na parte aérea e raízes das plantas. Barras mostram a média e as linhas verticais o erro-padrão da média de 3 repetições. Letras distintas sobre as barras indicam valores estatisticamente diferentes (teste de Tukey a 5% de probabilidade).

Outra medida realizada foi o cálculo do Índice de Eficiência Agronômica (IEA). Os valores obtidos são apresentados na Tabela 2.

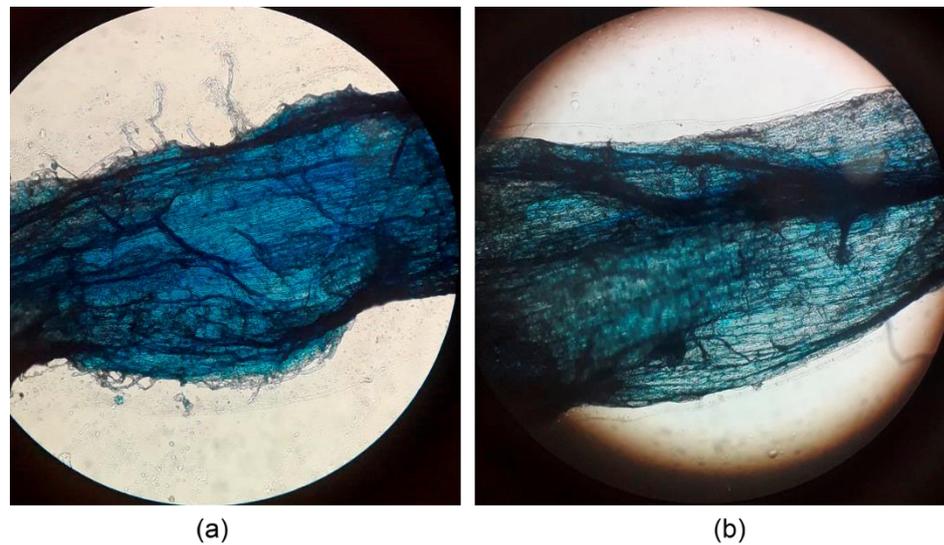
**Tabela 2.** Índice de Eficiência Agronômica (%) do Fosfato Natural de Itafós ( $IEA = [(biomassa\ FR - biomassa\ SP) / (biomassa\ FM - biomassa\ SP)] \times 100$ ). Valores considerando a produção de biomassa total (raiz + parte aérea) de 3 repetições por tratamento, conteúdo de P total (raiz + parte aérea) de 3 repetições e conteúdo total de Ca (raiz + parte aérea) de 3 repetições.

Biomassa total	Conteúdo total de P	Conteúdo total de Ca
95,6	26,9	137,1

A eficácia agronômica dos FNs é inconstante e os bons resultados são mais prováveis quando as combinações adequadas de FN, solo, espécies de plantas, organismos do solo, sistema de cultivo e manejo do solo são utilizados (Lopes et al, 2022).

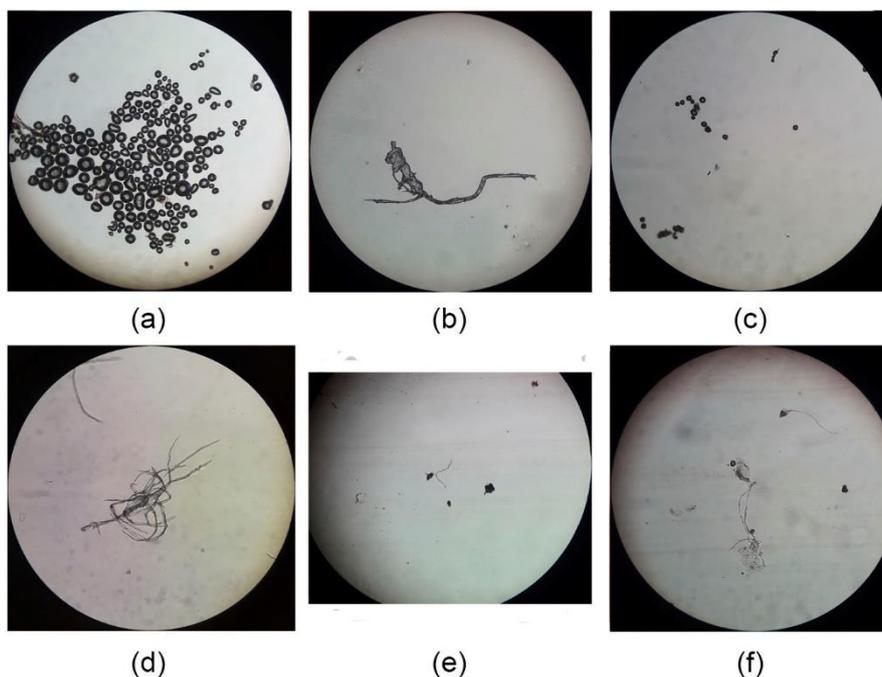
Na Figura 14 são apresentadas imagens obtidas durante a avaliação da colonização micorrízica do tratamento de Fosfato Natural de Itafós na presença de levedura. Esta técnica de coloração das raízes é realizada para melhor visualização de fungos endofíticos nas células do tecido das raízes, entretanto não foi possível realizar

uma contagem padronizada dos pontos de colonização observados. A coinoculação de leveduras e fungos em ensaios *ex vitro* é uma boa maneira de promover o crescimento das plantas, pois juntos esses micro-organismos podem modificar o sistema radicular da planta e manipular as vias hormonais, como a produção de citocininas e auxinas que promovem o alongamento da raiz (Hardoim, 2006; Moreira, 2019).



**Figura 14.** Imagens obtidas durante a avaliação de colonização micorrízica.

A análise de detecção e contagem de esporos ocorreu para poucas repetições (Figura 15). Assim como para a avaliação anterior, os resultados não foram conclusivos porque houve dificuldade na contagem desses esporos. Isso se dá pelo fato de a contagem ser feita manualmente, com o auxílio de microscópio ou lupa, além da contagem exigir habilidade para diferenciação dos esporos de outros elementos que permanecem nas amostras. Alguns exemplos são partículas minerais e fragmentos de hifas. Mesmo após a passagem pela peneira de retenção de esporos, a porção de solo em análise permaneceu com impurezas. Outra dificuldade encontrada para esta avaliação é seguir uma ordem para não contar esporos repetidos ou deixar de contar algum para a mesma amostra.



**Figura 15.** Imagens obtidas durante a avaliação de colonização micorrízica.

## 5. CONCLUSÃO

---

Conclui-se que durante os ensaios *in vitro* houve queda do pH do meio de cultura na presença de fosfato natural e levedura. Além disso a levedura *Torulaspora globosa* linhagem 6S01 foi responsável por um aumento significativo da concentração de fósforo solúvel no meio de cultura NBRIP nos tratamentos com levedura e com fosfato natural. Nos ensaios *ex vitro* não foi constatada interação significativa entre os fatores fosfato e levedura *T. globosa* linhagem 5S55 nas análises realizadas. Após o cultivo das plantas de cana-de-açúcar, o tratamento na presença de Fosfato Monocálcico apresentou maiores valores de crescimento líquido foliar, biomassa seca e concentração de P na parte aérea. Os resultados obtidos nos tratamentos na presença do Fosfato Natural de Itafós foram superiores quando comparados aos tratamentos sem adição de nenhuma fonte de fosfato nas avaliações de biomassa seca de parte aérea e raiz e de crescimento líquido foliar. Com isso, o potencial de solubilização de fosfatos naturais pela levedura *T. globosa* deve continuar sendo avaliado em ensaios conduzidos *ex vitro*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Arcand MM, Schneider KD. 2006. Plant- and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 78(4), 791-807.
- Bashan Y; Kamnev A; de-Bashan L. 2013. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biol Fertil Soils*, 49, 465-479.
- Boby VU et al. 2008. Interaction between *Glomus mosseae* and soil yeasts on growth and nutrition of cowpea. *Microbiological Research*, 163, 693-700.
- Botha A. 2011. The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 43, 1-8.
- Chagas WFT. 2014. Eficiência agrônômica do fosfato reativo de Bayóvar associado ou não à calagem no cultivo do capim-piatã. Dissertação de mestrado. Lavras: UFLA, 79p.
- Chaves DP, Zucareli C, Junior AO, Balan LC, Prado LA, Jordão LT. 2011. Eficiência agrônômica de fontes de fósforo associadas à inoculação com *Pseudomonas fluorescens* na produtividade de grãos do milho. In: XXXIII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo. Solos nos biomas brasileiros: sustentabilidade e mudanças climáticas. Uberlândia/Minas Gerais. Resumo expandido.
- Chien SH, Prochnow LI, Tu S, Snyder CS. 2011. Agronomic and environmental aspects of phosphate fertilizers varying in source and solubility: An update review. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 89, 229-255.
- Cy K et al. 2018. Phosphate-solubilizing characteristics of yeasts. *Mycosphere*, 9(6), 1117-1131.
- Dias DR, Schwan RF. Isolamento e identificação de leveduras. In: Moreira FM; Huising, EJ; Bignell, DE. Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade. Lavras: UFLA, 2010. p. 227-277.
- Faucon MP et al. 2017. Plant functional traits: soil and ecosystem services. *Trends in Plant Science*, 22(5), 385-394.
- Fonseca DS. 2018. Fosfato. In: Lima TM; Neves CAR (coords.) Sumário Mineral 2016. Brasília: DNPM, 131p.
- Fu SF, Sun PF, Lu HY, Wei JY, Xiao HS, Fang WT, Cheng BY, Chou JY. 2016. Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from the phyllosphere and rhizosphere of *Drosera spatulata* Lab. *Fungal Biology*, 120(3), 433-448.
- Gatiboni LC; Kaminski J; Rheinheimer DDS; & Brunetto G. (2008). Fósforo da biomassa microbiana e atividade de fosfatases ácidas durante a diminuição do fósforo disponível no solo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.43, n.8, p.1085-1091.
- Gerdemann JW; Nicolson TH. (1963). Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of British Mycological Society*, Cambridge UK. V46. N2. P235-244.
- Giles CD et al. 2014. Plant assimilation of phosphorus from an insoluble organic form is improved by addition of an organic anion producing *Pseudomonas* sp. *Soil Biology and Biochemistry*, 68, 263-269.
- Hallama, M. et al. 2019. Hidden miners – the roles of cover crops and soil microorganisms in phosphorus cycling through agroecosystems. *Plant and Soil*, 434, 7-45.

- Hardoim PR. 2006. Formação de micorriza arbuscular e análise do transcrito de raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum* na presença de herbicidas. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Hesham AE, Mohamed HM. 2011. Molecular genetic identification of yeast strains isolated from Egyptian soils for solubilization of inorganic phosphates and growth promotion of corn plants. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(1), 55-61.
- Horowitz N, Meurer, EJ. 2004. Eficiência agrônômica dos fosfatos naturais. In: Yamada T, Abdalla SRS. Fósforo na agricultura brasileira. Piracicaba: Potafos, 2004. p.665-688.
- Lambers H, Stuart Chapin F, Lons TL. *Plant physiological ecology*. 2.ed. New York: SpringerVerlag, 2008. 605p.
- Lopes VA. Eficiência agrônômica de fosfato natural em sistemas de espécies vegetais consorciadas. Orientador: Eduardo Dal'Ava Mariano. 2018. 26p. TCC (Graduação) – Curso de Bacharelado em Agroecologia, Universidade Federal de São Carlos, Araras.
- Lopes VA; Wei MCF; Cardoso TM; de Souza Martins E; Casagrande JC; & Mariano EDA. (2022). Phosphorus acquisition from phosphate rock by soil cover crops, maize, and. *Scientia Agricola* 79: e20200319.
- Malavolta E. *Elementos de nutrição mineral de plantas*. São Paulo: Agrônômica Ceres, 1980. 251p.
- Marra LM et al. 2012. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. *Plant and Soil*, 357, 289-307.
- Menezes-Blackburn D et al. 2018. Opportunities for mobilizing recalcitrant phosphorus from agricultural soils: a review. *Plant and Soil*, 427, 5-16.
- Miransari M. Biological fertilization. In: Méndez-Vilaz A. (Ed.) *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*. Microbiology Book Series, p.168-176, 2010.
- Moreira FMS, Siqueira JO. 2006. *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2.ed. atual. e ampl. Lavras: Editora UFLA. 729p.
- Moreira GAM. (2019). *Diversidade e ecologia de leveduras em solos brasileiros*. Dissertação de doutorado. Brasília: UnB, 186p.
- Mundra S, Arora R, Stobdan T. 2011. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel temperature-, pH-, and salt-tolerant yeast, *Rhodotorula* sp. PS4, isolated from seabuckthorn rhizosphere, growing in cold desert of Ladakh, India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(10), 2387-2396.
- Novais RF, Smyth TJ, Nunes FN. Fósforo. In: Novais RF, Alvarez V VH, Barros NF, Fontes RLF, Cantarutti RB, Neves JCL (eds.). *Fertilidade do solo*. Viçosa: SBCS, 2007. p. 371–550.
- Paredes Filho MV; Silva ABD; & Florentino LA. (2020). Solubilization of Araxá natural phosphate and decomposition of plant residues by bacterial isolates. *Ciência e Agrotecnologia*, 44: e008420.
- Pavinato PS et al. 2017. Effects of cover crops and phosphorus sources on maize yield, phosphorus uptake, and phosphorus use efficiency. *Agronomy Journal*, 109(3), 1-9.
- Prochnow LI; Alcarde JC; Chien SH. Eficiência agrônômica dos fosfatos totalmente acidulados. In: Yamada T; Abdalla SRS (eds). *Fósforo na agricultura brasileira*. Simpósio sobre fósforo na agricultura brasileira. Piracicaba: Potafos, 2004. p. 605-663.
- Raij B van; Cantarella H; Quaggio JA; Furlani AMC. *Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo*. Campinas: IAC. Boletim Técnico n.100, 1996. 258p.
- Reijnders L. 2014. Phosphorus resources, their depletion and conservation, a review. *Resources, Conservation and Recycling*, 93, 32-49.

- Richardson AE et al. 2011. Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. *Plant and Soil*, 349, 121-156.
- Rocha RK. 2017. Solubilização in vitro de fosfato por *Torulaspora globosa*. Dissertação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados. São Carlos: UFScar, 59p.
- Sarabia M; Jakobsen I; Gronlund M; Carreon-Abud Y; & Larsen J. 2017. Rhizosphere yeasts improve P uptake of a maize arbuscular mycorrhizal association. *Appl Soil Ecol*. 125:18-25p.
- Sarabia M; Cazares S; González-rodríguez A; & Mora F. 2018. Rhizosphere plant growth promotion traits of rhizosphere yeasts and their response to soil characteristics and crop cycle in maize agroecosystems. *Rhizosphere*. 6, 67-73p.
- Souza RM, Sobral LF, Viégas PRA, Junior AO, Carvalho MCS. 2014. Eficiência agrônômica de fosfatos de rocha em solo com elevado teor de cálcio trocável. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 38(6), 1816-1825.
- Stamford NP et al. 2007. Agronomic effectiveness of biofertilizers with phosphate rock, Sulphur and *Acidithiobacillus* for yam bean grown on a Brazilian tableland acidic soil. *Bioresource Technology*, 98, 1311-1318.
- Stamford NP et al. 2008. Effectiveness of phosphate and potash rocks with *Acidithiobacillus* on sugarcane yield and their effects on soil chemical attributes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(10), 2061-2066.
- Stamford NP et al. 2016. Rock biofertilizer and earthworm compost on sugarcane performance and soil attributes in two consecutive years. *Scientia Agricola*, 73(1), 29-33.
- Strickland JDH; Parsons TR. 1960. A manual of seawater analysis. *Bulletin Fisheries Research Board of Canada*, 125, 185p.
- Tellechea FRF. 2007. Fungos micorrízicos, bactérias diazotróficas endofíticas e fósforo no crescimento e acúmulo de nutrientes em mudas de cana-de-açúcar. Dissertação de Mestrado em Produção Vegetal. Campos dos Goytacazes: UENF. 53p.
- Whitelaw MA. 1999. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*, 69, 99-151.
- Withers PJA et al. 2014. Feed the crop not the soil: rethinking phosphorus management in the food chain. *Environmental Science & Technology*, 48, 6523-6530.
- Withers PJA et al. 2018. Transitions to sustainable management of phosphorus in Brazilian agriculture. *Scientific Reports*, 8, 2537.
- Xiao C; Chi RA; Huang XH; Zhang WX; Qiu GZ; Wang DZ. 2008. Optimization for rock phosphate solubilization by phosphate-solubilizing fungi isolated from phosphate mines. *Ecological Engineering*, 33(2), 187-193.
- Zhang L. 2002. Biological fertilizer based on yeasts. United States Patent issued on July 9, No. US 6,416,982 B1.
- Zhang L et al. 2018. Closing the loop on phosphorus loss from intensive agricultural soil: a microbial immobilization solution? *Frontiers in Microbiology*, 9: 104.