



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

SOLUBILIZAÇÃO *IN VITRO* DE FOSFATO POR *TORULASPORA GLOBOSA*

RENATA KÜHL ROCHA

Araras

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

SOLUBILIZAÇÃO *IN VITRO* DE FOSFATO POR *TORULASPORA GLOBOSA*

RENATA KÜHL ROCHA

ORIENTADOR: PROFa. DRa. MÁRCIA MARIA ROSA MAGRI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE EM PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

Araras

2017

Rocha, Renata Kühl

Solubilização in vitro de fosfato por *Torulaspora globosa* / Renata Kühl

Rocha. -- 2017.

59 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras

Orientador: Márcia Maria Rosa Magri

Banca examinadora: Márcia Maria Rosa Magri; Francisco Eduardo de Carvalho Costa; Silvana Perissatto Meneghin

Bibliografia

1. Solubilização de fosfato in vitro. 2. Promoção de crescimento vegetal.
3. *Torulaspora globosa*. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos.
III. Título.



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Renata Kúhl Rocha, realizada em 02/05/2017:

Profa. Dra. Marcia Maria Rosa Magri
UFSCar

Prof. Dr. Francisco Eduardo de Carvalho Costa
Inatel

Profa. Dra. Silvana Perissatto Meneghin
UFSCar

“Pois as suas qualidades invisíveis – isto é, seu poder eterno e Divindade – são claramente vistas desde a criação do mundo, porque são percebidas por meio das coisas feitas, de modo que eles não têm desculpa”
(Romanos 1:20 - Tradução do Novo Mundo da Bíblia Sagrada).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que criou todas as coisas, pela possibilidade de estudar e entender suas criações, que mostram claramente suas qualidades, como poder e sabedoria;

À minha querida orientadora e amiga, Prof.^a Dr.^a Márcia Maria Rosa Magri, agradeço por todo seu apoio, confiança e amizade, durante toda a realização desse trabalho;

Aos meus pais Sérgio e Ana; por toda a paciência, ajuda e por sempre me apoiarem em tudo na vida.

Aos meus irmãos Ricardo e Vanessa, e a minha irmã gêmea e melhor amiga Raquel, por sempre me incentivarem e me acompanharem, em todos os momentos;

À minha querida amiga Lúcia Picollo, por tornar os meus dias no LAMAM tão agradáveis, por todo seu incentivo, carinho e amizade;

Aos professores do CCA que muito admiro, em especial a Prof.^a Dra Sandra Regina Cecatto Antonini, Prof.^a Dra Silvana Perisatto Meneghin, Prof.^a Dra Maria Leonor Lopes Assad, Prof. Dr. Eduardo D'Ava Mariano e Prof. Dr. Márcio Roberto Soares, pelas muitas contribuições, pela amizade e incentivo, e por me tornarem capaz de executar esse trabalho;

Às minhas amigas de pós-graduação, Elaine, Michelle, Jéssica Foschini, Bruna e Odila; e aos colegas do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular – LAMAM, Anna Lívia, Ariane, Bianca, Jéssica Albertini, Luana, Luis Gustavo, Rodolfo, Thaís, e a todos os outros, pela amizade e todo apoio que me deram nessa jornada;

Ao meu amigo Mário Freitas, pela sua companhia neste projeto e por sua dedicação em sempre me ajudar;

Aos professores, técnicos e estagiários do laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos, CCQA, do Instituto de Tecnologia de Alimentos, ITAL, que contribuíram muito para minha formação na área da microbiologia, que foi essencial neste projeto;

Ao Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, pela oportunidade de realização desse trabalho.

Agradeço também a todos que contribuíram de alguma forma para que eu chegasse até aqui.

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVOS.....	03
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	04
3.1 O solo como habitat de micro-organismos.....	04
3.2 Ocorrência e diversidade de leveduras no solo e capacidade de promoção de crescimento em plantas.....	07
3.3 Solubilização microbiana de fósforo.....	08
3.3.1 A disponibilidade de fósforo no solo.....	08
3.3.2 Micro-organismos na solubilização de fósforo.....	10
3.3.3 Interferência de fatores ambientais na biossolubilização <i>in vitro</i> de fósforo.....	15
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1 Isolamento de leveduras rizosféricas de milho e cana-de- açúcar.....	18
4.2 Seleção de linhagens com potencial de solubilização de fosfato tricálcico.....	19
4.3 Solubilização de fósforo em meio líquido e avaliação de fatores.....	21
4.4 Variáveis de resposta no processo de solubilização de fósforo.....	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1 Isolamento de leveduras rizosféricas e seleção quanto a capacidade de solubilização de fósforo em meio sólido.....	25
5.2 Influência da temperatura de incubação na solubilização do fósforo.....	29
5.3 Influência de diferentes níveis de pH na solubilização do	

fósforo.....	34
5.4 Influência da velocidade de agitação na solubilização do fósforo.....	36
5.5 Parâmetros cinéticos no processo <i>in vitro</i> de solubilização do fósforo.....	39
6 CONCLUSÕES.....	43
7 LITERATURA CITADA.....	45
APÊNDICE.....	57

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Relação entre a densidade de grupos específicos de microrganismos encontrados em solo rizosférico de trigo e lupinos e solo não rizosférico.....	06
Tabela 2. Delineamento experimental em meio líquido NBRIP.....	22
Tabela 3. Solubilização de fosfato tricálcico em meio sólido modificado BDYA	27
Tabela 4. Concentração de fósforo solúvel (mg/L) e taxa de solubilização, obtidos após 5 dias de incubação, em diferentes temperaturas.....	29
Tabela 5. Média obtida para valor de pH final nos ensaios com diferentes temperaturas.....	31
Tabela 6. Média obtida para valor de absorbância (660 nm) nos ensaios com diferentes temperaturas.....	33
Tabela 7. Concentração de fósforo solúvel (mg/L) e taxa de solubilização, obtidos após 5 dias de incubação, em diferentes valores de pH inicial do meio.....	34
Tabela 8. Média obtida para valor de pH final nos ensaios com diferentes níveis de pH inicial.....	35
Tabela 9. Média obtida para valor de absorbância (660 nm) nos ensaios com diferentes níveis de pH inicial	36
Tabela 10. Concentração de fósforo solúvel (mg/L) e taxa de solubilização, obtidos após 5 dias de incubação, em diferentes velocidades de agitação.....	37
Tabela 11. Média obtida para valor de pH final nos ensaios com diferentes níveis de agitação.....	38
Tabela 12. Média obtida para valor de absorbância (660 nm) nos ensaios com diferentes níveis de agitação.....	38
Tabela 13. Concentração de fósforo solúvel (mg/L) e taxa de solubilização obtidos nos ensaios analisados em intervalos de 24 horas.....	40
Tabela 14. Média obtida para valor de pH final nos ensaios analisados em intervalos de 24 horas.....	40
Tabela 15. Média obtida para valor de absorbância (660 nm) nos ensaios analisados em intervalos de 24 horas.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ordem liotrófica de Parfitt sobre preferência de adsorção de ânions no solo.....	10
Figura 2. Representação dos principais mecanismos de solubilização, dessorção e mineralização do fósforo no solo mediados por microorganismos rizosféricos.....	12
Figura 3. Formação de um halo translúcido ao redor da colônia em meio BDYA modificado, pelas leveduras isoladas de rizosfera de milho 6S01 (a) e 6S02 (b); e de rizosfera de cana-de-açúcar 6S03 (c), 6S04 (d), 6S05 (e) e 6S06 (f).....	26
Figura 4. Células da levedura 6S01 visualizadas em lâmina em microscópio óptico, em zoom 40x.....	28
Figura 5. Quantificação de fósforo solúvel pela metodologia de Strickland & Parson (1960): (a) ensaio com levedura (b) ensaio com fosfato (c) ensaio com levedura + fosfato. Quanto mais escura a amostra, maior a concentração de fósforo solúvel.....	29
Figura 6. Floclulação nas células de <i>T. globosa</i> (6S01), visualizadas em câmara de Neubauer. Foto obtida em microscópio óptico, aumento de 400 x..	32
Figura 7. Liberação de fósforo solúvel (mg/L) e variação do pH final em intervalos de 24 horas.....	41
Figura 8. Liberação de fósforo solúvel (mg/L) e absorvância de células (660 nm) em intervalos de 24 horas.....	42

SOLUBILIZAÇÃO *IN VITRO* DE FOSFATO POR *TORULASPORA GLOBOSA*

Autor: RENATA KÜHL ROCHA

Orientador: Profa. Dra. MÁRCIA MARIA ROSA MAGRI

RESUMO

O solo é um ambiente com grande diversidade microbiana. Fungos filamentosos e bactérias são conhecidos há décadas pela capacidade de estimular o desenvolvimento vegetal. Recentemente, trabalhos mostram que leveduras também são capazes de beneficiar plantas, por exemplo, através da solubilização de fosfatos inorgânicos. Esse trabalho visa um maior entendimento da capacidade de leveduras rizosféricas na solubilização de fosfato tricálcico. Também visa o estudo da influência de fatores (pH, temperatura e agitação) no processo. Inicialmente, foi feito um isolamento de leveduras de rizosfera de milho e cana-de-açúcar. Os isolados foram avaliados quanto à capacidade de solubilizar fosfato tricálcico em meio sólido BDYA. O isolado com maior capacidade de solubilização foi identificado e avaliado quanto à capacidade de solubilização de fosfato tricálcico em meio líquido NBRIP, em diferentes níveis de temperatura (20, 25 e 30°C), pH inicial (3, 5 e 7) e agitação (0, 100, 150 e 200 rpm). Também foram feitas avaliações da solubilização em intervalos de 24 horas, de 1 a 7 dias. Foram obtidos seis isolados. Todos apresentaram resultado positivo para solubilização. A levedura 6S01 (*Torulaspora globosa*) apresentou a maior capacidade de solubilização. Após cinco dias, *T. globosa* solubilizou 26 a 35% do fósforo total no meio de cultura NBRIP. Não houve diferença significativa para nenhum dos parâmetros ambientais testados. Ensaio realizados em períodos de 1 a 7 dias mostraram que a levedura solubilizou uma quantidade máxima de fósforo em 48 horas (42%). Isso a torna interessante para aplicações industriais e agrícolas, visto que possui rapidez no processo de solubilização e pode ser empregada numa ampla faixa de condições. Foi possível compreender que um maior crescimento celular não está relacionado à eficiência na solubilização, e que a acidificação do meio pode ser um dos principais mecanismos utilizados pela levedura na solubilização *in vitro* do fosfato tricálcico.

Palavras-chave: solubilização de fosfato *in vitro*, promoção de crescimento vegetal, *Torulaspora globosa*.

IN VITRO SOLUBILIZATION OF PHOSPHATE BY *TORULASPORA GLOBOSA*

Author: RENATA KÜHL ROCHA

Adviser: Prof. Dr. MÁRCIA MARIA ROSA MAGRI

ABSTRACT

Soil is an environment with great microbial diversity. Filamentous fungi and bacteria have been known for decades for the ability to stimulate plant development. Recently, studies have shown that yeasts are also capable of benefiting plants, for example, through the solubilization of inorganic phosphates. This work aims at a better understanding of the ability of rhizospheric yeasts in the solubilization of tricalcium phosphate. It also aims to study the influence of factors (pH, temperature and agitation) in the process. Initially, isolates of corn and sugarcane rhizosphere yeasts were made. The isolates were evaluated for the ability to solubilize tricalcium phosphate in solid medium BDYA. The isolate with the highest solubilization capacity was identified and evaluated for the solubilization capacity of tricalcium phosphate in NBRIP liquid medium at different temperature levels (20, 25 and 30 ° C), initial pH (3, 5 and 7) and agitation (0, 100, 150 and 200 rpm). Solubilization evaluations were also performed at 24-hour intervals, ranging from 1 to 7 days. Six isolates were obtained. All presented a positive result for solubilization. The yeast 6S01 (*Torulaspota globosa*) had the highest solubilization capacity. After five days, *T. globosa* solubilized 26 to 35% of the total phosphorus in the NBRIP culture medium. There was no significant difference for any of the environmental parameters tested. Assays performed in periods of 1 to 7 days showed that the yeast solubilized a maximum amount of phosphorus in 48 hours (42%). This makes it interesting for industrial and agricultural applications, since it has a fast solubilization process and can be used in a wide range of conditions. It was possible to understand that a higher cell growth is not related to the efficiency in the solubilization, and that acidification of the medium may be one of the main mechanisms used by yeast in the *in vitro* solubilization of tricalcium phosphate.

Keywords: phosphate solubilization *in vitro*, plant growth promotion, *Torulaspota globosa*

1 INTRODUÇÃO

O solo abriga grande diversidade microbiana. Diferentes grupos de micro-organismos são essenciais a várias funções, tais como ciclagem de nutrientes, degradação da matéria orgânica e conservação da estrutura do solo (NÓBREGA et al., 2001; BENDING & TURNER, 2002; SIQUEIRA & MOREIRA, 2006). Alguns grupos são também muito conhecidos por estimular o desenvolvimento vegetal, incluindo fungos micorrízicos e rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (SIQUEIRA & MOREIRA, 2006; SWIFT et al., 2010).

A literatura científica apresenta diversos trabalhos sobre fungos e bactérias que beneficiam plantas, que têm sido estudados por muito tempo (AGNIHOTRI, 1970; KUCEY et al., 1989; HALDER et al., 1990). Porém pouco ainda se conhece sobre a função de leveduras no crescimento vegetal. Estudos recentes mostram que algumas espécies de leveduras também podem promover crescimento vegetal de diversas maneiras (EL-TARABILY & SIVASITHAMPARAM, 2006; XIN et al., 2009; ROSA et al., 2010; ROSA-MAGRI et al., 2011), como através da solubilização de fosfatos inorgânicos no solo (AMPRAYN et al., 2012; XIAO et al., 2013).

O fósforo é essencial ao desenvolvimento das plantas (TERRY & ULRICH, 1973; RYCHTER, 1992). Porém, esse elemento geralmente é encontrado em formas insolúveis no solo, adsorvido a óxidos de ferro ou alumínio, ou em formas precipitadas na solução do solo, complexadas a íons de alumínio, ferro ou cálcio (BRADY & WEIL, 1996; NOVAIS & SMITH, 1999). Essas formas de fosfato

insolúveis impedem a absorção de fósforo pelas plantas e limitam assim o desenvolvimento vegetal (GOEDERT et al., 1986; RAGHOTHAMA, 2000).

No Brasil, a maioria dos solos se apresenta pobre em fósforo disponível, devido a grande quantidade de óxidos de alumínio e ferro, o que traz limitações à produção agrícola (RAPPEL & LOIOLA, 1993; NOVAIS & SMITH, 1999). Torna-se então necessário o uso de fertilizantes fosfatados, o que se apresenta inviável, devido ao baixo nível de eficiência desses fertilizantes e ao alto custo de produção, que gera dependência do Brasil em relação ao mercado externo (AE et al., 1995; HINSINGER, 2001). Além disso, as fontes de fosfato para fabricação de fertilizantes têm se esgotado rapidamente no mundo todo (BOUWMAN et al., 2009). Isto torna essencial a busca por novas tecnologias, que promovam eficiência no uso do fósforo em terras agrícolas.

A limitação do fósforo na agricultura gerou um amplo estudo de micro-organismos solubilizadores de fósforo. Fungos filamentosos e bactérias têm sido estudados por décadas quanto à capacidade de solubilização de fosfatos no solo (AGNIHOTRI, 1970; KUCEY et al., 1989; HALDER et al.; 1990). Estudos mais recentes mostram que leveduras, em especial isoladas de rizosfera, possuem alta capacidade de solubilizar formas inorgânicas de fosfatos (XIAO et al., 2008, NARSIAN et al. 2010, MUNDRA et al., 2011; ANPRAYAN et al.; 2012, XIAO et al., 2013; NUTARATAT et al., 2014; FU et al. 2016).

Alguns desses estudos mostraram que a produção de ácidos orgânicos é o principal mecanismo utilizado por leveduras na solubilização *in vitro* de fosfato (XIAO et al.; 2008; XIAO et al.; 2013). Também mostram que fatores ambientais como pH, presença de oxigênio e temperatura influenciam a eficiência desse processo (XIAO et al., 2008; NARSIAN et al., 2010; MUNDRA et al., 2011; AMPRAYN et al., 2012; XIAO et al., 2013). Porém a função de leveduras do solo na solubilização de fosfato ainda é pouco compreendida. Ainda são necessários mais estudos para identificar e avaliar espécies de leveduras capazes de solubilizar fosfato; compreender quais são os mecanismos utilizados na solubilização e como os fatores ambientais podem influenciar a solubilização de fosfato por diferentes linhagens de leveduras. Espera-se que o maior entendimento da capacidade de leveduras na solubilização de fosfatos, auxilie no desenvolvimento de técnicas e produtos biotecnológicos, empregados com o objetivo de tornar a agricultura mais sustentável, diminuindo custos e impactos ambientais negativos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo desse estudo foi isolar, selecionar e avaliar o potencial de leveduras de rizosfera como promotoras de crescimento vegetal, através da solubilização de fosfato tricálcico, além de analisar a influência de fatores que possam afetar o processo de solubilização, *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar leveduras da rizosfera de milho e cana-de-açúcar;
- Selecionar as leveduras isoladas quanto a capacidade de solubilizar fosfato tricálcico *in vitro*, usando meio de cultura sólido;
- Quantificar a solubilização de fosfato tricálcico, em meio de cultura líquido, pelas leveduras selecionadas;
- Avaliar a influência de diferentes valores de pH inicial do meio, temperatura de incubação e agitação no processo de solubilização de fosfato tricálcico por leveduras, buscando a melhor condição para o processo;
- Avaliar parâmetros cinéticos do processo de solubilização e tentar compreender a relação dos parâmetros crescimento celular e variação do pH no processo de solubilização.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O solo como habitat de micro-organismos

O solo é um ambiente vivo e dinâmico que abriga uma grande quantidade de micro-organismos. Tratam-se dos seres vivos que apresentam a mais alta densidade nesse ambiente, valor que pode ultrapassar a 10 toneladas de biomassa viva por hectare (DECAENS et al., 1994). Estima-se que podem ser encontradas até 10^9 células de bactérias e 10^6 células de fungos para cada grama de solo (CURL & TRUELOVE, 1986).

Além do grande número de micro-organismos, podemos encontrar no solo uma alta diversidade de espécies, pertencentes a diferentes níveis taxonômicos. Essa diversidade taxonômica gera uma elevada diversidade funcional ou metabólica, com papel significativo nas reações bioquímicas que ocorrem nesse ambiente e na manutenção de sua resiliência (GIRVAN, 2005; SIQUEIRA & MOREIRA, 2006; SWIFT et al., 2010). Diferentes grupos de micro-organismos são essenciais a funções tais como conservação da estrutura do solo (NÓBREGA et al., 2001), ciclagem de nutrientes e degradação da matéria orgânica (BENDING & TURNER, 2002) e podem também favorecer o crescimento e desenvolvimento de plantas (ROSA et al., 2010; AMPRAYN et al, 2012).

Algumas regiões do solo são conhecidas por concentrar a maior parte da biomassa e diversidade microbiana, em especial a zona denominada rizosfera. A

rizosfera é definida como uma região do solo que sofre influência das raízes, com extensão variando de 1 a 5 mm. Alguns autores dividem essa região em endorrizosfera, que compreende uma porção interna da raiz, distante até 10 μm da superfície radicular; rizoplano, que compreende a superfície limite entre a raiz e o solo; e ectorrizosfera, a área externa das raízes, com extensão de até 20 μm (PAPAVIZAS & DAVEY, 1961; CURL & TRUELOVE, 1986).

A rizosfera apresenta características físicas, químicas e biológicas bastante distintas de outras regiões do solo. As raízes interferem na estrutura física do ambiente, que se apresenta com alta agregação de partículas e porosidade diferenciada. Além disso, as raízes provocam modificações químicas no solo, contribuindo para mudanças no pH, na concentração de gases e substâncias orgânicas, depositadas na forma de mucigel, exsudatos, secreções e lisados celulares. A alta concentração de substâncias orgânicas liberadas pelas raízes, como carboidratos, ácidos orgânicos, aminoácidos e fatores de crescimento, promovem uma intensa proliferação de micro-organismos (PAPAVIZAS & DAVES, 1961; CURL & TRUELOVE, 1986; SIQUEIRA & MOREIRA, 2006).

A quantidade de micro-organismos nesse ambiente chega a ser até mais de mil vezes maior do que em solo não rizosférico, conforme demonstram os estudos de Gray & Willians (1975) e Papavizas & Davey (1961) (Tabela 1). Isso torna a rizosfera uma fonte interessante para isolamento e bioprospecção de micro-organismos que podem favorecer práticas agrícolas ou bioprocessos industriais (AMPRAYN et al, 2012; JAYAPRAKASHVEL el a., 2015, FU et al. 2016).

A comunidade microbiana da rizosfera pode variar muito em função de fatores como espécie e cultivar vegetal, características do solo, tipo de manejo e uso da terra, e interações com outros organismos presentes no ambiente. Apesar da grande diversidade microbiana, já relatada na literatura, a maioria desses micro-organismos apresenta difícil isolamento e cultivo em laboratório, e ainda é desconhecida. Estima-se que 90 a 99% das espécies de micro-organismos do solo ainda não são conhecidas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Assim, torna-se importante o estudo da presença de diferentes espécies microbianas, funções metabólicas por elas executadas e possível aplicações na agricultura e indústria.

Tabela 1. Relação entre a densidade de grupos específicos de micro-organismos encontrados em solo rizosférico de trigo e lupinos e solo não rizosférico.

Organismos	UFC x 10 ⁶ .g ⁻¹		Relação R:S aproximada
	Rizosfera	Solo não rizosférico	
Trigo			
Bactérias	1200	53	23:1
Actinomicetos	46	7	7:1
Fungos	1,2	0,1	12:1
Protozoários	0,0024	0,001	2:1
Algas	0,005	0,027	0,2:1
Amonificadores	500	0,04	12500:1
Anaeróbias produtoras de gás	0,39	0,03	13:1
Anaeróbias	12	6	2:1
Desnitrificadores	126	0,1	1260:1
Aeróbias celulolíticas	0,7	0,1	7:1
Anaeróbias celulolíticas	0,009	0,003	3:1
Produtoras de esporos	0,930	0,575	2:1
Tipo "radiobacter"	17	0,01	1700:1
Lupinos			
Bactérias	159000	27300	6:1
Actinomicetos	46700	9100	5:1
Fungos	0,3	0,09	3:1
<i>Aspergillus ustus</i>	0,006	0,001	6:1

Fonte: Modificado de Papavizas & Davey (1961) e Gray & Willians (1975).

Diferentes grupos de micro-organismos são essenciais a funções como ciclagem de nutrientes, degradação da matéria orgânica e conservação da estrutura do solo. Alguns grupos são também muito conhecidos por estimular o desenvolvimento vegetal (SIQUEIRA & MOREIRA, 2006; SWIFT et al., 2010).

Há muitas décadas, bactérias e fungos filamentosos têm sido estudados como agentes que beneficiam o desenvolvimento de plantas (KLOEPPER et al., 1980; GLICK et al., 1997). Porém, estudos mais recentes mostram que algumas espécies de leveduras também podem promover crescimento vegetal (EL-TARABILY & SIVASITHAMPARAM, 2006; BOBY et al., 2008; XIAO et al. 2008;

ROSA et al., 2010; ROSA-MAGRI et al., 2011; XIN et al., 2009; AMPRAYN et al., 2012; XIAO et al., 2013; VELHAL, et al. 2014).

3.2 Ocorrência e diversidade de leveduras no solo e capacidade de promoção de crescimento em plantas

Leveduras podem ser definidas como fungos unicelulares e eucariotos, com diâmetro variando entre 1 e 5 μm , que pertencem aos filos Basidiomycota ou Ascomycota, e que se reproduzem principalmente de forma assexuada, por brotamento ou fissão celular. Existem cerca de 900 espécies conhecidas, distribuídas em 136 gêneros (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; DIAS & SCHWAN, 2010; WAKER, 2012). São micro-organismos muito utilizados na biotecnologia agroindustrial, pois apresentam fácil cultivo e elevada taxa de crescimento, o que as torna viáveis para uso na execução de diversos bioprocessos, como produção de alimentos e obtenção metabólitos de interesse industrial (DIAS & SCHWAN, 2010).

No solo, o número de células e diversidade de espécies de leveduras ocorre de forma bastante irregular, variando de 10 a 10^6 células por grama de solo, nos horizontes mais superficiais (DO-CARMO, 1969; PHAFF & STARMER, 1987; BOTHA 2011). Muitos fatores interferem na biomassa e presença de diferentes espécies, incluindo fatores relativos a características físicas do solo, como compactação, porosidade, textura e profundidade do perfil. A presença de poluentes orgânicos e inorgânicos, acidez, umidade e fatores nutricionais do solo, entre outras características químicas, também afetam a diversidade de leveduras encontradas. Também, fatores climáticos e biológicos, como a presença da macro e mesofauna de invertebrados, outros micro-organismos e sistemas de cultivos agrícolas provocam grande alteração na comunidade de leveduras (SLÁVIKOVÁ & VADKERTIOVÁ, 2003; VISHNIAC, 2006; DIAS & SCHWAN, 2010; YURKOV et al., 2012).

De modo geral, algumas espécies de leveduras têm sido comumente encontradas no solo de diferentes regiões no mundo e estão incluídas nos gêneros *Candida*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Brettanomyces*, *Hansenula*, *Torulopsis*, *Trichosporon* e *Debaryomyces* (DIAS & SCHWAN, 2010). Entretanto, ainda há pouco estudo sobre diversidade de leveduras que habitam o solo, e apenas 130

espécies aproximadamente já foram identificadas em todo o mundo (BAB'EVA & CHERNOV, 1995; YURKOV, 2012 et al.).

As leveduras encontradas no solo possuem um importante papel na decomposição da matéria orgânica, atuando como agentes secundários na degradação de substâncias recalcitrantes, como a lignina, e na mineralização de compostos orgânicos. Também podem atuar como condicionadores de solo, melhorando a agregação de partículas e estruturação do solo através da produção de compostos poliméricos (DIAS & SCHWAN, 2010; BOTHA, 2011). Além disso, a maioria delas possui uma grande faixa de habilidades metabólicas e têm sido aplicadas em estudos envolvendo biorremediação de poluentes (SALAM et al., 2013), produção de proteínas de interesse industrial (SINGH et al., 2013) e promoção de crescimento vegetal (ROSA et al., 2010).

Estudos recentes demonstraram que algumas leveduras são capazes de promover o crescimento vegetal de forma direta através da produção de fitohormônios (XIN et al., 2009; AMPRAYN et al., 2012) e indiretamente, através do controle de patógenos (EL-TARABILY & SIVASITHAMPARAM, 2006; ROSA et al., 2010; ROSA-MAGRI et al., 2011); efeitos sinérgicos na co-inoculação com micorrizas arbusculares (BOBY et al., 2008) e efeitos sinérgicos na co-inoculação com bactérias diazotróficas (VELHAL et al., 2014). Amprayn et al. (2012) e Xiao et al. (2013) também demonstraram que leveduras rizosféricas podem ser capazes de atuar como agentes na solubilização de formas inorgânicas de fósforo. Visto que a baixa concentração de fósforo no solo, numa forma acessível às plantas, é um dos fatores que limitam a fertilidade dos solos utilizados para práticas agrícolas, estudos como o de Amprayn et al. (2012) e Xiao et al. (2013) ganham cada vez mais importância, na busca por novas tecnologias sustentáveis.

3.3 Solubilização microbiana de fósforo

3.3.1 A disponibilidade de fósforo no solo

O fósforo é um elemento essencial na nutrição vegetal e na manutenção metabólica de praticamente todos os seres vivos. Possui funções de extrema importância como formação da molécula ATP e participação nas vias sintéticas de lipídeos, ácidos nucleicos e outras biomoléculas, além de influenciar nos processos

de fotossíntese (TERRY & ULRICH, 1973; RYCHTER, 1992). Nas plantas, também possui importância na formação de órgãos reprodutivos, produção de sementes e frutos com maior qualidade, e no desenvolvimento radicular. O excesso de fósforo não é prejudicial à planta, porém, a deficiência desse elemento pode causar graves danos, como redução na quantidade e qualidade de frutos e no desenvolvimento vegetal (MILTON et al., 1991; EREL et al., 2008).

O fósforo é absorvido pelas plantas principalmente nas formas aniônicas de H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} e PO_4^{3-} , sendo que a concentração dentro da célula vegetal chega a ser 100 vezes maior do que na solução do solo. Porém o teor de fósforo na solução do solo geralmente é baixo, com concentração inferior a 0,1 mg de fósforo por litro de solo (GOEDERT et al., 1986; RAGHOTHAMA, 2000).

A maior parte do fósforo é encontrada no solo em formas insolúveis, adsorvidas a óxidos e argilas, precipitadas ou associadas à matéria orgânica. Em solos ácidos, o elemento muitas vezes se apresenta fortemente adsorvido na superfície de óxidos de ferro e alumínio, ou na forma de precipitados na solução do solo, complexados a íons de ferro e alumínio (BRADY & WEIL, 1996; NOVAIS & SMITH, 1999). Em solos alcalinos, o fósforo pode se apresentar na forma de precipitado de magnésio e principalmente de cálcio, como fosfato monocálcico, fosfato bicálcico ou ainda fosfato tricálcico, uma forma muito presente e a mais insolúvel dentre as três. Essas formas complexadas causam uma baixa disponibilidade do elemento para absorção e assimilação pelas plantas (BRANCO et al., 2001; NOVAIS & SMITH, 1999; RAIJ, 2011).

A baixa disponibilidade de fósforo no solo causa grande limitação à produção agrícola brasileira. No Brasil, a maioria dos solos se caracteriza como altamente ácidos e intemperizados, principalmente sob a classificação de Latossolos, com grande quantidade de óxidos de ferro e alumínio. Esses solos apresentam baixa CTC (capacidade de troca catiônica) e consequente alta CTA (capacidade de troca aniônica), nos quais ocorre um aumento gradual da retenção de ânions, acentuado pelo intemperismo, tornando-os pobres em fósforo disponível. Isto se torna ainda mais preocupante pelo fato do ânion fosfato ser o preferido na adsorção pelos óxidos e argilas no solo, conforme a ordem liotrófica de Parfitt (1978) (Figura 1). Com o passar do tempo, os solos se tornam de caráter fonte para dreno de fósforo e competem fortemente com a planta na retenção do elemento (NOVAIS & SMITH, 1999).

O fosfato adsorvido ou precipitado pode existir em estado lábil, ou num estado ainda reversível para a forma iônica. Entretanto, o tempo de reação e as condições do ambiente podem favorecer o envelhecimento dessas formas, que adquirem constituição mineralógica mais estável, tornando-as não lábeis, de difícil solubilização (RAIJ, 2011).

Figura 1. Ordem liotrófica de Parfitt sobre preferência de adsorção de ânions no solo.

fosfato > arseniato > selenito = molibdato > sulfato = fluoreto > cloreto > nitrato

Fonte: Parfitt (1978).

De fato, estudos sugerem que no mundo todo, mais de 5,7 bilhões de hectares de solo não apresentam uma quantidade suficiente de fósforo disponível para manter culturas agrícolas (HINSINGER, 2001). Ocorre então uma grande necessidade de aplicação de fertilizantes fosfatados, que possuem um baixo nível de eficiência, dentre 10-25%, visto que são rapidamente adsorvidos ou precipitados no solo e se tornam indisponíveis para as plantas (AE et al., 1995; HINSINGER, 2001). No Brasil, a produção de fertilizantes fosfatados se apresenta inviável em vista da escassez de matéria-prima e altos custos de produção, o que gera uma dependência em relação ao mercado externo de fertilizantes (RAPPEL & LOIOLA, 1993). Estudos mais recentes também indicam que as fontes finitas de fosfato para a produção de fertilizantes estão se esgotando rapidamente em todo mundo (BOUWMAN et al., 2009). Assim, é importante o estudo de novas tecnologias agrosustentáveis, que promovam uma melhor eficiência no uso do fósforo no solo para culturas agrícolas.

3.3.2 Micro-organismos na solubilização de fósforo

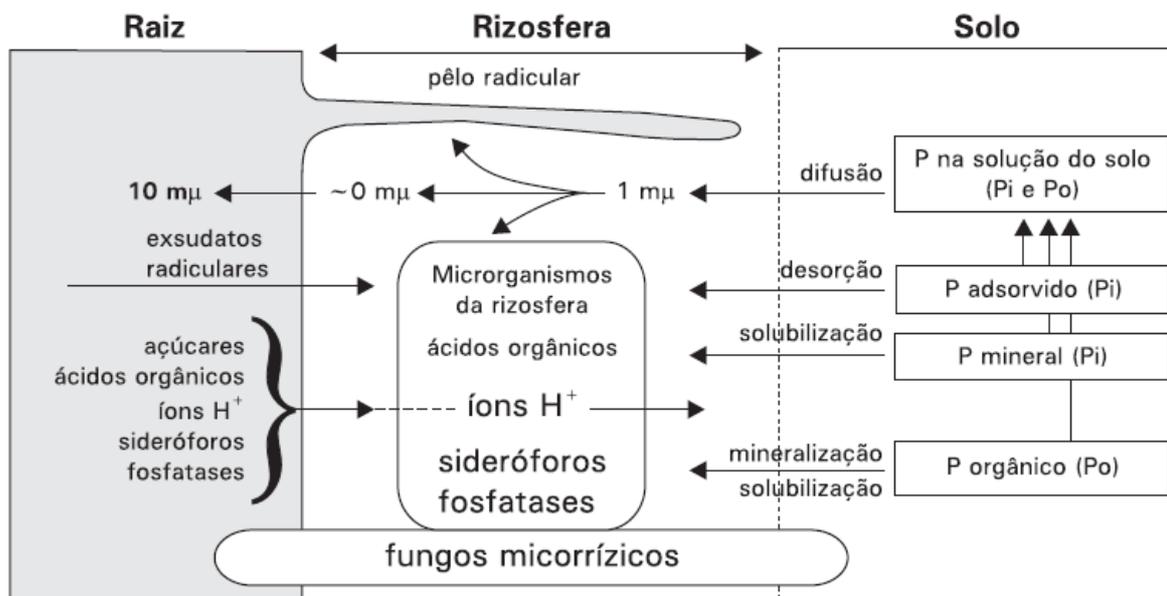
A partir da década 1950 foi iniciado o estudo da solubilização de fósforo promovida por agentes biológicos, com o uso de micro-organismos (KUCEY et al., 1989). Os micro-organismos do solo são capazes de imobilizar 1 a 10% do fósforo total encontrado no solo em formas lábeis em sua biomassa, atuando como importante componente dinâmico do ciclo do fósforo no solo (SCHIMIDT &

LASKOWSKI, 1961; RICHARDSON, 1994). Além disso, são essenciais em processos de mineralização e solubilização desse elemento (RICHARDSON, 2001). Vários mecanismos são utilizados por bactérias, actinomicetos e fungos do solo para solubilizar, dessorver e mineralizar formas não absorvíveis de fosfatos orgânicos ou inorgânicos, ou ainda para aumentar a absorção pelas plantas de formas prontamente disponíveis de fósforo, na solução do solo. Fungos micorrízicos, por exemplo, são capazes de promover um aumento da absorção de ânions fosfato através da maior exploração do solo, atuando na absorção do elemento em regiões fora do alcance das raízes. Eles também possuem maior afinidade que a raiz para absorção de íons fosfato, bem como um eficiente mecanismo de armazenamento e transferência de fósforo para a planta (BOLAN, 1991; SHIBATA & YANO, 2003).

Também, através da produção de fitormônios, micro-organismos podem promover um maior desenvolvimento de raízes laterais e pelos radiculares, facilitando a absorção de fósforo pela raiz (ADAMS & PATE, 2002). Formas orgânicas de fósforo podem ser mineralizadas em formas inorgânicas por ação das enzimas fosfatases produzidas por fungos e bactérias (NAHAS, 2002; YAN et al., 2014).

Além disso, micro-organismos podem solubilizar formas adsorvidas ou precipitadas de fosfato inorgânico, tornando-as disponíveis para as plantas. O processo de solubilização ocorre principalmente pela liberação de ácidos orgânicos, o que é facilmente visto pela queda no pH do ambiente. Também pode ocorrer devido a liberação de íons hidrogênio, açúcares e substâncias quelantes, como sideróforos (BEHERA et al., 2014), conforme exemplifica a Figura 2, e em casos ainda mais específicos pela produção de ácidos inorgânicos (BHATTI & YAWAR, 2010).

Figura 2. Representação dos principais mecanismos de solubilização, desorção e mineralização do fósforo no solo mediados por micro-organismos rizosféricos.



Fonte: Richardson (2001).

Os ácidos orgânicos são produzidos pelos micro-organismos como produto de diferentes pontos da respiração anaeróbica, ou ciclo de Krebs, e podem incluir o ácido cítrico, láctico, málico, succínico, butírico, fumárico, glutâmico e outros (SCERVINO et al., 2010). Também, a própria respiração microbiana pode ser responsável pela produção do ácido carbônico, a partir do dióxido de carbono liberado que reage com H^+ no ambiente. Trata-se de um ácido fraco, mas que pode também influenciar na solubilização do fosfato inorgânico (JURIANK et al., 1986).

Os ácidos orgânicos podem atuar das seguintes maneiras na solubilização do fósforo: (1) de forma direta, pela simples acidificação do ambiente e queda de pH, o que ocorre no caso de fosfato de cálcio precipitado, onde H^+ atua em substituição ao Ca^{2+} (acidificação); (2) competindo pelos sítios de adsorção do fósforo nas partículas do solo, no caso do fósforo adsorvido às argilas e óxidos de ferro e alumínio (reações de permuta ou troca de ligantes) e (3) as frações aniônicas dos ácidos podem atuar como agentes quelantes de íons de ferro, alumínio e cálcio, complexados ao fósforo precipitado (quelação) (HAYNES, 1990; ILLMER &

SCHINNER, 1992; ILLMER & SCHINNER, 1995 NAHAS, 1996; HAMDALI et al., 2008; BEHERA et al., 2014).

A eficiência da solubilização depende da quantidade de ácidos liberada e principalmente do tipo de ácido produzido (SCERVINO et al., 2010). A preferência pela adsorção é controlada pela carga e estrutura dessas moléculas, sendo que ácidos com maior número de grupos OH e COOH são mais eficientes na competição por sítios de adsorção, possuindo também maior poder de quelação e maior capacidade de liberação de prótons (HUE, 1991; NOVAIS & SMITH, 1999).

Embora a liberação de ácidos orgânicos seja o principal mecanismo citado na literatura, não pode ser considerado como exclusivo. A solubilização também pode ocorrer pela liberação de prótons H^+ , que resulta do balanço iônico na célula devido a absorção de cátions, como NH_4^+ (JURIANK et al., 1986; ASEA et al.; 1988; PARKS et al., 1990; ILLMER & SCHINNER, 1995). Outros mecanismos que não envolvam liberação de íons H^+ e ácidos também podem ocorrer, caracterizados pela ausência de queda no pH do ambiente. Compostos quelantes como sideróforos, por exemplo, têm importante participação na solubilização do fosfato associados a alumínio e ferro (HAMDALI et al., 2008) e outras substâncias quelantes também podem atuar na solubilização do fosfato de cálcio (BEEVER & BURNS, 1980). Recentemente, trabalhos demonstraram que carboidratos excretados conhecidos como exopolissacarídeos microbianos podem ter efeito na solubilização de fósforo, algo que ainda é pouco conhecido (YI et al., 2008).

Alguns estudos têm sido feitos com respeito à capacidade de solubilização de fosfatos inorgânicos por leveduras em processos *in vitro* e discorrem sobre alguns dos possíveis mecanismos utilizados por elas no processo de solubilização. Narsian et al. (2010) avaliaram um total de 25 isolados de leveduras (10 obtidas de rizosfera, duas de solo não rizosférico e 13 de superfície de frutas), quanto a solubilização de fosfato tricálcico, em meio sólido Pikovskaya, e calcularam o Índice de Solubilização (IS). Todas as leveduras avaliadas, após dois dias de incubação, mostraram resultado positivo, com IS variando entre 1,10 e 1,50. Dentre as linhagens que apresentaram os índices mais altos estão algumas isoladas de rizosfera, identificadas como *Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula* sp, *Hansenula* sp e *Saccharomyces* sp.

Nutaratat et al. (2014) avaliaram leveduras isoladas de arroz e cana-de-açúcar quanto à capacidade de solubilização de fosfato tricálcico em meio sólido

Pikovskaya, obtendo, após cinco dias de incubação, resultado positivo para uma linhagem da levedura *Torulaspota globosa*.

Fu et al. (2016) isolaram leveduras da superfície de folhas e de amostras de rizosfera da planta *Drosera spatulata* Lab. obtendo 40 linhagens. Todas as linhagens foram testadas quanto à solubilização de diferentes formas de fosfato em meio sólido. Após cinco dias de incubação, FU et al. (2016) obtiveram 18 linhagens capazes de solubilizar fosfato dicálcico e 29 capazes de solubilizar fosfato de cálcio tribásico. Apenas duas linhagens, *Saccharomyces cerevisiae* e *Torulaspota* sp., foram capazes de solubilizar fosfato tricálcico em meio Pikovskaya.

Mundra et al. (2011) também isolaram micro-organismos de rizosfera e observaram que a levedura *Rhodotorula* sp. apresentou resultado positivo para solubilização de fosfato tricálcico em meio sólido. Em meio líquido, a levedura foi capaz de solubilizar até 27,83% do fósforo presente no meio, após cinco dias de incubação. Amprayn et al. (2012) estudaram a capacidade de solubilizar fosfato tricálcico de uma linhagem de levedura *Candida tropicalis* em meio Pikovskaya adicionado de 0,3% de fosfato tricálcico. Após 10 dias de experimento, a levedura foi capaz de solubilizar 119 mg de fósforo por litro de meio (19,83% do fósforo total contido no meio).

Xiao et al. (2008) também se dedicaram a estudos com o gênero *Candida*, e observaram que a espécie *Candida kissii*, isolada de solo de mina, foi capaz de solubilizar fosfato tricálcico presente em pó de rocha em experimentos *in vitro* com meio líquido NBRIP. Nesse estudo, foi observado que *C. kissii* teve desempenho superior na solubilização de fósforo *in vitro* (solubilizando 109,3 mg de fósforo por litro de meio) em comparação aos fungos filamentosos *Penicillium expansum* (104,5 mg/L) e *Mucor ramosissimus* (99,9 mg/ L), após 7 dias de incubação, a 32°C.

Xiao et al. (2013) testaram quatro leveduras isoladas de rizosferas identificadas como *Rhodotorula* sp., *Candida rugosa*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces rouxii*, quanto à capacidade de solubilização de fosfato insolúvel contido em pó de rocha, em meio líquido Pikovskaya. Xiao et al. (2013) observaram que, ao final de 7 dias, todas as leveduras foram capazes de solubilizar, e que em todos os ensaios o pH do meio diminuiu e a quantidade de ácidos orgânicos aumentou, incluindo os ácidos cítrico, glutâmico, málico, tartárico e láctico. Isso sugere que a solubilização pode ter ocorrido principalmente pela liberação de ácidos

orgânicos. *C. rugosa* foi a mais eficiente, solubilizando 14,3% do fósforo total, e a levedura que mais acidificou o meio, diminuindo o valor inicial de pH de 6,0 para 4,3.

Nos ensaios de solubilização por *C. kissi*, Xiao et al. (2008) observaram, através de análises de microscopia eletrônica de varredura, a ocorrência de cavidades nas partículas de pó de rocha, o que pode sugerir que o principal mecanismo de solubilização neste caso é direto, através da liberação de ácidos orgânicos e outros metabólitos. Entretanto, conforme colocado por Xiao et al. (2008) e Xiao et al. (2013), mais estudos seriam necessários para o entendimento desses mecanismos complexos de solubilização por leveduras e outros micro-organismos.

3.3.3 Interferência de fatores ambientais na biossolubilização *in vitro* de fósforo

Vários fatores ambientais podem interferir no processo de solubilização do fósforo. O estudo destes se torna importante na otimização do processo em laboratório ou no entendimento da eficiência de solubilização no próprio solo, com dependência relativa ao ambiente. Xiao et al. (2008) avaliaram alguns fatores na otimização da solubilização de fósforo em laboratório para três fungos. Foram testados diferentes níveis de pH inicial do meio de cultivo (5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0), temperatura de incubação (20, 23, 26, 32, 35 e 38°C) e agitação (80, 100, 120, 140, 160, 180 e 200 rpm), além de outras variáveis como concentração de pó de rocha no meio de cultivo, tamanho das partículas de pó de rocha, concentração de agentes quelantes e razão carbono/nitrogênio.

Xiao et al. (2008) observaram que a melhor temperatura para solubilização para os três fungos foi de 32°C, na qual *C. krissii* solubilizou 109,3 mg de fósforo por litro de meio de cultura (10,93%), seguida por *P. expansum*, e *M. ramosissimus*, que solubilizaram respectivamente 104,5 mg/L (10,45%) e 99,9 mg/L (9,99%). Para diferentes níveis de agitação, Xiao et al. (2008) conseguiram o máximo de fósforo solúvel em 160 rpm com 107,5 mg/L para *C. krissii*, 105,3 mg/L para *P. expansum* e 102,7 mg/L para *M. ramosissimus*.

O melhor pH inicial, conforme Xiao et al. (2008), foi diferente para os três micro-organismos estudados. Para *C. krissii* foi de 5,5 (107,5 mg/L), para *P. expansum* foi de 7,0 (105,8 mg/L) e para *M. ramosissimus* foi de 7,5 (103,4 mg/L). Todas as condições em que se obteve a maior taxa para solubilização de fosfato foram próximas às condições ótimas de crescimento do micro-organismo estudado.

Xiao et al. (2013) também realizaram testes com quatro leveduras rizosféricas, quanto a solubilização de fosfato insolúvel em pó de rocha, em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C) e diferentes níveis de pH inicial (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10) a 160 rpm, durante 7 dias. Foi observado que todos os isolados solubilizavam fósforo em temperaturas de 10 a 45°C, e as melhores temperaturas obtidas estavam entre 30 e 35°C. O intervalo de melhor pH encontrado foi entre 5 e 6, sendo que a solubilização caiu consideravelmente em condições alcalinas ou acima de 7,0.

Narsian et al. (2010) também estudaram a influência de diferentes temperaturas (28, 35, 40 e 45°C) e diferentes níveis de pH inicial do meio de cultura (3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9), bem como dois níveis de agitação (0 e 180 rpm), na solubilização de fosfato tricálcico. Foi observado que pH abaixo de 7,0 favorecia a solubilização enquanto a alcalinidade reduzia, sendo que no período de 15 dias, o melhor pH para solubilização foi 3,0. Narsian et al. (2010) também observaram que a solubilização diminuiu com o aumento da temperatura, obtendo maior valor de fosfato solubilizado na temperatura de 28°C, e que a ausência de agitação foi melhor do que agitação de 180 rpm, resultados muito divergentes ao obtido nos estudos de Xiao et al. (2008).

Mundra et al. (2011) testaram também diferentes níveis de temperatura (5, 10, 15, 20, 25, 28, 30, 35 e 40°C) e pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11) na solubilização de fosfato tricálcico pela levedura *Rhodotorula* sp. Foi observado que temperaturas de 28 e 30°C e pH de 7,0 promoviam significativamente uma maior solubilização. Também foi observado que ocorria maior solubilização de fósforo em condições que o crescimento de células era maior, e que o pH final se apresentava menor, devido a acidificação do meio.

Estes estudos de otimização mostram que as variações ambientais podem se apresentar bastante específicas para cada micro-organismo estudado. Também demonstraram que geralmente a eficiência do processo de solubilização está relacionada às condições de crescimento ótimas para o micro-organismo, em especial para os parâmetros pH e temperatura (XIAO et al., 2008). Entretanto, as melhores condições para a solubilização do fósforo nem sempre estão relacionadas com as condições ótimas de crescimento, o que pode ser visto no caso do parâmetro agitação.

A agitação geralmente tem influência direta no oxigênio que é fornecido ao meio de cultivo (KRÜGER et al., 2008). Assim, ela influencia tanto no crescimento quanto no metabolismo celular, estimulando a produção e liberação de diversas substâncias (CANGUSSU, 2003). Conforme Van-Dijken & Scheffers (1986), leveduras podem excretar uma série de metabólitos, como ácidos orgânicos, o que pode ocorrer em condição aeróbica ou anaeróbica.

Cangussu (2003) avaliou a produção de biomassa por uma levedura codificada como UFV-3 em três condições de aeração: anaerobiose, aerobiose e microaerobiose. Embora em todas as condições tenha ocorrido crescimento celular, foi observado que este crescimento foi bastante superior em condição de aerobiose, quando comparado a microaerobiose e anaerobiose. Cangussu (2003) também analisou a produção alguns de metabólitos orgânicos (ácido succínico, propiônico, láctico, etanol e glicerol) e, relacionando à produção de biomassa, e avaliou o balanço de carbono ocorrido. Ele verificou que em condições de microaerobiose, 96% do carbono, fornecido como glicose, foi usado para produção de metabólitos, enquanto que em aerobiose e anaerobiose, essa conversão foi de 76 e 88% respectivamente. Assim, foi observado que para essa levedura, as condições aeróbicas favorecem a produção de biomassa, porém não favorecem a produção de metabólitos.

Também foi observado que além da quantidade, o tipo de metabólito produzido depende das condições de oxigênio no meio. Cangussu (2003) verificou, por exemplo, uma maior quantidade de ácido láctico em condição de anaerobiose, mas uma maior produção de ácido succínico em condições de aerobiose (CANGUSSU, 2003). Assim, a aeração, estimulada pela agitação, pode ter grande influência na produção de ácidos orgânicos, inorgânicos e outros compostos que atuam na solubilização do fósforo. Entretanto esses os mecanismos e vias de produção desses metabolitos ainda não são bem compreendidos. Apesar dos trabalhos citados, o uso de leveduras na solubilização de fosfato ainda é recente e necessita de maior entendimento. Assim tornam-se necessários mais estudos para identificação de espécies capazes de solubilizar, compreensão dos mecanismos envolvidos e estudo de otimização do processo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolamento de leveduras rizosféricas de milho e cana-de-açúcar

As leveduras utilizadas no projeto foram isoladas de rizosfera de milho, durante o mês de março de 2015; e de rizosfera de cana-de-açúcar, durante o mês de agosto de 2015, de variedades cultivadas no Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos. O Centro de Ciências Agrárias pertence à cidade de Araras, SP, localizada na latitude 22°18'00"S e longitude 47°23'03" W (CCA, 2017). As variedades de milho e cana-de-açúcar foram cultivadas em latossolo vermelho distroférico típico (LIMA-FILHO, 2000; YOSHIDA & STOLF, 2016).

A obtenção de amostras de solo rizosférico foi feita conforme metodologias descritas por Azeredo et al. (1998) e Melo (1999). Foi removido solo ao redor das raízes até uma distância de aproximadamente 1 cm, obtendo de maneira asséptica amostras de solo e fragmentos de raízes, considerando esse conjunto como o ambiente rizosférico.

Foram pesados 10 gramas de solo rizosférico e adicionados a um erlenmeyer de 250 mL com 90 mL de solução salina (NaCl 0,85%). A solução foi colocada em mesa agitadora, da marca Quimis e modelo Q225-21, por 30 minutos, a 150 rpm, o que permite desalojar micro-organismos aderidos a superfície do solo ou raiz

(AZEREDO et al., 1998; MELO, 1999). Para garantir assepsia, os ensaios foram realizados utilizando câmeras de fluxo laminar vertical de marca Pachane, modelos PA 50 e PA 300.

O isolamento foi realizado em placas de Petri, pela técnica de plaqueamento em superfície (*spread plate*), utilizando diluição decimal seriada com solução salina (NaCl 0,85%). No isolamento, foram empregados os meios de cultura ágar YEPD (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose, 2% ágar, pH $5,6 \pm 0,2$), ágar YM (0,3% extrato de levedura, 0,3% extrato de malte, 0,5% peptona, 1% glicose, 2% ágar, pH $6,2 \pm 0,2$), BDA (0,4% amido de batata, 2% dextrose, 2% ágar, pH $5,6 \pm 0,2$) e ágar Sabouraud (4% dextrose, 0,5% peptona, 0,5% caseína, 2% ágar, pH $5,6 \pm 0,2$). Foi adicionado 0,01% de ácido nalidíxico em todos os meios de cultura para evitar o crescimento de bactérias. As placas foram incubadas a 25°C, durante três a cinco dias.

Todas as colônias obtidas foram visualizadas em microscópio óptico, da marca Olympus e modelo BX41, e analisadas quanto ao tamanho e morfologia para classificação destas como colônias de bactéria ou colônias de levedura. As leveduras obtidas foram isoladas e repicadas em meio de cultura ágar YEPD inclinado. Foram então mantidas em ambiente refrigerado, com temperatura entre 2 e 8°C, no banco de micro-organismos do laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular – LAMAM, para os posteriores testes de solubilização de fosfato tricálcico. As etapas de pesagem, diluição e plaqueamento foram realizadas no laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular – LAMAM, do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, campus de Araras, SP.

4.2 Seleção de linhagens com potencial de solubilização de fosfato tricálcico

As leveduras isoladas foram selecionadas quanto à capacidade de solubilização de fosfato através de um *screening* em meio de cultura sólido BDYA modificado (0,4% amido de batata, 2% dextrose, 0,05% extrato de levedura, 1,5% ágar, pH $5,6 \pm 0,2$) contendo fosfato tricálcico como fonte insolúvel de fósforo. Foi utilizada a técnica de semeadura por picada no meio sólido, realizada em triplicata, para cada colônia de levedura isolada (SPERBER, 1958).

O fosfato tricálcico foi adicionado ao meio de cultura na proporção de 0,89 g de fósforo por litro de meio. Para adição do fosfato, foi preparada uma solução de

K_2HPO_4 10% (50 mL/L) e uma solução de $CaCl_2$ 10% (100 mL/L), previamente esterilizadas por filtração em membrana de porosidade de 0,22 μm da marca Kasvi, de acordo com a metodologia proposta por Freitas et al. (1997) e Souchie et al. (2005). Foi adicionado ao meio 5 mL por litro do indicador de pH azul de bromotimol 0,5% diluído em uma solução de KOH 0,2 M, para facilitar a visualização do halo formado pelas leveduras (CHAGAS-JUNIOR et al., 2010; SILVA, 2012).

O fosfato tricálcico foi escolhido por ser um reagente praticamente insolúvel (solubilidade em água aproximada de 0,5 mg/L, a 25°C e 1 atm) (DOROZHKIN, 2011). Também, foi escolhido pela maior facilidade de aquisição comparado a outras formas de fosfato insolúveis; e por ser a forma utilizada na maioria dos trabalhos com solubilização de fosfato, facilitando assim a discussão dos resultados obtidos (XIAO et al., 2008; NARSIAN et al., 2010; MUNDRA et al., 2011; AMPRAYN et al., 2012; NUTARATAT et al., 2014; FU et al., 2016).

As placas foram incubadas por cinco dias, à temperatura de 25°C. Os isolados que apresentaram formação de um halo translúcido ao redor da colônia foram considerados capazes de solubilizar fosfato. Para os resultados positivos, foi calculado o Índice de Solubilização (IS), através da razão entre o diâmetro do halo de solubilização formado (ϕ Halo), e o diâmetro da colônia da levedura (ϕ Colônia) ($IS = \phi \text{ Halo (mm)}/\phi \text{ Colônia (mm)}$), medidos com auxílio de uma régua graduada (BERRAQUERO et al., 1976). As leveduras foram classificadas quanto como possuindo alta ($IS > 4$), média (IS entre 2 e 4) e baixa capacidade para solubilização ($IS < 2$) (PREMONO et al., 1996; HARA & OLIVEIRA, 2004).

A linhagem com melhor resultado foi identificada, em nível de espécie, utilizando técnica de microbiologia molecular. Para identificação, foi primeiramente realizada a extração de DNA da levedura. Após a extração do DNA, foi feita a amplificação da região D1/D2 do 26S rDNA através de PCR (Reação de Polimerização em Cadeia) (FU et al, 2016). Os amplicons foram seqüenciados e as seqüências obtidas comparadas com outras já conhecidas e disponíveis no banco de dados GenBank. Todos os procedimentos para identificação da levedura foram realizados no Laboratório de Microbiologia, do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, campus de Rio Claro, SP, sob supervisão do Prof. Dr. Fernando Pagnocca.

4.3 Solubilização de fósforo em meio líquido e avaliação de fatores

O isolado com melhor resultado na solubilização em meio sólido BDYA foi avaliado quanto à capacidade de solubilização de fosfato tricálcico em meio líquido NBRIP (1% glicose, 0,5% fosfato tricálcico, 0,5% cloreto de magnésio hidratado, 0,02% cloreto de potássio, 0,025% sulfato de magnésio hidratado, 0,01% sulfato de amônio) (NAUTIYAL, 1999; XIAO et al., 2008). Os ensaios foram realizados em erlenmeyer de 125 mL, com 50 mL de meio de cultura. Todos os tratamentos foram feitos em triplicata (n =3), em delineamento inteiramente casualizado, com tratamentos constituídos por: meio de cultura sem fosfato tricálcico e com levedura (- P, + L), meio de cultura com fosfato tricálcico e com levedura (+ P, + L) e meio de cultura com fosfato tricálcico e sem a levedura (+ P, - L); avaliados em três níveis de temperatura, três níveis de pH inicial e quatro níveis de agitação, totalizando assim 27 tratamentos, conforme exemplificado na Tabela 2.

Para preparo do inóculo, a levedura mantida em ágar YEPD inclinado foi repicada por estria de isolamento para placas de Petri contendo ágar YEPD. A placa foi incubada de três a cinco dias em 25°C. Após o crescimento na placa, o micro-organismo foi repicado para tubos falcon contendo 10 mL de caldo YEPD, com auxílio de uma alça de inoculação, e colocado em incubação em mesa agitadora a 25°C, sob agitação de 150 rpm, durante três dias.

Após esse período, o tubo falcon foi colocado em centrífuga da marca Eppendorf, sob agitação de 3600 rpm, por três minutos. Foi retirado o meio sobrenadante e a biomassa decantada foi suspensa em solução salina estéril (NaCl 0,85%). A concentração de células na suspensão foi padronizada em por contagem de células totais em câmara de Neubauer, conforme a metodologia de Dias & Schwan (2010). Para os tratamentos com a presença da levedura, a solução padronizada de células foi inoculada, em cada erlenmeyer, de modo a conter uma concentração final de 2×10^5 células por mL de meio de cultura (XIAO et al., 2008).

Tabela 2. Delineamento experimental em meio líquido NBRIP.

Tratamentos	Fosfato tricálcico	Suspensão de 1×10^7 células	Fator avaliado
Otimização de temperatura			Temperatura (°C)
1	-	+	20
2	+	+	20
3	+	-	20
4	-	+	25
5	+	+	25
6	+	-	25
7	-	+	30
8	+	+	30
9	+	-	30
Otimização do pH inicial			pH inicial
10	-	+	3
11	+	+	3
12	+	-	3
13	-	+	5
14	+	+	5
15	+	-	5
Otimização da agitação			Agitação (rpm)
16	-	+	0
17	+	+	0
18	+	-	0
19	-	+	100
20	+	+	100
21	+	-	100
22	-	+	150
23	+	+	150
24	+	-	150
25	-	+	200
26	+	+	200
27	+	-	200

(+) presente, (-) ausente. Fonte: próprio autor.

Primeiramente, foram realizados ensaios com três temperaturas (20°C, 25°C e 30°C), mantendo-se o pH inicial do meio em $7,0 \pm 0,2$ e a agitação em 150 rpm. Após a análise da melhor temperatura, foi feita avaliação de três níveis de pH inicial (3,0, 5,0 e 7,0), mantendo a melhor temperatura obtida no ensaio anterior e agitação de 150 rpm. Para realização destes ensaios, o pH do meio de cultura foi ajustado utilizando soluções de NaOH 1N e HCl 1N, sem tamponamento.

Posteriormente, foi feita avaliação de quatro níveis de agitação (0, 100, 150 e 200 rpm), mantendo a melhor temperatura e o melhor pH obtido nos testes anteriores (Tabela 2). Após a obtenção das melhores condições para solubilização de fósforo pela levedura (melhor temperatura, pH inicial e agitação), foi realizado um ensaio nesta condição, avaliando o processo de solubilização no decorrer do tempo, visando compreender parâmetros cinéticos do processo e possíveis mecanismos envolvidos na solubilização, como ocorrência de acidificação do meio de cultivo no decorrer do processo.

4.4 Variáveis de resposta no processo de solubilização de fósforo

As variáveis de resposta (variáveis dependentes) avaliadas em todos os ensaios foram o teor de fósforo solúvel, pH do meio e o número de células. As avaliações nos ensaios de otimização foram realizadas após cinco dias de incubação. Para determinação do fósforo solúvel foi empregada a metodologia de Strickland & Parson (1960), através do método colorimétrico do azul de molibdênio. Este método supõe que em solução ácida, o ortofosfato reage com o molibdato de amônio e o tartarato de antimônio e potássio formando um ácido heteropolar-ácido fosfomolibdico, que é reduzido pelo ácido ascórbico a um complexo azul intenso (EATON, 1995).

Desta forma, com a reação do fosfato solúvel e a alteração de cor da amostra é possível determinar a quantidade de fosfato solúvel através da leitura da amostra em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 880 nm. Para a leitura, foi utilizado espectrofotômetro da marca Thermo, modelo Biomate 3. O resultado obtido para absorvância foi comparado aos valores de uma curva padrão, confeccionada com concentrações conhecidas de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) (Apêndice 1) (Strickland & Parson, 1960).

Foram medidos os valores de absorvância antes da inoculação ($t=0$) e no final do experimento ($t= 5$ dias) e a quantidade de fósforo solubilizado foi dada pela diferença entre as concentrações de fósforo medidas nesses dois tempos. O valor do fósforo solúvel foi indicado como miligramas de fósforo por litro de meio de cultura. Também foi indicado em porcentagem, considerando a razão entre a massa de fósforo solubilizado pela massa total de fósforo adicionado ao meio de cultura

O pH do meio de cultivo foi determinado por pHmetro digital da marca MS Tecnopon, modelo mPA 210. O crescimento celular foi determinado com o emprego de câmara de Neubauer e espectrofotômetro da marca Thermo, modelo Biomate 3, com leitura em comprimento de onda de 660 nm. Para as amostras que continham fosfato tricálcico, foi feita uma diluição 1:1 (v/v) com HCl 1N para completa solubilização do fósforo antes da leitura do número de células no espectrofotômetro, conforme a metodologia utilizada por Mundra et al. (2011). Foi utilizado o programa computacional R CORE TEAM (2015) para realização dos cálculos estatísticos relativos à Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey, com 5% de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento de leveduras rizosféricas e seleção quanto à capacidade de solubilização de fosfato em meio sólido

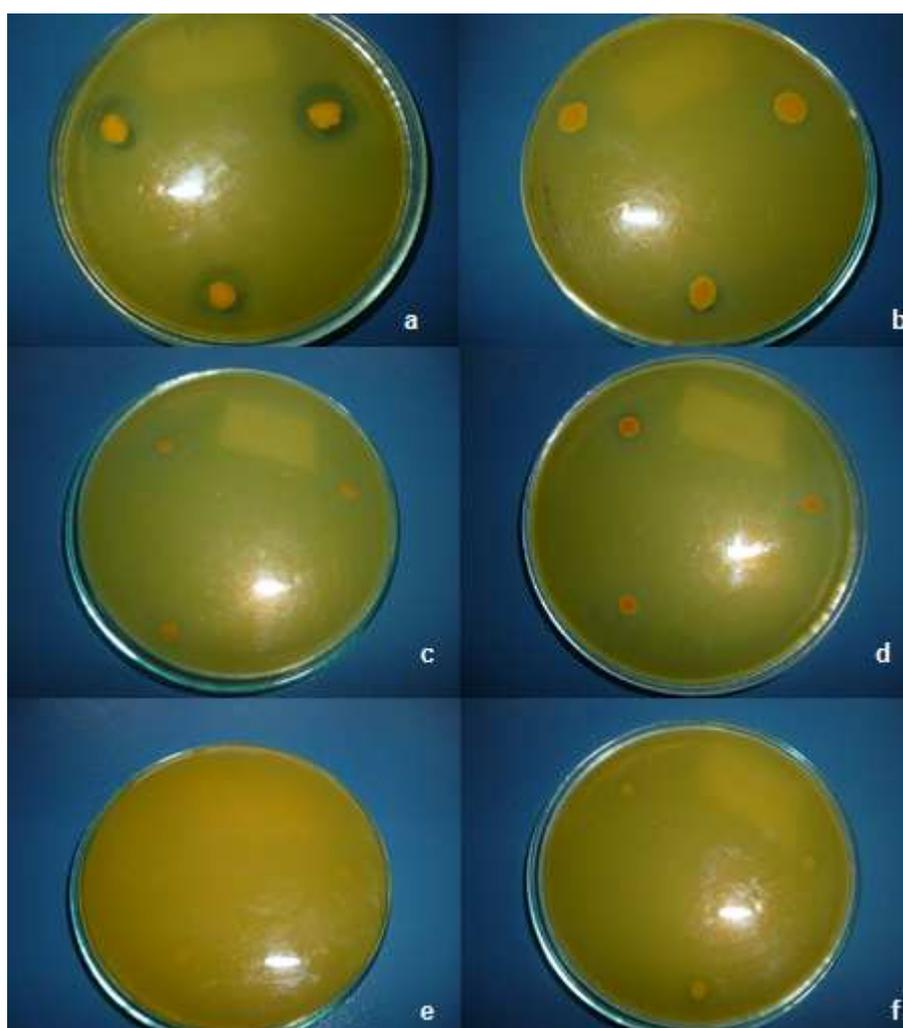
Foram obtidas duas linhagens de leveduras de rizosfera de milho e quatro de rizosfera de cana-de-açúcar, totalizando seis leveduras. O baixo número de isolados obtidos está em conformidade com alguns estudos que mostram que o número de leveduras presentes na rizosfera pode ser pequeno em comparação ao de outros micro-organismos rizosféricos, como fungos filamentosos e bactérias (EL-TARABILY e SIVASITHAMPARAM, 2006; ROSA-MAGRI et al., 2011). Também, estudos sugerem que a rizosfera talvez não seja o melhor ambiente para sobrevivência e multiplicação de leveduras, quando comparado a outras regiões da planta, o que pode ocorrer por fatores nutricionais e pela grande competição na colonização do espaço com outros micro-organismos (EL-TARABILY e SIVASITHAMPARAM, 2006; ROSA-MAGRI et al., 2011). Rosa-Magri et al. (2011), por exemplo, conseguiram isolar 78 leveduras do colmo de plantas de cana-de-açúcar e milho, 223 leveduras das folhas e apenas 16 da rizosfera.

O número de isolados pode também se apresentar baixo quando são obtidos de solos impactados pelo manejo e utilizados para culturas agrícolas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Nos estudos de Sláviková & Vadkertiová (2003), por exemplo, foi observado que havia cerca de 10 vezes menos leveduras em solos aráveis

comparado a solos de floresta. Porém é necessário um maior estudo das características do solo utilizado para concluir se, neste caso, estes fatores ambientais interferiram no baixo número de isolados.

As seis colônias obtidas foram avaliadas quanto à capacidade de solubilizar fosfato tricálcico em meio modificado BDYA. Todas as colônias cresceram no meio e foram capazes de solubilizar fosfato, o que foi demonstrado pela formação de um halo translúcido ao redor da colônia, conforme mostra a Figura 3. A partir deste, foi calculado o índice de solubilização (IS), e as leveduras foram classificadas de acordo com a capacidade de solubilização (Tabela 3).

Figura 3. Formação de halo translúcido ao redor da colônia, em meio BDYA modificado, pelas leveduras isoladas de rizosfera de milho 6S01 (a) e 6S02 (b); e de rizosfera de cana-de-açúcar 6S03 (c), 6S04 (d), 6S05 (e) e 6S06 (f).



Fonte: próprio autor.

Tabela 3. Solubilização de fosfato tricálcico em meio sólido modificado BDYA.

Colônia isolada	Fonte de isolamento	IS*	Capacidade de solubilização
6S01	Rizosfera de milho	2,47	Média
6S02	Rizosfera de milho	1,29	Baixa
6S03	Rizosfera de cana-de-açúcar	1,33	Baixa
6S04	Rizosfera de cana-de-açúcar	1,28	Baixa
6S05	Rizosfera de cana-de-açúcar	1,20	Baixa
6S06	Rizosfera de cana-de-açúcar	1,38	Baixa

(*) IS: Índice de solubilização. Fonte: próprio autor.

A levedura codificada como 6S01, isolada de rizosfera de milho, apresentou maior capacidade para solubilização em meio BDYA modificado, dentre todas as leveduras testadas (Tabela 3 e Figura 3). Assim, essa linhagem foi escolhida para ser utilizada nos ensaios de solubilização de fosfato tricálcico em meio de cultura líquido NBRIP.

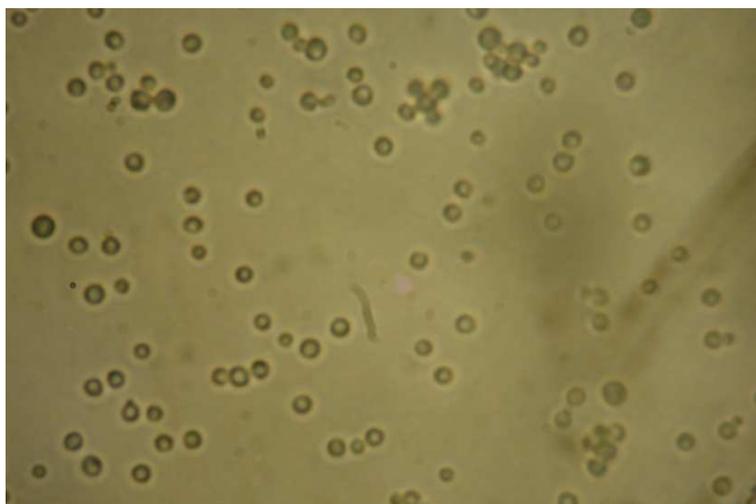
Foi realizado extração do DNA e amplificação do domínio D1/D2 da região 26S rDNA, do isolado 6S01. As sequências obtidas foram comparadas às sequências fornecidas no GenBank (NCBI, 2016), através do programa BLAST, conforme pode ser visto no Apêndice 2. A levedura foi identificada através dessas sequências com 100% de similaridade com a espécie *Torulaspota globosa* (Apêndice 2). A morfologia do isolado pode ser vista na Figura 4.

A levedura *Torulaspota globosa* 6S01, avaliada neste trabalho, também apresentou um índice de solubilização muito superior comparado aos índices de solubilização obtidos em outros trabalhos na literatura. Narsian et al. (2010), por exemplo, obteve como melhor resultado para solubilização de fosfato em meio sólido o índice de solubilização de 1,43, pela levedura avaliada *Saccharomyces* sp..

Fu et al. (2016) e Nutaratat et al. (2014) estudaram o gênero *Torulaspota* e observaram capacidade baixa de solubilização. Fu et al. (2016) observaram que em meio sólido Pikovskaya, a linhagem *Torulaspota* sp. JYC369 apresentou um índice de solubilização de 1,17, e Nutaratat et al. (2014) observaram que a linhagem *Torulaspota globosa* DMKU-RP105 apresentou índice de solubilização de 1,22.

Entretanto, é importante salientar que no estudo de Narsian et al. (2010) a incubação foi realizada por apenas 48 horas. Embora Nutaratat et al. (2014) e Fu et al. (2016) tenham usado tempo de incubação similar ao usado nesse trabalho (5 dias), as condições de temperatura e o meio de cultura utilizados foram diferentes dos utilizados neste estudo.

Figura 4. Células da levedura 6S01 visualizadas em lâmina em microscópio óptico, em zoom 40x.



Fonte: próprio autor.

5.2 Influência da temperatura de incubação na solubilização do fósforo

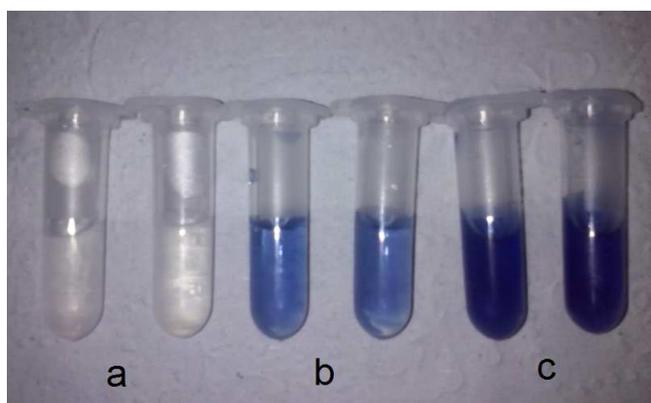
Os resultados obtidos, em meio líquido NBRIP, mostraram que a levedura *T. globosa* (6S01) possui significativa capacidade de solubilizar fosfato tricálcico (Figura 5 e Tabela 4). Nos ensaios em diferentes temperaturas de incubação, a levedura solubilizou até 29,86% do fósforo total contido no meio de cultura (Tabela 4). Os resultados foram semelhantes aos obtidos por Mundra et al (2011), que estudaram a levedura *Rhodotorula* sp. PS4, capaz de solubilizar valores entre 24 a 28% do fósforo contido no meio de cultura, em cinco dias de incubação. Outras leveduras estudadas apresentaram taxas inferiores de solubilização, de 10,93% e 14,3%, conforme os trabalhos de Xiao et al. (2008) e Xiao et al. (2013), respectivamente.

Tabela 4. Concentração de fósforo solúvel (mg/L) e taxa de solubilização, obtidos após 5 dias de incubação, em diferentes temperaturas.

Tratamento	Condição	Temp.	Média + desvio padrão	Taxa de solubilização
T5	Fosfato + levedura	25°C	298,611 ± 9,810 a	29,86% a
T8	Fosfato + levedura	20°C	276,250 ± 20,289 a	27,62% a
T2	Fosfato + levedura	30°C	267,222 ± 33,402 a	26,72% a
T6	Fosfato	25°C	4,792 ± 0,625 b	0,47% b
T1	Levedura	30°C	0 b	0 b
T4	Levedura	25°C	0 b	0 b
T7	Levedura	20°C	0 b	0 b
T9	Fosfato	20°C	0 b	0 b
T3	Fosfato	30°C	0 b	0 b

Fonte: próprio autor.

Figura 5. Quantificação de fósforo solúvel pela metodologia de Strickland & Parson (1960): (a) ensaio com levedura (b) ensaio com fosfato (c) ensaio com levedura + fosfato. Quanto mais escura a amostra, maior a concentração de fósforo solúvel.



Fonte: próprio autor.

Não foi encontrada diferença significativa na solubilização de fósforo avaliando os três diferentes níveis de temperatura (20°C, 25°C e 30°C) (Tabela 4). Assim, dentro da faixa de temperatura considerada, não houve variação significativa no processo de solubilização. Resultados diferentes, porém, foram encontrados nos trabalhos de Xiao et al. (2008), Narsian et al. (2010) e Mundra et al. (2011).

Conforme Xiao et al. (2008), a levedura *Candida krissi* solubilizou, em experimento *in vitro*, aproximadamente, 8% do fosfato total quando incubada a uma temperatura de 20°C; e 11% quando incubada a 30°C, mostrando que essa variação de 10°C de temperatura influenciou significativamente o processo. A levedura testada por Narsian et al. (2010), da espécie *Debaryomyces hansenii*, apresentou variação significativa na solubilização de fosfato em intervalos também pequenos de temperatura, sendo que a 28°C o processo foi significativamente superior que a 35°C. Mundra et al. (2011) observaram que nas temperaturas de 20, 25 e 30°C, a solubilização de fósforo pela levedura *Rhodotorula* sp. apresentou-se significativamente diferente, aumentando conforme o aumento da temperatura neste intervalo.

Ao contrário dos resultados de Xiao et al. (2013) para a espécie *Candida krissi*, anteriormente descritos, outras quatro espécies de levedura testadas por ele (*Rhodotorula* sp, *Candida rugosa*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces rouxii*), não apresentaram diferença significativa na solubilização de fosfato quando incubadas em diferentes temperaturas (20, 25 e 30°C). A levedura testada neste trabalho, bem como as leveduras estudadas por Xiao et al. (2013), podem, desta forma, apresentar vantagem industrial ou agrícola, visto que o processo de solubilização ocorre numa ampla faixa de temperatura, sem apresentar variação significativa dos resultados.

A variável pH final do meio também não apresentou diferença com a variação de temperatura, conforme descrito na Tabela 5. Foi possível observar grande variação do pH do meio nos tratamentos com a presença da levedura, de até três unidades no pH. Esta significativa queda pode sugerir que a levedura seja capaz de produzir e liberar ácidos orgânicos, conforme foi observado nos trabalhos descritos por Xiao et al. (2008) e Xiao et al. (2013). Os resultados também podem sugerir que a levedura seja capaz de liberar ácidos inorgânicos ou íons hidrogênio, fatores que também promovem a solubilização do fosfato. Entretanto, mais estudos são necessários para caracterização dos compostos extracelulares liberados no meio.

Os estudos com solubilização da literatura mostram uma queda acentuada no pH, que varia até três unidades, nos ensaios com a presença de fosfato e da levedura em meio de cultura (XIAO et al., 2008; XIAO et al. 2012). Assim, a queda no pH nos ensaios com a presença da levedura e do fosfato neste trabalho foi menor do que a esperada, com variações de até uma unidade (Tabela 5).

Tabela 5. Média obtida para valor de pH final nos ensaios com diferentes temperaturas.

Tratamento	Condição	Temperatura	pH final (Média + desvio padrão)
T9	Fosfato	30°C	7,40 ± 0,0608 a
T6	Fosfato	25°C	7,33 ± 0,1626 a
T3	Fosfato	20°C	7,27 ± 0,0839 ab
T8	Fosfato + levedura	30°C	6,34 ± 0,0693 bc
T5	Fosfato + levedura	25°C	6,22 ± 0,1328 c
T2	Fosfato + levedura	20°C	6,07 ± 0,9303 c
T7	Levedura	30°C	4,07 ± 0,3551 d
T4	Levedura	25°C	3,98 ± 0,0586 d
T1	Levedura	20°C	3,76 ± 0,0709 d

Fonte: próprio autor.

A baixa queda no pH pode ter ocorrido pela formação de compostos, a medida que o fósforo e o cálcio eram solubilizados, que atuavam na alcalinidade do meio. Durante a preparação do meio de cultura, foi observado que a presença de fosfato tricálcico causava uma dificuldade no ajuste do pH com solução ácida de HCl 1N (resultados não publicados). Assim, o fosfato tricálcico mostrou ação alcalinizante no meio, o que pode explicar a baixa queda no pH em alguns ensaios.

Pode ser ainda que o pH tenha se apresentado mais alto, no final dos cinco dias, devido a lise e morte celular, um dos fatores que atuam na alcalinidade do meio conforme Illmer & Schinner (1992). Ou ainda isso pode ter ocorrido pelo consumo dos ácidos orgânicos produzidos como fonte de carbono pelo micro-organismo, conforme observado no experimento de Rodriguez et al. (2000).

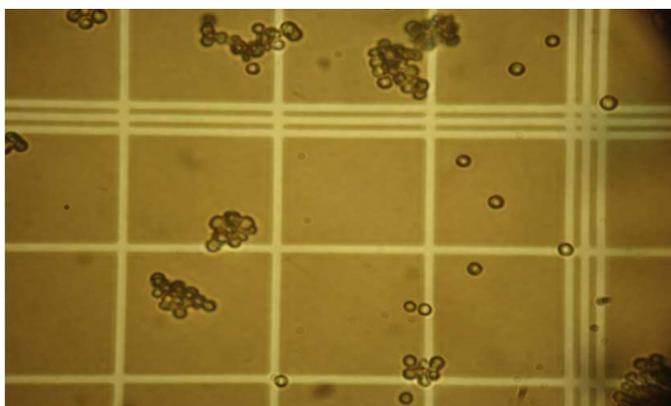
O experimento realizado por Illmer & Schinner (1992) com solubilização de fosfato de cálcio por *Pseudomonas* sp. e *Penicillium* sp. mostrou que grandes variações no pH podem ocorrer durante o ensaio de solubilização. Eles observaram que, para ambos micro-organismos, o pH inicial do meio caiu de 7,0 para valores próximos a 5,0 nos primeiros quatro dias de experimento, que pode ter sido causado pela produção de prótons e ácidos orgânicos. Entretanto, a partir do 4º dia, ocorreu um aumento constante do pH atingindo valores de 6,0 a 7,0. Apesar da alcalinidade,

o teor de fósforo solúvel continuou aumentando, atingido o maior valor aos oito dias para *Penicillium* sp e aos 13 dias para *Pseudomonas* sp. Essas flutuações podem ocorrer devido a morte celular e liberação do fósforo antes imobilizado na célula, e também pela formação de compostos organo-fosforados e posterior liberação, a medida que os micro-organismos necessitam de fonte de carbono e nutrientes, processos que podem ocorrer sem a mudança de pH. Assim, não necessariamente uma queda maior de pH pode indicar o momento de maior concentração de fósforo solúvel no meio (ILLMER & SCHINNER, 1992).

Outra causa da pouca variação no pH pode estar relacionada a mecanismos de solubilização que não envolvem a produção de ácidos orgânicos e prótons. Mecanismos como a produção de exopolissacarídeos (YI et al., 2008) e também a produção de agentes quelantes de íons Ca^{2+} , que atuam na formação de cristais de oxalato de cálcio na parede celular dos micro-organismos, podem estar envolvidos em processos de solubilização de fosfato de cálcio por fungos (BEEVER & BURNS, 1980). Seriam necessários mais estudos para analisar a possível ocorrência desses mecanismos, que não foram realizadas nesse trabalho.

Não foi possível realizar a contagem do número de células totais do meio de cultivo, em câmara de Neubauer, após cinco dias de incubação. Isso ocorreu porque nos ensaios com presença do fosfato tricálcico da levedura foi observada a ocorrência de floculação das células, impedindo a contagem, conforme ilustrado na Figura 6.

Figura 6. Floculação nas células de *T. globosa* (6S01), visualizadas em câmara de Neubauer. Foto obtida em microscópio óptico, com aumento de 400x.



Fonte: próprio autor.

A absorvância de células (660 nm) foi realizada e pode ser usada para diferenciar o crescimento celular nas condições testadas, mas não reflete total exatidão, visto que as células apresentavam floculação, o que pode influenciar a leitura em espectrofotômetro. Assim, não foi possível a conversão dos valores de absorvância para concentração de células no meio, sendo mantidos os valores de absorvância (660 nm) (Tabela 6). A absorvância de células, obtida em comprimento de 660 nm, mostrou que o crescimento foi significativamente superior nos ensaios com presença de fosfato e da levedura, em comparação aos ensaios sem fósforo e com levedura, conforme pode ser visto na Tabela 6. Esse resultado já era esperado, visto que os micro-organismos necessitam de fósforo como nutriente para o seu metabolismo.

Foi observado ainda que a temperatura de 25°C favoreceu o crescimento da levedura em comparação à temperatura de 20°C (Tabela 6) embora esse maior crescimento não tenha afetado significativamente a solubilização de fosfato tricálcico (Tabela 4). Visto que a levedura *T. globosa* (6S01) apresentou maior crescimento na temperatura de 25°C, essa temperatura foi mantida para os ensaios com diferentes níveis de pH inicial e diferentes níveis de agitação.

Tabela 6. Média obtida para valor de absorvância (660 nm) nos ensaios com diferentes temperaturas.

Tratamento	Condição	Temperatura	Absorvância (Média + desvio padrão)
T5	Fosfato + levedura	25°C	2,2753 ± 0,3404 a
T2	Fosfato + levedura	30°C	1,8813 ± 0,2122 ab
T8	Fosfato + levedura	20°C	1,6220 ± 0,0381 b
T1	Levedura	30°C	0,1737 ± 0,0234 c
T4	Levedura	25°C	0,1663 ± 0,0262 c
T7	Levedura	20°C	0,1273 ± 0,0210 c
T3	Fosfato	30°C	0 c
T6	Fosfato	25°C	0 c
T9	Fosfato	20°C	0 c

Fonte: próprio autor.

5.3 Influência de diferentes níveis de pH na solubilização do fósforo

Não foi encontrada diferença significativa na solubilização de fósforo para os ensaios com diferentes valores de pH inicial do meio (3,0; 5,0 e 7,0), conforme pode ser visto na Tabela 7. O resultado encontrado neste trabalho foi diferente dos registrados na literatura, que apresentaram diferença significativa na solubilização do fosfato tricálcico por leveduras em diferentes valores de pH inicial do meio de cultura (XIAO et al., 2008; NARSIAN et al. 2010; MUNDRA et al., 2011; XIAO et al, 2013).

Tabela 7. Concentração de fósforo solúvel (mg/L) e taxa de solubilização, obtidos após 5 dias de incubação, em diferentes valores de pH inicial do meio.

Tratamento	Condição	pH inicial	Média + desvio padrão	Taxa de solubilização
T2	Fosfato + levedura	3	305,694 ± 0,915 a	30,57% a
T8	Fosfato + levedura	7	298,611 ± 9,810 a	29,86% a
T5	Fosfato + levedura	5	296,111 ± 30,997 a	29,61% a
T3	Fosfato	3	6,249 ± 1,667 b	0,62% b
T9	Fosfato	7	4,792 ± 0,625 b	0,48% b
T6	Fosfato	5	0 b	0 b
T1	Levedura	3	0 b	0 b
T4	Levedura	5	0 b	0 b
T7	Levedura	7	0 b	0 b

Fonte: próprio autor.

Xiao et al. (2013) observaram que a variação do pH inicial de 5,0 para 3,0 causou diferença significativa na solubilização de fósforo pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces rouxii*, *Candida rugosa* e *Rhodotorula* sp. A levedura *Saccharomyces rouxii* foi capaz de solubilizar cerca de 6,5% do fosfato total em meio de cultura com pH inicial 3,0, enquanto que em pH 5,0, solubilizou cerca de 14,3%. A variação do pH inicial de 5,0 para 7,0 também proporcionou diferença na solubilização de fosfato para *Saccharomyces rouxii* e *Saccharomyces cerevisiae*, sendo que em pH 7,0 houve grande diminuição do fósforo solúvel.

Mundra et al (2011) observaram que em pH inicial 3,0, a levedura *Rhodotorula* sp solubilizou 24,3% do fósforo total no meio, enquanto que em pH 5,0 solubilizava 27,17%, valores significativamente diferentes. Narsian et al. (2010) também observaram diferença significativa para os níveis de pH inicial de 3,0; 5,0 e 7,0 na solubilização de fosfato por *Debaryomyces hansenii*, obtendo melhor resultado para o pH mais baixo.

Assim, a levedura *T. globosa* (6S01) foi a única, dentre as citadas na literatura, que não apresentou variação na solubilização de fosfato para os três valores de pH inicial do meio, o que a torna interessante para aplicações industriais e agrícolas, visto que atua, sem variações significativas, numa ampla faixa de pH.

Para a variável resposta pH final do meio, medido após cinco dias de incubação, houve um comportamento similar ao ocorrido nos ensaios com diferentes níveis de temperatura. Novamente, foi observado uma queda de até três unidades nos valores de pH nos ensaios sem fosfato e com a presença da levedura, o que sugere que ela seja capaz de acidificar o meio (Tabela 8). Entretanto, nos ensaios que continham fosfato tricálcico, o pH final foi maior, provavelmente em função dos mecanismos citados no item 5.2, como a lise e morte celular, consumo de ácidos orgânicos ou formação de compostos que atuam na alcalinidade do meio.

Tabela 8. Média obtida para valor de pH final nos ensaios com diferentes níveis de pH inicial.

Tratamento	Condição	pH inicial	pH final (Média + desvio padrão)
T9	Fosfato	7	7,33 ± 0,1626 a
T6	Fosfato	5	7,27 ± 0,0058 a
T3	Fosfato	3	7,09 ± 0,0950 a
T2	Fosfato + levedura	5	6,39 ± 0,1300 b
T5	Fosfato + levedura	3	6,26 ± 0,0153 b
T8	Fosfato + levedura	7	6,22 ± 0,1328 b
T7	Levedura	7	3,98 ± 0,0586 c
T4	Levedura	5	3,57 ± 0,1562 c
T1	Levedura	3	2,82 ± 0,0907 d

Fonte: próprio autor.

Para avaliação da variável resposta crescimento celular, valores de absorvância (660 nm) revelaram que o melhor pH inicial para crescimento da levedura é de 7,0, conforme pode ser visto na Tabela 9. Entretanto, o maior crescimento não afetou significativamente a solubilização do fosfato tricálcico (Tabela 7). Visto que houve maior crescimento da levedura *T. globosa* (6S01) em pH inicial 7, esse valor de pH inicial foi mantido, assim como a temperatura de 25°C, para os ensaios com diferentes velocidades de agitação.

Tabela 9. Média obtida para valor de absorvância (660 nm) nos ensaios com diferentes níveis de pH inicial.

Tratamento	Condição	pH inicial	Absorvância (Média + desvio padrão)
T8	Fosfato + levedura	7	2,2753 ± 0,3404 a
T5	Fosfato + levedura	5	1,7150 ± 0,0050 b
T2	Fosfato + levedura	3	1,5173 ± 0,1154 b
T1	Levedura	3	0,3410 ± 0,0079 c
T4	Levedura	5	0,2657 ± 0,0197 c
T7	Levedura	7	0,1663 ± 0,0262 c
T3	Fosfato	3	0 c
T6	Fosfato	5	0 c
T9	Fosfato	7	0 c

Fonte: próprio autor.

5.4 Influência da velocidade de agitação na solubilização do fósforo

A análise de fósforo solúvel demonstrou que não existem diferenças significativas para os níveis de agitação testados (0, 100, 150 e 200 rpm), conforme a Tabela 10. Este resultado difere do encontrado por Narsian et al. (2010) e Xiao et al. (2008). Narsian et al. (2010) observaram que a ausência de agitação aumenta até duas vezes a solubilização de fósforo pela levedura *Debaryomyces hansenii* em comparação a agitação de 180 rpm. Em contrapartida, Xiao et al. (2008) observaram que para a levedura *Candida krissii*, a melhor agitação é de 160 rpm, sendo que agitação de 100 e 200 rpm prejudicam significativamente o processo de solubilização.

Tabela 10. Concentração de fósforo solúvel (mg/L) e taxa de solubilização, obtidos após 5 dias de incubação, em diferentes velocidades de agitação.

Tratamento	Condição	Agitação (RPM)	Média + desvio padrão	Porcentagem
T2	Fosfato + levedura	0	348,750 ± 25,874 a	34,87% a
T5	Fosfato + levedura	100	347,222 ± 7,821 a	34,72% a
T11	Fosfato + levedura	200	301,972 ± 38,659 a	30,19% a
T8	Fosfato + levedura	150	298,611 ± 9,810 a	29,86% a
T6	Fosfato	100	19,375 ± 6,042 b	1,94% b
T12	Fosfato	200	7,917 ± 0,833 b	0,79% b
T9	Fosfato	0	5,625 ± 0,751 b	0,56% b
T3	Fosfato	150	4,792 ± 0,625 b	0,48% b
T10	Levedura	0	0 b	0 b
T1	Levedura	100	0 b	0 b
T4	Levedura	150	0 b	0 b
T7	Levedura	200	0 b	0 b

Fonte: próprio autor.

O pH final avaliado nos ensaios apresentou um padrão bastante parecido com o obtido nos testes com variação de temperatura. Ocorreu uma pequena queda do pH nos ensaios com a presença do fosfato e presença da levedura, e grande queda nos ensaios com a presença apenas da levedura, ambas com diferença significativa em relação aos ensaios sem a presença da levedura (Tabela 11).

Nos ensaios com a presença da levedura e do fosfato, houve maior queda do pH nos níveis de agitação de 100 e 200 rpm do que na ausência de agitação (Tabela 11), porém isso não interferiu no processo de solubilização do fosfato (Tabela 10). Pode-se assim concluir que a acidificação não seja o único fator que influencia a solubilização neste caso, como discutido anteriormente.

A absorvância de células, medida no comprimento de onda de 660 nm, revelou que a agitação de 150 rpm é a melhor para o crescimento celular, embora isso não tenha afetado o processo de solubilização, conforme pode ser visto na Tabela 12. Isso está em conformidade com o experimento realizado por Cangussu (2003) que observou que uma maior aeração pode aumentar a multiplicação celular, porém isso não significa uma maior produção de metabólitos como ácidos orgânicos, que neste caso podem influenciar a solubilização do fósforo.

Tabela 11. Média obtida para valor de pH final nos ensaios com diferentes níveis agitação.

Tratamento	Condição	Agitação (RPM)	pH final (Média + desvio padrão)
T9	Fosfato	200	7,40 ± 0,0400 a
T3	Fosfato	100	7,36 ± 0,0580 a
T6	Fosfato	150	7,33 ± 0,1626 a
T12	Fosfato	0	7,29 ± 0,1626 a
T11	Fosfato + levedura	0	6,47 ± 0,1473 b
T5	Fosfato + levedura	150	6,22 ± 0,1328 bc
T8	Fosfato + levedura	200	6,13 ± 0,4157 c
T2	Fosfato + levedura	100	6,00 ± 0,1159 c
T4	Levedura	150	3,98 ± 0,0586 d
T10	Levedura	0	3,83 ± 0,0586 de
T7	Levedura	200	3,64 ± 0,0416 ef
T1	Levedura	100	3,43 ± 0,1058 f

Fonte: próprio autor.

Tabela 12. Média obtida para valor de absorvância (660 nm) nos ensaios com diferentes níveis agitação.

Tratamento	Condição	Agitação (RPM)	Absorvância (Média + desvio padrão)
T5	Fosfato + levedura	150	2,2753 ± 0,3404 a
T2	Fosfato + levedura	100	1,7150 ± 0,0830 b
T8	Fosfato + levedura	200	1,5033 ± 0,1155 bc
T11	Fosfato + levedura	0	1,2927 ± 0,1424 c
T4	Levedura	150	0,1663 ± 0,0093 d
T10	Levedura	0	0,1640 ± 0,0071 d
T1	Levedura	100	0,1163 ± 0,0093 d
T7	Levedura	200	0,1110 ± 0,0020 d
T12	Fosfato	0	0 d
T3	Fosfato	100	0 d
T6	Fosfato	150	0 d
T9	Fosfato	200	0 d

Fonte: próprio autor.

Os resultados obtidos mostraram que a levedura *T. globosa* (6S01) possui atuação eficiente numa ampla faixa de velocidade de agitação, outro fator que a torna interessante para aplicações industriais e agrícolas. O fato da levedura utilizada neste trabalho, bem como a estudada por Narsian et al. (2010), serem capazes de solubilizar de forma eficiente fósforo em condição sem agitação as torna ainda mais interessante. Esse fato pode ser usado como vantagem na aplicação do micro-organismo no solo, em especial em ambiente compactado, com baixa concentração de oxigênio. Além disso, pode ser considerado que em aplicações industriais, como na produção de biofertilizantes, pois a não obrigatoriedade na aeração da cultura possibilita maior economia em energia e infraestrutura.

5.5 Parâmetros cinéticos do processo *in vitro* de solubilização de fósforo

Para avaliação de parâmetros cinéticos do processo de solubilização, o experimento foi realizado considerando as condições pré-determinadas pelos testes anteriores (ausência de agitação, temperatura de 25°C e pH inicial de 7,0). Foram realizadas avaliações da quantidade de fósforo solúvel (mg/L), pH do meio de cultivo e absorbância de células (660 nm) em intervalos de 24 horas, em um total de 168 horas. Em apenas 24 horas, a levedura 6S01 foi capaz de solubilizar 356,528 mg/L (35,65%) do fósforo contido no meio, atingindo o valor máximo liberado, após 48 horas de incubação, de 419,861 mg/L (41,99%) (Tabela 13).

No estudo de Xiao et al. (2013), as leveduras *Rhodotorula* sp., *Candida rugosa*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces rouxii* foram capazes de solubilizar valores aproximados de 3% do fósforo total em 24 horas de cultivo. Valores entre 4 e 6% foram conseguidos em três dias de incubação (72 horas) e apenas com cinco dias de incubação (120 horas) foi possível alcançar valores de fósforo solubilizado entre 9% a 12% do fósforo total. Assim, a levedura avaliada neste trabalho apresentou maior porcentagem de solubilização, em menor tempo do que as linhagens avaliadas por Xiao et al. (2013).

Para a variável pH final do meio de cultivo, observou-se a ocorrência de uma queda de aproximadamente uma unidade no intervalo entre 0 e 24 horas (Tabela 14). Neste intervalo, também ocorreu maior solubilização de fósforo, o que pode estar relacionado à produção de ácidos e prótons pela levedura (Figura 7). Após 72 horas (3 dias) de incubação, o pH do meio começou a subir, assim como descrito no

experimento de Illmer & Schinner (1992), com um aumento constante do pH, atingindo valores entre 6,0 e 7,0 no período de 96 horas. Conforme citado anteriormente, a alcalinidade pode ter sido induzida pela lise e morte celular, formação de compostos ou ainda pelo consumo de ácidos orgânicos no meio (ILLMER & SCHINNER, 1992; RODRIGUEZ et al., 2000).

Tabela 13. Concentração de fósforo solúvel (mg/L) e taxa de solubilização obtidos nos ensaios analisados em intervalos de 24 horas.

Tratamento	Condição	Tempo (horas)	Média + desvio padrão	Porcentagem
T0	Fosfato + levedura	0	0 b	0 b
T1	Fosfato + levedura	24	356,528 ± 18,325 a	35,65% a
T2	Fosfato + levedura	48	419,861 ± 11,534 a	41,99% a
T3	Fosfato + levedura	72	350,972 ± 30,317 a	35,10% a
T4	Fosfato + levedura	96	356,528 ± 38,271 a	35,65% a
T5	Fosfato + levedura	120	348,750 ± 25,874 a	34,87% a
T6	Fosfato + levedura	144	351,389 ± 37,296 a	35,14% a
T7	Fosfato + levedura	168	394,861 ± 36,463 a	39,49% a

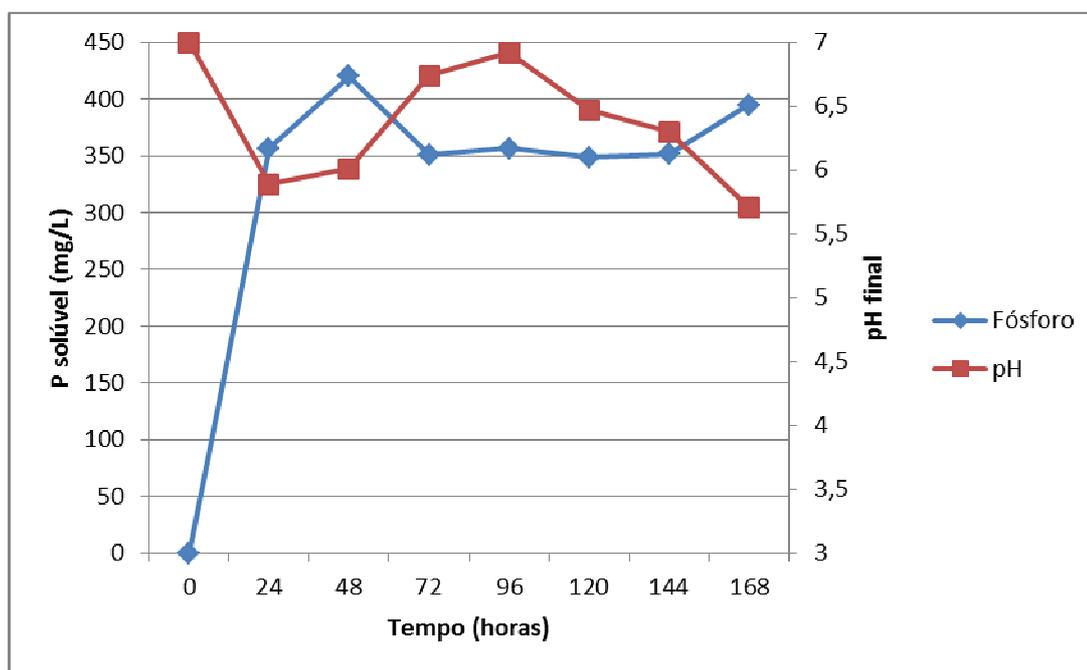
Fonte: próprio autor.

Tabela 14. Média obtida para valor de pH final nos ensaios analisados em intervalos de 24 horas.

Tratamento	Condição	Tempo (horas)	pH (média + desvio padrão)
T0	Fosfato + levedura	0	7,00 ± 0,2933 a
T1	Fosfato + levedura	24	5,89 ± 0,0416 de
T2	Fosfato + levedura	48	6,01 ± 0,0208 d
T3	Fosfato + levedura	72	6,74 ± 0,0529 b
T4	Fosfato + levedura	96	6,92 ± 0,0305 ab
T5	Fosfato + levedura	120	6,47 ± 0,1473 c
T6	Fosfato + levedura	144	6,30 ± 0,0954 c
T7	Fosfato + levedura	168	5,71 ± 0,0781 e

Fonte: próprio autor.

Figura 7. Liberação de fósforo solúvel (mg/L) e variação do pH final em intervalos de 24 horas.



Fonte: próprio autor.

A absorvância de células (660 nm) mostrou que a fase log de *T. globosa* (6S01) se estendeu até o período de 72 horas (3 dias). A partir do período de 72 horas, foram alcançados valores constantes de crescimento o que indica uma fase estacionária (Tabela 15 e Figura 8). Foi possível observar que o período de maior solubilização de fosfato ocorreu no início da fase log (Figura 8), coincidindo com o período de maior acidificação do meio (Figura 7).

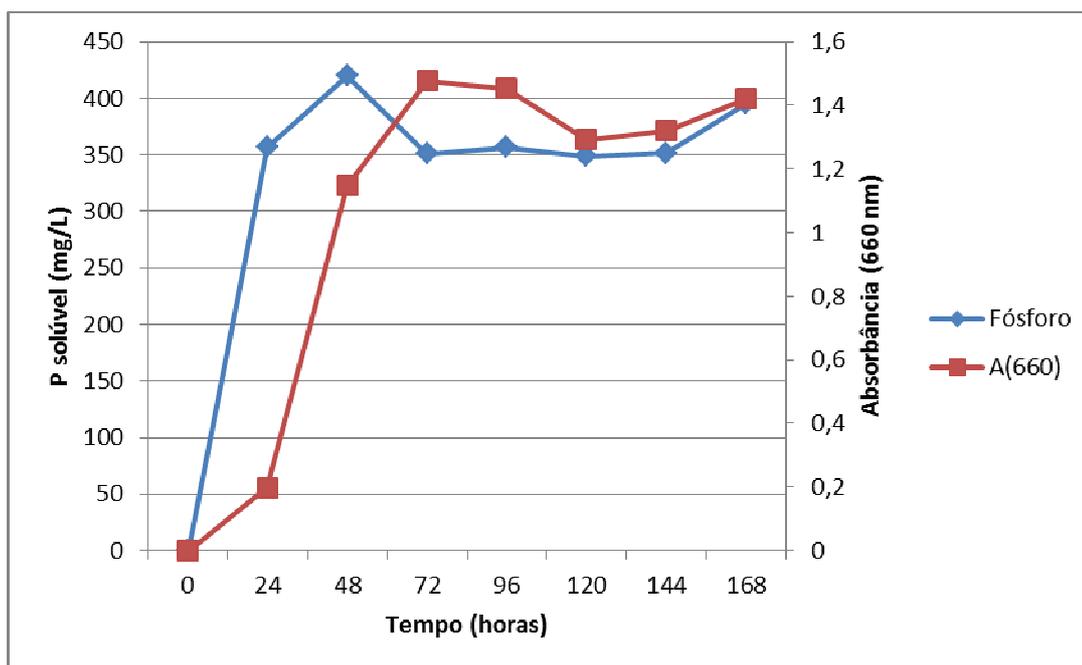
Em conformidade, Chociai et al. (2002) observaram uma diminuição do pH na fase log em seus estudos com a levedura *Phaffia rhodozyma*. Chociai et al. (2002) estudaram a cinética da produção do carotenoide astaxantina por *P. rhodozyma*, cultivada em caldo de cana diluído, e observaram que no início da fase exponencial o pH apresentava queda de aproximadamente uma unidade, voltando a aumentar no final desta fase, em 24 horas de incubação. Conforme os estudos de Johnson & An (1991), a queda no pH na fase log da levedura *P. rhodozyma* pode ocorrer pela liberação de ácidos orgânicos intermediários do ácido cítrico e outros metabólitos produzidos.

Tabela 15. Média obtida para valor de absorvância (660 nm) nos ensaios analisados em intervalos de 24 horas.

Tratamento	Condição	Tempo (horas)	Absorvância (média + desvio padrão)
T1	Fosfato + levedura	24	0,197 ± 0,0130 c
T2	Fosfato + levedura	48	1,148 ± 0,1567 b
T3	Fosfato + levedura	72	1,477 ± 0,0639 a
T4	Fosfato + levedura	96	1,453 ± 0,0580 a
T5	Fosfato + levedura	120	1,293 ± 0,1424 ab
T6	Fosfato + levedura	144	1,321 ± 0,0533 ab
T7	Fosfato + levedura	168	1,421 ± 0,0273 a

Fonte: próprio autor.

Figura 8. Liberação de fósforo solúvel (mg/L) e absorvância de células (660 nm) em intervalos de 24 horas.



Fonte: próprio autor.

Assim, é possível que durante a fase log de *T. globosa* (6S01) tenha ocorrido maior produção de ácidos e outros metabólitos, o que conseqüentemente induziu a queda no pH e maior solubilização de fósforo neste período. Porém, mais estudos são necessários para identificar e quantificar a produção de metabólitos.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foram obtidos seis isolados de leveduras rizosféricas, dois de rizosfera de milho e quatro de rizosfera de cana-de-açúcar. O baixo número de isolados está de acordo com alguns trabalhos na literatura que mostram um número pequeno de leveduras presentes em rizosfera, em comparação a outras regiões da planta e a outros micro-organismos presentes nesta região.

O ensaio com meio sólido BDYA mostrou que todos os isolados eram capazes de solubilizar fosfato tricálcico, sendo que cinco isolados apresentaram baixa capacidade para solubilização, enquanto um dos isolados, codificado como 6S01, e identificado como da espécie *Torulaspota globosa*, apresentou capacidade média de solubilização.

T. globosa foi avaliada quanto a sua capacidade de solubilização de fosfato tricálcico em meio líquido NBRIP, e foi capaz de solubilizar valores entre 26% e 42% do fósforo total do meio, taxa superior às de outras leveduras encontradas na literatura.

Os ensaios com diferentes condições mostraram que não existe diferença significativa na solubilização de fósforo para diferentes níveis de temperatura (20°C, 25°C e 30°C), pH inicial (3, 5 e 7) e agitação (0, 100, 150 e 200 rpm) testados, embora esses fatores tenham afetado significativamente o crescimento do micro-organismo. Ensaio realizado, com amostragens a cada 24 horas, mostrou que a

levedura foi capaz de atingir o pico de solubilização após 48 horas de incubação (41,99%).

A rapidez e baixa influência dos fatores ambientais no processo de solubilização tornam essa linhagem interessante para aplicações industriais e agrícolas.

As análises de absorvância de células (660 nm) mostraram que a eficiência na solubilização do fósforo não está diretamente relacionado ao maior crescimento celular. As análises de pH, por sua vez, sugerem que a eficiência da solubilização está relacionada a acidificação do meio, o que pode sugerir que entre os mecanismos de solubilização pela levedura 6S01 estão incluídos a produção de ácidos orgânicos, inorgânicos ou prótons, em conformidade com o que está relatado na literatura. Mais estudos são necessários para identificar os ácidos ou outras substâncias que possam atuar como agentes da solubilização.

7 LITERATURA CITADA

ADAMS, M. A.; PATE, J. S. Phosphorus sources and availability modify growth and distribution of root clusters and nodules of native Australian legumes. **Plant, Cell & Environment**, v. 26, p. 837-850. 2002.

AE, N.; OTANI, T.; ARIHARA, J. Effects of specific compounds exuded from roots on phosphorus nutrition. In: JOHANSEN, C.; LEE, K. K.; SHARMA, K. K.; SUBBARAO, G. V.; KUENEMAN, E. A. **Genetic manipulation of crop plants to enhance integrated nutrient management in cropping system: 1. Phosphorus**. Patancheru, India: ICRISAT, 1995. p. 117-128.

AGNIHOTRI, V. P. Solubilization of insoluble phosphates by some soil fungi isolated from nursery seedbeds. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 16, n. 9, p 877-880. 1970.

AMPRAYN, K.; ROSE, M. T.; KECSKÉSA, M.; PEREGB, L.; NGUYEND, H. T.; KENNEDY, I. R. Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growth. **Applied soil Ecology**, v. 61, p. 295-299. 2012.

ASEA, P. E. A.; KUCEY, R. M. N.; STEWART, J. W. B. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 20, n. 4, p.459-464. 1988.

AZEREDO, L. A. I.; GOMES, E. A. T.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de Janeiro, Brasil. **International Microbiology**, v. 1, p. 205-208, 1998.

BAB'EVA, P.; CHERNOV, Y. U. Geographical aspects of yeast ecology. **Physiology and General Biology Reviews**, v. 9, p. 1-54. 1995.

BEEVER, R. E.; BURNS, D. J. W. Phosphorus uptake, storage and utilization by fungi. **Advances in Botanical Research**, v. 8, p. 127-129. 1980.

BEHERA, B. C.; SINGDEYSACHAN, S. K.; MISHRA, R. R.; DUTTA, S. K.; THATOI, H. N. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove – A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 2 p. 97-110. 2014.

BENDING, G. D.; TURNER, M. K.; JONES, J. E. Interaction between crop residues and soil organic matter quality and the functional diversity of soil microbial communities, **Soil Biology & Biochemistry**, V. 34, P. 1073 - 1082. 2002.

BERRAQUERO, F.R.; BAYA, A.M.; CORMENZANA, A. R.. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, v.17, n.4, p. 399-406, 1976.

BHATTI, T. M.; YAWAR, W. Bacterial solubilization of phosphorus from phosphate rock containing sulfur-mud. **Hydrometallurgy**, v. 103, p.54-59. 2010.

BOBY, V. U.; BALAKRISHNA, A. N.; BAGYARAJ, D. J. Interaction between *Glomus mosseae* and soil yeasts on growth and nutrition of cowpea. **Microbiological research**, v. 163, n. 6, p. 693-700. 2008.

BOLAN, N. S. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. **Plant and Soil**, v. 134, p. 189-207. 1991.

BOTHA, A. The importance and ecology of yeasts in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 43, p. 1-8. 2011.

BOUWAN, A. F.; BEUSENM A. H. W.; BILLEN, G. Human alteration of the global nitrogen and phosphorus soil balances for the period 1970--2050. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 23, GB0A4. 2009.

BRADY, N. C.; WEIL, R. R. **The nature and properties of soil**. 11 edição. New Jersey: Prentice Hall, 1996. 740 p.

BRANCO, S. M. MURGEL, P. H. CAVINATTO, V. M. Compostagem: solubilização biológica de rocha fosfática na produção de fertilizante organomineral. **Engenharia sanitária**, v. 6, n. 3, p. 115-121. 2001.

CANGUSSU, A. S. R. **Cinética de crescimento e metabolismo de levedura potencialmente probiótica**. 2003. 45 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2003.

CCA. Centro de Ciências Agrárias. **Dados climatológicos**. Disponível em: <http://www.cca.ufscar.br/servicos/dados-climatologicos/> Acesso em: 19 Maio 2017.

CHAGAS-JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N.; WILLERDING, A. L. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum. Agronomy**. Maringá, v. 32, n. 2, p. 359-366, 2010.

CHOCIAI, M. B.; MACHADO, I. M. P.; FONTANA, J. D.; CHOCIAI, J. G.; BUSATO, S. B.; BONFIM, T. M. B. Cultivo da levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) em processo descontínuo alimentado para produção de astaxantina. **Revista brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 457-462. 2002.

CURL, E. A.; TRUELOVE, B. **The rhizosphere**. New York: Springer-Verlag, 1986. 288 p.

DECAENS, T.; LAVELLE, P. JAEN, J. J. J.; ESCOBAR, G.; RIPPSTEIN, G. Impact of land management on soil macrofauna in the Oriental Llanos of Colombia. **European Journal of Soil Biology**, v. 30, n. 4, p.157-168. 1994.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Isolamento e identificação de leveduras. In: MOREIRA, F. M.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D. E. **Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade**. Lavras: UFLA, 2010. p. 227-277.

DO-CARMO, L. S. Distribution of yeasts in nature. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (Eds.) **The Yeasts, Biology of Yeast, firsted**. Vol 1. London: Academic Press, 1969. P. 79-105.

DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphates. Occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic applications. **Biomatter**, v. 1, p. 121 – 164. 2011.

EATON, A. D., CLESCERI, L. S. & GREENBERG, A. E. Standard methods for the examination of water and wastewater. **American Public Health Association**, p.106-114. 1995.

EL-TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. **Mycoscience** , v. 47, p.25–35, 2006.

EREL, R.; DAG, Q.; BEN-GAL, A.; SCHWARTZ, A.; YERMIYAHU, U. Flowering and Fruit Set of Olive Trees in Response to Nitrogen, Phosphorus, and Potassium. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 133, n. 5, p. 639-647. 2008.

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

FU, S. F.; SUN, P. F.; LU, H. Y.; WEI, J. Y.; XIAO, H. S.; FANG, W. T.; CHENG, B. Y.; CHOU, J. Y. Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from the phyllosphere and rhizosphere of *Drosera spatulata* Lab. **Fungal biology**, v.120, p. 433-448. 2016.

GIRVAN, M. S.; CAMPBELL, C. D.; KILLHAM, K.; PROSSER, J. I.; GLOVER, L. A. Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. **Environmental microbiology**, v. 7, n. 3, p. 301-313. 2005.

GLICK, B. R.; LIU, C.; GHOSH, S.; DUMBROFF, E. B. Early development of canola seedlings in the presence of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 1233-1239. 1997.

GOEDERT, W. J.; SOUSA, D. M. G.; LOBATO, E. **Fósforo**. In: GOEDERT, W. J. (Ed.) Solos dos cerrados: tecnologias e estratégias de manejo. São Paulo: NOBEL, 1986. P.129- 163.

GRAY, T. R. G.; WILLIAMS, S. T. **Soil microorganisms**. 2 edição. Londres: Longman, 1975. 240 p.

HALDER, A. K.; MISHRA, A. K.; BHATTACHARYYA, P.; CHAKRABARTTY, P. K. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 36, n.2, p. 81-92. 1990.

HAMDALI, H.; BOUIZGARNE, B.; HAFIDID, M.; LEBRIHI, A. VIROLLE, M. J.; OUHDOUCH, Y. Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. **Applied Soil Ecology**, v. 38, n. 1, p. 12-19. 2008.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazonica**, v.34, n.3, p. 343-357. 2004.

HAYNES, R. J. Active ion uptake and maintenance of cation-anion balance: a critical examination of their role in regulating rhizosphere pH. **Plant and Soil**, v. 126, p. 247 – 264. 1990.

HINSINGER, P. Bioavailability of soil inorganic P in the rizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. **Plant and Soil**, v. 237, p. 173-195, 2001.

HUE, N.V. Effects of organic acids/anions on P sorption and phytoavailability in soils with different mineralogies. **Soil Science**, v.152, n.6, p.463-471, 1991.

ILLMER, P.; SCHINNER, F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 24, n. 4, p. 389-395. 1992.

ILLMER, P.; SCHINNER, F. Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, n. 3., p. 257 - 263. 1995.

JAYAPRAKASHVEL, M.; RAJAN, A.; HUSSAIN, A. J. Bioprospecting of halotolerant bacteria from the rhizosphere of a halophyte for the production of industrial enzymes. **International Journal of Pure & Applied Bioscience**, v.3, n.4, p. 193 – 201. 2015.

JOHNSON, E. A.; AN, G. H. Astaxanthin from microbial source. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 11, p.297-326. 1991.

JURIANK, J. J.; DUDLEY, L. M.; ALLEN, M.; KNIGHT, W. G. The role of calcium oxalate in the availability of phosphorus in soils of semiarid regions: thermodynamic study. **Soil Science**, v. 142, p. 225-261. 1986.

KLOEPPER, J. W.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M. N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. **Nature**, v. 286, p. 885-886. 1980.

KRÜGER, R.; KEMPKA, A. P.; OLIVEIRA, D.; VALDUGA, E.; CANSIAN, R. L.; TREICHEL, H.; LUCCIO, M. D. Desenvolvimento de uma bebida láctea probiótica utilizando como substrato soro de leite e extrato hidrossolúvel de soja. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 1, p.43-53. 2008.

KUCEY, R. M. N.; JANZEN, H.; LEGGET, M. E. Microbially mediated increase in plant-available phosphorus. **Advances in Agronomy**, v. 42, p. 199-228. 1989.

MELO, I. S. **Isolamento de Agentes de biocontrole da rizosfera**. In: MELO, I.S., AZEVEDO, J.L.(eds.) *Controle Biológico*. v.3, ed. Embrapa, p.15-55. 1999.

LIMA-FILHO, S. A. **Levantamento pedológico detalhado do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos**. Araras: Departamento de Recursos Naturais e Proteção Ambiental, UFSCAR. 17p. 2000. Boletim técnico.

MILTON, N. M.; EISWERTH, C. M.; AGER, U. S. Effect of Phosphorus Deficiency on Spectral Reflectance and Morphology of Soybean Plants. **Remote Sensing of Environment**, v. 36, p. 121 - 127. 1991.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. 2ª edição. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MUNDRA, S.; ARORA, R.; STODAN, T.; Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel temperature, pH, and salt-tolerance yeast, *Rhodotorula* sp. PS4, isolated from seabuckthorn rhizosphere, growing in cold deserts of Ladakh, India. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 2387-2396. 2011.

NAHAS, E. Factor determining rocks phosphates solubilization by microorganisms isolated from soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 567 – 572. 1996.

NAHAS, E. Microrganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. **Bragantia**, v. 61, n. 3, p. 267-275. 2002.

NAUTIYAL, C. S. Na efficient microbiological growth medium for screening phosphate-solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v.170, p. 265-270. 1999.

NARSIAN, V.; SAMAHA, A. A.; PATEL, H. H. Rock phosphate dissolution by specific yeast. **Indian Journal Microbiology**, v. 50, p. 57-62. 2010.

NCBI. NCBI BLAST. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>> Acesso em: 7 de Dez. 2016.

NÓBREGA, J. C. A.; LIMA, J. M.; CURI, N.; SIQUEIRA, J. O.; MOTTA, P. E. F. Fosfato e micorriza na estabilidade de agregados em amostras de latossolos cultivados e não-cultivados. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 36, n. 11, p. 1425-1435, 2001.

NOVAIS, R. F.; SMITH, T. J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 399 p. 1999.

NUTARATAT, P.; SRISUK, N.; ARUNRATTIYAKORN, P.; LIMTONG, S. Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand. **Fungal Biology**, v. 118, n.8, p. 683-694. 2014.

PAPAVIZAS G. C.; DAVEY, C. B. Extent and Nature of the rhizosphere of Lupinus. **Plant and Soil**, v. 14, p.215-236. 1961.

PARFITT, R. L. Anion adsorption by soils and soil materials. **Advances in Agronomy**, v. 30, p. 1-50. 1978.

PARKS, E. J.; OLSON, G. J.; BRICKMAN, F. E.; BALDI, F. Characterization of high performance liquid chromatography (HPLC) of the solubilization of phosphorus in iron one by a fungus. **Indian Journal of Microbiology**, v. 5, p. 183-190. 1990.

PHAFF, H. J.; STARMER, W. T. Yeasts associated with plants, insects and soil. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (eds) **The Yeasts associated, Biology of yeasts, seconded**. Vol. 1. London: Academic Press, 1987. p. 123-180.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>. 2015.

RAGHOTHAMA, K. G. Phosphate transport and signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v.3, p.182–187. 2000.

RAIJ, B. V. Fósforo. In: RAIJI, B. V. **Fertilidade do solo e manejo de nutrientes**. Piracicaba: International Plant Nutrition Institute, 2011. P. 217 – 248.

RAPPEL, E.; LOIOLA, E. Estudo da competitividade da indústria brasileira: competitividade da indústria de fertilizantes. 1993. Disponível em: <<http://www.leffa.pro.br/textos/abnt.htm#5.16.4>> Acesso em: 6 de Jun. 2016.

PREMONO, A. E.; MOAWAD, A. M.; VLEK, P. L. G. Effect of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. **Indonesian Journal of Crop Science**, v. 11, p. 13-23. 1996.

RICHARDSON, A. E. Soil microorganisms and phosphorus availability. In: PANKHURST, C. E.; DOUBE, B. M.; GUPTA, V. V. S. R.; GRACE, P. R. (Ed.) **Soil biota management in sustainable farming systems**. Melbourne: CSIRO, 1994. p. 50-62.

RICHARDSON, A. E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 897-906. 2001.

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; SELMAN, G. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. **Journal of Biotechnology**, v. 84, n.2, p. 155-161. 2000.

ROSA, M. M.; TAUKE-TORNISIELO, S. M.; RAMPAZZO, P. E.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Evaluation of the biological control by yeast *Torulaspora globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n.8, p.1491-1502. 2010.

ROSA-MAGRI, M. M.; TAUKE-TORNISIELO, S. M.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Bioprospection of yeasts as biocontrol agents against phytopathogenic molds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n.1, p.1-5. 2011.

RYCHTER, A. M. The effect of phosphate deficiency on mitochondria activity and adenylate levels in bean roots. **Physiologia Plantarum**, v. 84, p. 80-86. 1992.

SALAM, J. A.; LAKSHMI, V.; DAS, D.; DA, N. Biodegradation of lindane using a novel strain, *Rhodotorula* sp. VITJzNO3 isolated from agricultural soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 475 – 487. 2013.

SCERVINO, J. M.; MESA, M. P.; MÔNICA, I. D.; RECCHI, M.; MORENO, N. S.; GODEAS, A. Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. **Biology and Fertility of Soils**, v. 46, 755-763. 2010.

SCHMIDT, G.; LASKOWSKI, M. Phosphate ester cleavage (survey). In: BOYER, P. D.; LARDY, H.; MYRBAC, K. (Ed.) **The enzymes**. 2 ed. New York: Academic Press, 1961. P. 3-35.

SHIBATA, R.; YANO, K. Phosphorus acquisition from non-labile sources in peanut and pigeonpea with mycorrhizal interaction. **Applied Soil Ecology**, v. 24, p.133-141. 2003.

SILVA, N. **Identificação de bactérias solubilizadoras de fosfato e análise do seu efeito sobre o desenvolvimento de plantas de *Arabidopsis thaliana***. 2012. 55 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de plantas) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ. 2012.

SINGH, P.; TSUJI, M.; SINGH, S. M.; ROY, U.; HOSHINO, T. Taxonomic characterization adaptation strategies and biotechnological potential of cryophilic yeast from ice cores of Midre Lovénbreen glacier, Svalbard, Arctic. **Cryobiology**, v. 66, n. 2, p. 167-175. 2013.

SIQUEIRA, F. M. S.; MOREIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. 2 edição. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

SLÁVIKOVÁ, E.; VADKERTIOVÁ, R. The diversity of yeasts in the agricultural soils. **Journal os Basic Microbiology**, v. 43, p. 430-436. 2003.

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; JÚNIOR, O. J. S.; SILVA, E. M. R. Solubilização de fosfato em meio sólido e líquido para bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1149-1152. 2005.

SPERBER, J. I. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 9, p. 778-781. 1958.

STRICKLAND, J. D.; PARSONS, T. R. A manual of seawater analysis. **Bulletin Fisheries Research Board of Canada**, v.125, p.1-185. 1960.

SWIFT, M. J.; BIGNELL, D.; MOREIRA, F. M.; HUISING, J. O inventário da atividade biológica do solo: conceitos e orientações gerais. In: MOREIRA, F. M.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D. E. **Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade**. Lavras: UFLA, 2010. p. 23-39.

TERRY, N.; ULRICH, A. Effects of Phosphorus Deficiency on the Photosynthesis and Respiration of Leaves of Sugar Beet. **Plant Physiological**, v. 51, n. 1, p. 43-37. 1973.

VAN-DIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeast. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p. 199-224. 1986.

VELHAL, C.; SANT, M.; GODBOLE, T.; WAGHMODE, S.; KULKARNI, C. Effect of *Rhizobium* Based Biofertilizer Combined with *Saccharomyces cerevisiae* on the growth of Hyacinth Bean. **International Journal of Plant & Soil Science**, v. 3, n. 8, p. 959 – 968. 2014.

VISHNIAC, H. S. A multivariate analysis of soil yeasts isolated from a latitudinal gradient. **Microbial Ecology**, v. 52, p. 90-103. 2006.

XIAO, C.; CHI, R. A.; HUANG, X. H.; ZHANG, W. X.; QIU, G. Z.; WANG, D. Z. Optimization for rock phosphate- solubilizing fungi isolated from phosphate mines. **Ecological engineering**, v. 33, p. 187-193. 2008.

XIAO, C.; CHI, R.; PAN, X.; LIU, F.; HE, J. Rock phosphate solubilization by four yeast strain. **Annals of microbiology**, v. 63, n. 1, p. 173-178. 2013.

XIN, G.; GLAWE, D.; DOTY, S. L. Characterization of three endophytic, indole-3-acetic acid producing yeasts occurring in *Populus trees*. **Mycological research**, v. 113, p. 973-980. 2009.

WAKER, G. M. Capítulo 1: Yeasts, In: SCHAECHTER, M. (ed) Eukaryotic Microbes. Califórnia: Elsevier, 2012. p. 3- 17.

YAN, M.; YU, L.; ZHANG, L.; GUO, Y.; DAI, K.; CHEN, Y. Phosphatase activity and culture conditions of the yeast *Candida mycoderma* sp. and analysis of organic phosphorus hydrolysis ability. **Journal of Environmental Science**, v. 26, n.11, p.2315-2321. 2014.

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

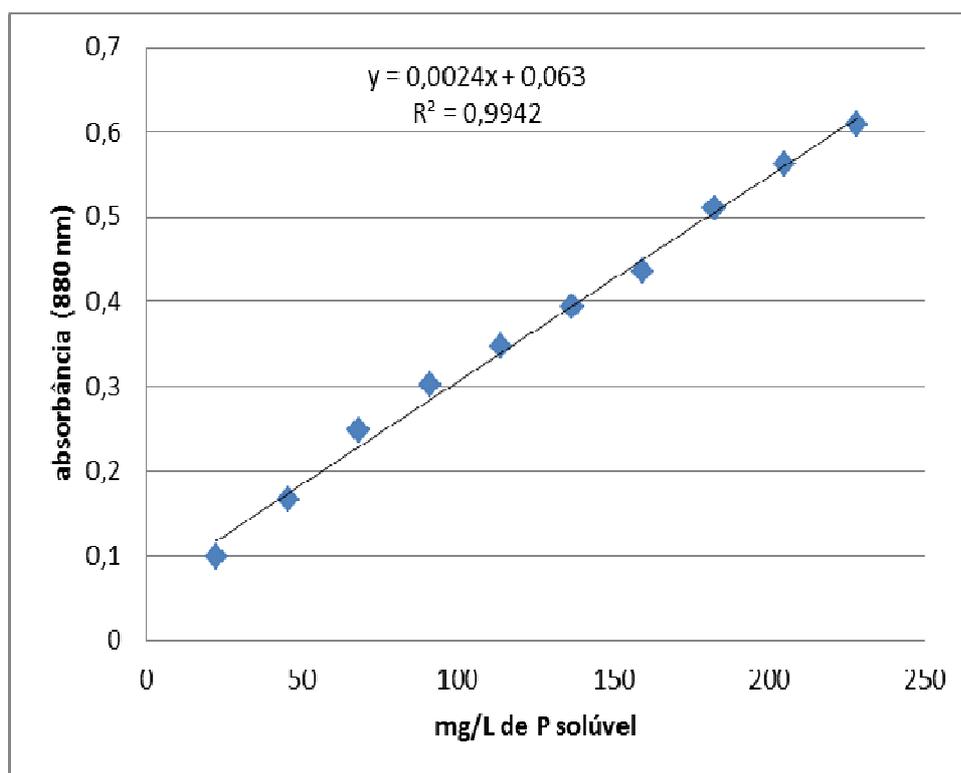
YOSHIDA, F. A.; STOLF, R. Mapeamento digital de atributos e classes de solos da UFSCar – Araras, SP. **Ciência, Tecnologia & Ambiente**, v. 3, n.1, p. 1-11. 2016.

YURKOV, A. M.; KEMLER, M.; BEGEROW, D. Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. **Fungal ecology**, v.5, p. 24-35. 2012.

APÊNDICE

Apêndice 1

Curva padrão para quantificação de fósforo solúvel. Correlação entre concentrações conhecidas de fósforo solúvel e medidas de absorvância em comprimento de onda de 880 nm.



Fonte: próprio autor.

Apêndice 2

Comparação da sequência genética obtida do isolado 6S01 e sequências fornecidas nos bancos do GenBank, através do programa BLAST

← → ↻ 🏠 https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_1102646294 🔍 ☆ 🌐 📄 ⋮

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Torulaspora globosa culture-collection CBS:5216 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1086	1086	100%	0.0	100%	KY109864.1
Torulaspora sp. APSS 805 genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, strain APSS 805	1086	1086	100%	0.0	100%	HE574639.1
Torulaspora indica culture-collection CBS:12408 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1081	1081	100%	0.0	99%	KY109871.1
Torulaspora globosa culture-collection CBS:2952 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1081	1081	100%	0.0	99%	KY109867.1
Torulaspora sp. AP 18 genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, strain AP 18	1081	1081	100%	0.0	99%	HE575669.1
Torulaspora sp. PBA 22 genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, strain PBA 22	1081	1081	100%	0.0	99%	HE575668.1
Torulaspora globosa culture-collection CBS:6637 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1075	1075	100%	0.0	99%	KY109869.1
Torulaspora globosa culture-collection CBS:6638 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1075	1075	100%	0.0	99%	KY109862.1
Torulaspora globosa culture-collection CBS:6636 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1074	1074	99%	0.0	99%	KY109861.1
Torulaspora globosa culture-collection CBS:5503 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1070	1070	100%	0.0	99%	KY109870.1
Torulaspora globosa culture-collection CBS:5500 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1070	1070	100%	0.0	99%	KY109866.1
Torulaspora globosa culture-collection CBS:764 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1070	1070	100%	0.0	99%	KY109865.1
Torulaspora globosa strain CBS 2947 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1070	1070	100%	0.0	99%	KF300888.1
Torulaspora globosa gene for 26S rRNA, partial sequence, strain: LY10	1059	1059	97%	0.0	100%	AB499015.1
Torulaspora sp. DMKU-SV01 gene for 26S rRNA, partial sequence, specimen voucher: DMKU/SV01	1053	1053	97%	0.0	99%	AB836684.1
Torulaspora globosa strain CBS 764 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1050	1050	98%	0.0	99%	KF300889.1
Torulaspora pretoriensis culture-collection CBS:11124 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1048	1048	100%	0.0	99%	KY109883.1
Torulaspora pretoriensis culture-collection CBS:11121 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1048	1048	100%	0.0	99%	KY109882.1
Torulaspora pretoriensis culture-collection CBS:11123 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1042	1042	100%	0.0	99%	KY109880.1
Torulaspora pretoriensis strain CBS 2187 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1042	1042	100%	0.0	99%	KF300887.1
Torulaspora globosa 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1042	1042	97%	0.0	99%	U72166.1
Torulaspora pretoriensis culture-collection CBS:11100 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1035	1035	100%	0.0	98%	KY109881.1

← → ↻ 🏠 https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_1102646294 🔍 ☆ 🌐 📄 ⋮

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Next](#) [Previous](#) [Descriptions](#)

Torulaspora globosa culture-collection CBS:5216 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: KY109864.1 Length: 914 Number of Matches: 1

Range 1: 15 to 602 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1086 bits(588)	0.0	588/588(100%)	0/588(0%)	Plus/Plus

Query 1 GGAGGAAAAAACCACCGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCA 60
Sbjct 15 GGAGGAAAAAACCACCGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCA 74

Query 61 AATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAAGGTAACCTTTGGGGC 120
Sbjct 75 AATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAAGGTAACCTTTGGGGC 134

Query 121 TGGTCTTGTCTATGTTCCCTTGGAAACAGGACGTCATAGAGGGTGAAGAAATCCCGTGTGGCG 180
Sbjct 135 TGGTCTTGTCTATGTTCCCTTGGAAACAGGACGTCATAGAGGGTGAAGAAATCCCGTGTGGCG 194

Query 181 AGGATCCAGTTCATATGTAAGTGCCTTTCGAAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCT 240
Sbjct 195 AGGATCCAGTTCATATGTAAGTGCCTTTCGAAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCT 254

Query 241 AAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGT 300
Sbjct 255 AAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGT 314

Query 301 ACAGTGATGGAAAGATGAAAAAAGACTTTTAAAAAGAGAGTGAAGAAAGTACGTGAAATGTTT 360
Sbjct 315 ACAGTGATGGAAAGATGAAAAAAGACTTTTAAAAAGAGAGTGAAGAAAGTACGTGAAATGTTT 374

Query 361 GAAAGGGAAGGGCATTGTATCAGACATGGTGTTTTGCGCCCTCTGCTCCTCGTGGGTGGG 420
Sbjct 375 GAAAGGGAAGGGCATTGTATCAGACATGGTGTTTTGCGCCCTCTGCTCCTCGTGGGTGGG 434

Query 421 GGAATCTCGCAGCTCACTGGGCCAGCATCAAGTTTGGCGGTAGGATAAATCTGCAGGAAT 480
Sbjct 435 GGAATCTCGCAGCTCACTGGGCCAGCATCAAGTTTGGCGGTAGGATAAATCTGCAGGAAT 494

Query 481 GTAGCTTGCCTCGGCAAGTGTATAGCCCTGTTGAAATCTGCCAGCCGGGACTGAGGACT 540
Sbjct 495 GTAGCTTGCCTCGGCAAGTGTATAGCCCTGTTGAAATCTGCCAGCCGGGACTGAGGACT 554

Query 541 GCGACTTTTGTCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCT 588
Sbjct 555 GCGACTTTTGTCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCT 602

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Next](#) [Previous](#) [Descriptions](#)

Torulaspora sp. APSS 805 genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, strain APSS 805

Fonte: próprio autor.