

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

MARILEY DE CÁSSIA DA FONSECA

Avaliação quantitativa e taxonômica de bactérias mobilizadoras de fósforo na
rizosfera do feijoeiro

Piracicaba, SP
2020

MARILEY DE CÁSSIA DA FONSECA

Avaliação quantitativa e taxonômica de bactérias mobilizadoras de fósforo na
rizosfera do feijoeiro

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Dissertação apresentada ao Centro de Energia
Nuclear na Agricultura da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no
Ambiente

Orientador: Prof^a. Dr^a. Siu Mui Tsai

Piracicaba

2020

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Fonseca, Mariley de Cassia da

Avaliação quantitativa e taxonômica de bactérias mobilizadoras de fósforo na rizosfera do feijoeiro / Mariley de Cássia da Fonseca; orientadora Siu Mui Tsai. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2020.

65 p. : il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, 2020.

1. Comunidade bacteriana 2. Ecologia microbiana 3. Fosfatase ácida 4. Fosfatase alcalina 5. Fósforo 6. Genes funcionais 7. Genética molecular 8. Mineralização 9. Solubilização I. Título.

Elaborada por:

Marília Ribeiro Garcia Henyei

CRB-8/3631

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos e amados pais Mário Marques da Fonseca (em memória) e Idnei Aparecida Silveira da Fonseca, por todo amor, dedicação, apoio e incentivo. Por serem meu exemplo de vida e por ajudarem a me tornar quem eu sou.

À minha querida e amada irmã Gisele Vitalina da Fonseca por todo o carinho, apoio e incentivo, me ajudando a seguir sempre em frente.

À minha amada avó Maria Silveira (em memória) e a tia Neusa Boraschi (em memória) que mostraram, acima do seu amor, a força que o ser humano tem para lutar.

Aos meus tios Sebastião dos Santos, Luzia dos Santos, Maraiza Silveira e Carlos Silveira por todo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela graça de ter mais uma etapa concluída.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Tsai Siu Mui, pelas oportunidades, apoio, ajuda e compreensão. Um grande exemplo de determinação e conquistas.

Em especial, aos meus amigos: Acacio Navarrete, Alexandre Pedrinho, Gian Watanabe, João Bossolani, Leandro Lemos, Luis Merloti e Natalia Carr que, além do apoio para a conclusão desta etapa, estiveram do meu lado muito além da pós-graduação.

Aos meus amigos e colegas: Aline França, Andressa Venturini, Danielle Caldas, Dasiel Obregon, Dayne Juliate, Deisi Navroski, Eike Yudi, Fabiana Cannavan, Fabiana Paula, Fábio Gomes, Fernanda Nakamura, Fernanda Ometto, Henrique Canuto, Jéssica Mandro, Jéssica Oliveira, Júlia Brandão, Leandro Fonseca, Lucas Mendes, Kelly Alves, Marcela Locatelli, Marcos, Miriam Chaves, Murilo Gallani, Paula, Raíssa Andrade, Mayara Martins, Tayná Negri, Yara Barros e demais companheiros de pós-graduação que colaboraram de alguma forma com o desenvolvimento do trabalho e conclusão desta etapa.

Aos funcionários do Laboratório de Biologia Celular e Molecular: Andrea Calvento, Fábio Duarte, Renata Cruz e Wagner Piccinini por toda a ajuda.

À Marília Henyei, por toda a ajuda com a revisão do trabalho.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), pela oportunidade de realização do curso de mestrado e todos os seus funcionários.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Processo Nº 133215/2019-9.

À Universidade Estadual de Londrina, pela minha formação em Engenharia Agrônômica.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho.

*“A mente que se abre a uma nova ideia,
jamais voltará ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

RESUMO

FONSECA, M. C. **Avaliação quantitativa e taxonômica de bactérias mobilizadoras de fósforo na rizosfera do feijoeiro**. 2020. 65 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020.

O fósforo é um elemento essencial para a realização de funções metabólicas nas plantas e muitas vezes é o principal limitante para a produção agrícola, devido à sua forte imobilização no solo. A atividade microbiana possui um importante papel na ciclagem de nutrientes, mediando os processos de mobilização de fósforo para as plantas. Assim, o presente trabalho busca avaliar como plantas com diferentes eficiências na utilização do fósforo influenciam na estruturação e abundância da comunidade microbiana, e de bactérias mobilizadoras de fósforo, quando cultivadas em solos com diferentes fertilidades. Para isso, foram utilizados dois genótipos de feijão com eficiência contrastante na assimilação de fósforo. Estes foram cultivados em casa de vegetação, sob condições controladas, em solo de Terra Preta da Amazônia (TPA) e de agricultura (SA), e o controle dos tratamentos foi composto por vasos sem plantas (*bulk soil*). Após o cultivo, foram coletados solo rizosférico e *bulk soil* para análises química, atividade enzimática das fosfatases ácidas e alcalina, qPCR dos genes funcionais *pqqC* e *phoD*, relacionados ao ciclo do fósforo, e dos marcadores filogenéticos 16S rRNA de *Bacteria* e *Archaea*. Também foi realizado o sequenciamento *Amplicon de 16S rRNA* de *Bacteria* para análise da estrutura, composição, riqueza e diversidade da comunidade bacteriana presente no solo. Com este estudo foi possível verificar que, com a análise da RDA seguida pela análise de Monte Carlo, os atributos químicos do solos, tais como potássio ($F = 2,70$; $P = 0,047$) e fósforo ($F = 2,72$; $P = 0,049$) foram os que apresentaram maior influência sobre a comunidade bacteriana, que a riqueza e diversidade de espécies foram maiores em solo rizosférico independente do tipo de solo, teste *t student* ($P < 0,05$), e que a composição obtida por meio do sequenciamento de *Amplicon 16S rRNA*, e abundância de *Archaea* e *Bacteria*, realizada por meio da técnica de qPCR, de modo geral, foram diferencialmente estimulada pelos genótipos quando cultivadas em solos com diferentes fertilidade, teste *t student* ($P < 0,05$). Com isso, pode-se concluir que plantas com diferentes eficiências na assimilação de fósforo podem estimular diferencialmente o microbioma da rizosfera e consequentemente influenciar de forma diferente na mobilização de fósforo.

Palavras-chave: Atividade bacteriana. Atividade enzimática. Mobilização de fósforo. *phoD*. *pqqC*. 16S rRNA.

ABSTRACT

FONSECA, M. C. **Quantitative and taxonomic evaluation of phosphorus mobilizers bacteria in the common bean rhizosphere.** 2020. 65 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020.

Phosphorus is an essential element for the performance of metabolic functions in plants and is often the main limiting factor for agricultural production, due to its strong immobilization in the soil. Microbial activity plays an important role in nutrient cycling, mediating phosphorus mobilization processes for plants. Thus, the present work seeks to evaluate how plants with different efficiencies in the use of phosphorus influence the structure and abundance of the microbial community, and of phosphorus-mobilizing bacteria, when grown in soils with different fertilities. For that, two bean genotypes with contrasting efficiency in phosphorus assimilation were used. These were grown in a greenhouse, under controlled conditions, on Terra Preta da Amazônia (TPA) and agriculture soil (SA), and the treatment control consisted of pots without plants (bulk soil). After cultivation, rhizospheric soil and bulk soil were collected for chemical analysis, enzymatic activity of acid and alkaline phosphatases, qPCR of the functional genes *pqqC* and *phoD*, related to the phosphorus cycle, and the phylogenetic markers 16S rRNA from *Bacteria* and *Archaea*. Amplicon sequencing of 16S rRNA from *Bacteria* was also carried out to analyze the structure, composition, richness and diversity of the bacterial community present in the soil. With this study it was possible to verify that, with the analysis of the RDA followed by the Monte Carlo analysis, the chemical attributes of the soils, such as potassium ($F = 2.70$; $P = 0.047$) and phosphorus ($F = 2.72$; $P = 0.049$) were those that had the greatest influence on the bacterial community, that species richness and diversity were greater in rhizospheric soil regardless of soil type, student t test ($P < 0.05$), and that the composition obtained through sequencing of Amplicon 16S rRNA, and abundance of *Archaea* and *Bacteria*, performed using the qPCR technique, in general, were differentially stimulated by genotypes when cultivated in soils with different fertility, student t test ($P < 0.05$). With this, it can be concluded that plants with different efficiency in phosphorus assimilation can differentially stimulate the rhizosphere microbiome and consequently influence phosphorus mobilization differently.

Keywords: Bacterial activity. Enzymatic activity. Phosphorus mobilization. *phoD*. *pqqC*. 16S rRNA.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Fósforo e sua importância	16
2.2 P no solo e suas transformações	17
2.3 Planta e sua importância para microrganismos	19
2.4 Microrganismos no processo de mineralização de P orgânico.....	20
2.5 Microrganismo na solubilização de P inorgânico.....	21
2.6 Técnicas moleculares nos estudos de microrganismos.....	22
3. HIPÓTESE	24
4. OBJETIVO	24
5. JUSTIFICATIVA	24
6. MATERIAL E MÉTODOS	25
6.1 Área de coleta e delineamento experimental	25
6.2 Caracterização dos parâmetros físico-químicos das amostras de solo	27
6.3 Análise das enzimas fosfatases ácida e alcalina	28
6.4 Extração e quantificação de DNA total das amostras de solo	28
6.5 PCR quantitativo em tempo-real (qPCR)	29
6.6 Sequenciamento do gene 16S rRna de <i>Bacteria</i>	30
6.7 Análise de dados	30
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
7.1 Parâmetros químicos do solo	32
7.1.1 Comparação entre os dois tipos de solo	32
7.1.2 Comparação entre os tratamentos em cada tipo de solo	33
7.2 Sequenciamento do gene 16S rRNA bacteriano	35
7.2.1 Análise da estrutura da comunidade bacteriana	35
7.2.2 Diversidade e riqueza da comunidade bacteriana.....	38
7.2.3 Composição da comunidade bacteriana	39
7.2.4 Microrganismo solubilizadores de fósforo	45
7.3 Abundância da comunidade bacteriana	47
7.3.1 Análise de PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	47
7.3.2 Enzimas	50
8. CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

O fósforo (P) é elemento essencial para que exista vida, necessário para a realização de funções metabólicas celulares (CORRELL, 1999), além de fazer parte da composição estrutural das membranas. A principal fonte de P para os seres vivos são as rochas fosfáticas que constitui um recurso natural, não renovável e finito (CORDELL et al., 2009; VACCARI, 2009).

As rochas fosfáticas se distribuem de forma desigual por todo o mundo. Visto o aumento da população mundial e a intensa exploração deste recurso para atender a demanda por alimento, estima-se que as reservas durem cerca de 300 a 400 anos (VAN KAUWENBERGH, 2010), nas condições atuais de exploração, sendo uma problemática mundial quanto a escassez e sustentabilidade.

É conhecido que os solos tropicais e subtropicais, em geral, apresentam baixo teor de P disponível para o desenvolvimento de plantas, sendo este muitas vezes o principal limitante para a produção agrícola (BIELESKI, 1973). Desta forma é necessário a suplementação com adubações fosfatadas, no entanto, menos de 20% destes fertilizantes fica disponível para as plantas, o restante fica retido no solo (VANCE, 2001).

Esta baixa disponibilidade de P para as plantas está relacionado à mineralogia e ao ambiente geoquímico dos solos que, favorecem a retenção dos íons de P em seus constituintes, ou converte este nutriente em compostos pouco solúveis (BRADY; WEIL, 1996). Os microrganismos possuem importante papel na ciclagem de nutrientes e no processo de mobilização de P, disponibilizando mais facilmente a obtenção deste nutriente para as plantas.

Assim, o cenário atual exige descobrir formas alternativas de fornecer altos teores com baixa entrada de P. Estudos buscam formas para melhorar o aproveitamento de formas pouco disponíveis para as plantas, seja por meio de melhoramento genético, utilizando cultivares que apresentam maior eficiência na assimilação deste nutriente, ou de plantas que recrutem mais microrganismos que viabilizam estes processos, por meio da mineralização e solubilização de P.

Desta forma, o presente estudo buscou avaliar como plantas (feijoeiro) com diferentes eficiências na utilização do fósforo influenciam na estruturação e abundância da comunidade microbiana, e de bactérias relacionadas ao ciclo do fósforo, quando cultivados em solos com diferentes fertilidades.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 P e sua importância

O P é elemento essencial para a existência e manutenção da vida no planeta (WESTHEIMER, 1987). Este é necessário para a realização de funções metabólicas celulares, como processos de produção de energia (ATP), ativação e inativação de enzimas, síntese e composição de ácidos nucleicos (CORRELL, 1999; HISINGER, 2001; CARDOSO; ANDREOTE, 2016), além de fazer parte da composição estrutural das membranas celulares.

Na agricultura, o P é um dos nutrientes mais limitantes para a produção agrícola, devido a sua baixa disponibilidade, pois apesar dos solos apresentarem grande quantidade de P total, apenas uma pequena parte está prontamente disponível para as plantas (BIELESKI, 1973). Desta forma, grandes quantidades de fertilizantes fosfatados são utilizados para sustentar a produtividade das culturas (RAGOT et al., 2015).

Com o crescimento populacional após a Segunda Guerra Mundial, houve a necessidade de aumentar a produtividade para sustentar a demanda por alimento. Assim, o uso de fertilizantes sintéticos na produção agrícola teve papel fundamental para suprir essa demanda (CORDELL; WHITE, 2014), e a mineração de rochas fosfáticas aumentou rapidamente para acompanhar a produção de nitrogênio (BRINCK, 1977).

Estima-se que até 2050, a demanda por alimentos deva dobrar para sustentar o aumento populacional de 9 bilhões de pessoas, tornando recursos essenciais para a produção de alimentos, como o P, cada vez mais escassos (GRIGGS et al., 2013). A União Europeia considera o P como um elemento crítico para a bioeconomia e para a segurança alimentar por se tratar de um recurso finito, essencial e insubstituível (CORDELL; WHITE 2014).

Diferente de outros elementos como N e S, o P não possui forma gasosa estável (SCHLESINGER; BERNHARDT, 2013). Na atmosfera, existem traços de fosfina (PH_3) que é uma molécula volátil de ocorrência natural e extremamente tóxica para seres humanos (GENG et al., 2005; HAN et al., 2010; PASEK et al., 2014).

No solo, este elemento nunca é encontrado livre devido à sua alta reatividade, mas é amplamente distribuído em muitos minerais (DANESHGAR et al., 2018). Os depósitos de fosfato, chamados de rocha fosfática ou fosforito, são encontrados em todo o mundo, podendo ser divididos em duas categorias principais: rochas fosfatadas ígneas e sedimentares (DESMIDT et al., 2015).

As rochas ígneas são geralmente de baixa solubilidade e com elevado valor de recuperação. As rochas fosfáticas são mais abundantes e fornecem mais de 80% da produção mundial total de fosfato (DESMIDT et al., 2015). Estas estão distribuídas de forma desigual por todo mundo, além de possuírem qualidade variável. Além disso, podem conter metais pesados que se acumulam em solos aráveis, como por exemplo o cádmio, urânio e zinco (DANESHGAR et al., 2018).

De acordo com US Geological Survey (2019) as principais áreas de mineração de rocha fosfática são: China, Estados Unidos e Marrocos. As maiores reservas sedimentares de rocha fosfática são encontradas no norte da África, China, Oriente Médio e Estados Unidos, sendo que o Marrocos e o Saara Ocidental contêm cerca de 70% das reservas mundiais de fosfato. As reservas ígneas significativas, são encontradas no Brasil, Canadá, Rússia e África do Sul.

No entanto, as reservas brasileiras de P representam 1% de toda a reserva mundial, e destas reservas, grande parte são de baixa qualidade, apresentando baixa solubilidade (DESMIDT et al., 2015). Por este motivo, a maioria dos adubos fosfatados utilizados para a produção agrícola no Brasil são importados, aumentando muito o custo para produção agrícola.

As estimativas das reservas de P variam de acordo com o tipo de modelo de esgotamento usado e as suposições que eles implicam. O modelo de proporção fixa de reservas/produção empregado por Van Kauwenbergh (2010) do IFDC e Fixen (2009) assumem, de maneira otimista, que toda a reserva dure de 300 a 400 anos. No entanto, é provável que as reservas remanescentes tenham qualidade cada vez menor, e que os custos para extração sejam cada vez mais onerosos, o que significa que o fornecimento de fertilizantes fosfatados de alta qualidade também se tornará progressivamente mais restrito (CORDELL et al., 2009).

2.2 P no solo e suas transformações

O P no solo pode ser encontrado nas formas orgânicas (Po) e inorgânicas (Pi). Além disso, o mesmo pode estar tanto na solução do solo e prontamente disponível para absorção pela planta, quanto na fase sólida e apresentando diferente mobilidade e biodisponibilidade. Esta disponibilidade muitas vezes é descrita pelo grau de labilidade, que é a interação que este nutriente possui com os sítios de adsorção. Formas lábeis (disponíveis) são encontradas em solução do solo, ou nos constituintes do solo com baixa energia de ligação, podendo ser

facilmente absorvido por plantas e microrganismos, enquanto que formas pouco lábeis ou não lábeis, possuem uma maior energia de ligação (MENDES; DOS REIS JUNIOR, 2003).

Quando fontes solúveis de P são adicionadas ao solo, esse elemento pode ser adsorvido na superfície dos colóides ou convertido a compostos pouco solúveis ligados à ferro (Fe) e alumínio (Al), diminuindo os teores desse nutriente em solução (BRADY; WEIL, 1996; KHAN; ZAIDI; MUSARRAT, 2014). Por este elemento químico ser altamente reativo, e pela mineralogia do solo, a retenção deste em seus constituintes é favorecida (SYERS et al., 2008).

A remoção de P da solução do solo e seu reabastecimento resultam de uma combinação de processos físico-químicos e processos biológicos (BÜNEMANN, 2015). Na solução do solo as concentrações de P são muito baixas, e na maioria das vezes o teor deste elemento está abaixo do que as plantas conseguem absorver (GOEDERT et al., 1986). A quantidade disponível na solução do solo é reabastecida pela dessorção dos minerais do solo e pela mineralização de Po presente em material orgânico (BÜNEMANN, 2015). Além disso, tais processos são mediados por diversos microrganismos com diferentes estratégias de disponibilização (ILLMER et al., 1995; HINSINGER, 2001; RICHARDSON et al., 2009).

A fração P orgânico representa uma importante fonte para as plantas e sua disponibilização ocorre por meio do processo de mineralização, que é a hidrólise de ligações com grupos orgânicos (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999; LIM et al., 2007). Este processo é realizado por enzimas fosfomonoesterases (fosfoproteínas, fosfatases, fitases e nucleotidasas) (NANNIPIERI et al., 2011; KHAN; ZAIDI; MUSARRAT, 2014). Além disso, essas enzimas são responsáveis por hidrolisar grupos de diferentes complexidades de Po. As fosfomonoesterases ácidas, podem ser liberadas por plantas e por microrganismos no solo, enquanto que as fosfomonoesterases alcalinas são liberadas apenas por microrganismos (JUMA; TABATABAI, 1988; TABATABAI, 1994; NANNIPIERI et al., 2011).

Na fração de Pi, o P pode estar na forma lábil e não lábil. As formas lábeis predominantes são: ácido fosfórico (H_3PO_4), ácido ortofosfórico ($H_2PO_4^-$), ácido monofosfórico (HPO_4^{2-}) e íons fosfato (PO_4^{3-}) que variam conforme o pH do solo (MENDES; DOS REIS JUNIOR, 2003). O P não-lábil está ligado a óxidos e hidróxidos de Fe, Ca e Al. Geralmente ligados à Al^{3+} e Fe^{3+} em solos ácidos, e com Ca^{2+} em solos básicos (GUSTAFSSON et al., 2012; YADAV; VERMA, 2012). Naturalmente, a disponibilidade não depende apenas do pH, mas de diversos outros fatores que alteram o equilíbrio de P da fase sólida para P na solução (ANGHINONI, 2004; PAVINATO, 2008; CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

Sabe-se que a forma preferencial de fósforo absorvida e assimilada pelas plantas é na forma de H_2PO_4^- (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999), e que o manejo da adubação fosfatada, assim como as boas práticas para o uso racional de fontes de P na agricultura são necessárias para reduzir a dependência externa da importação de fertilizantes fosfáticos. Estima-se que apenas 20% do total das adubações fosfatadas ficam disponíveis para as plantas (VANCE, 2001), o restante fica retido na fração mineral do solo, necessitando de formas alternativas que viabilizem o processo de obtenção de P pelas plantas.

2.3 Plantas e sua importância para a microbiota do solo

As plantas correspondem à um fator importante na estrutura e função da comunidade microbiana do solo (PEIFFER et al., 2013; TURNER et al., 2013; ZHOU et al., 2017; ZHOU et al., 2018), disponibilizando compostos orgânicos (açúcares simples) na forma de exsudatos que são utilizados pelos microrganismos (SINGH et al., 2007; CHAPARRO et al., 2013). Na rizosfera é liberado uma grande quantidade de exsudatos, sendo uma fonte de C prontamente disponível para microrganismos (WATT et al., 2006; JONES et al., 2009). A rizosfera funciona como um *hotspot* de mobilização de P (RICHARDSON et al., 2009; SPOHN et al., 2015), visto que a dinâmica do fósforo no sistema solo-planta é determinado pelos efeitos integrativos da transformação, disponibilidade e da utilização do nutriente pela planta (SHEN et al., 2011).

Alguns estudos têm comparado as alterações que ocorrem na comunidade microbiana da rizosfera pelo efeito da exsudação radicular (BOUASRIA et al., 2012; CHAPARRO et al., 2013). Diversos autores já verificaram a influência de leguminosas sobre as concentrações de P na solução no solo (MAT HASSAN et al., 2011). Além disso, algumas leguminosas podem mobilizar formas de P menos lábeis quando comparada com cereais (KAMH et al., 1999; NURUZZAMAN et al., 2005a, NURUZZAMAN et al., 2005b). Ademais, segundo Yan et al. (1996), genótipos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) possuem habilidades para solubilizar P a partir de formas pouco disponíveis, como fósforo ligados à ferro e alumínio.

Fatores como exsudatos liberados pelas raízes (HOFFLAND et al., 1989; KAMH et al., 1999) e a morfologia da raiz (SCHENK; BARBER, 1979) podem contribuir para uma maior eficiência de utilização de P. Isso porque plantas e microrganismos desenvolveram mecanismos para mobilização de P, através da liberação de prótons modificando o pH do solo, liberação de ácidos orgânicos e quelação de cátions, e fosfatases extracelulares que mineralizam P orgânico (ILLMER et al., 1995; HINSINGER, 2001; RICHARDSON et al., 2009).

2.4 Microrganismos no processo de mineralização de P_o

Os microrganismos desempenham papel fundamental na ciclagem de nutrientes, decompondo e mineralizando material orgânico, liberando e transformando elementos inorgânicos (MARSCHNER et al., 2011), podendo ser considerados como bioindicadores da qualidade do solo. Estes, são considerados chave para o ciclo do P no solo (OBERSON; JONER 2005), pois além de mediar os processos para a disponibilização, atuam também como fonte de P.

Como os microrganismos utilizam o P do solo para o crescimento da biomassa microbiana, os mesmos podem imobilizar temporariamente o P da solução, principalmente quando o carbono solúvel está disponível (BUNEMANN et al., 2004; OLANDER; VITOUSEK, 2004). No entanto, podem retornar ao solo rapidamente, sendo considerados como uma importante fonte de P, uma vez que a biomassa microbiana varia 0,4-2,5% do P total em solos cultivados, podendo chegar até 7,5%, em algumas situações (OBERSON; JONER, 2005).

No solo, a fração de P orgânico pode constituir de 30 a 50% do fósforo total (PAUL; CLARK, 1988), embora alguns solos possam variar de 5 a 95% de P orgânico (SHARPLEY, 1985). O P orgânico pode ser classificado em quatro frações: lábil, moderadamente lábil, moderadamente resistente (P - ácido fúlvico), e altamente resistente (P - ácido húmico) (BOWMAN; COLE, 1978; RANDRIAMANANTSOA et al., 2015).

Os microrganismos podem acessar e reciclar P a partir de formas recalcitrantes de P orgânico por processos enzimáticos, por meio das fosfatases, que hidrolisam o grupo ortofosfato a partir de compostos orgânicos, liberando fosfato solúvel e contribuindo assim para a biodisponibilidade de P no solo (CONDRON et al., 2005; NANNIPIERI et al., 2011). As fosfomonoesterases incluem fosfatases ácidas, alcalinas, fitases e nucleotidases, mineralizando os monoésteres de ortofosfatos, como fosfatos de açúcar, fitato e nucleotídeos (NANNIPIERI et al., 2011; FRASER et al., 2015). As fosfatases alcalina são liberadas apenas por microrganismos (ROMANYÀ et al., 2017), enquanto que as fosfatases ácidas são liberadas tanto por plantas quanto por microrganismos (TABATABAI, 1994).

As fosfatases são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações éster-fosfato (com exceção dos fosfatos de inositol, como o fitato) para liberar o fosfato (JUMA; TABATABAI, 1978; NANNIPIERI et al., 2011). As atividades fosfatases ácida e alcalina têm sido amplamente estudadas para a avaliação da mineralização orgânica de P sob diferentes regimes de manejo agrícola em muitos tipos de solos (NANNIPIERI et al., 2011).

2.5 Microrganismos na solubilização de Pi

Diversos são os mecanismos pelos quais os microrganismos podem aumentar a disponibilidade de P do solo. Por exemplo, bactérias mineralizadoras de P e fungos micorrízicos arbusculares são capazes de hidrolisar P orgânico via fosfatase (TAN et al., 2013; CUI et al., 2015; RAGOT et al., 2016). As bactérias solubilizadoras de P podem produzir ácidos orgânicos de baixo peso molecular que solubilizam P inorgânico (OTEINO et al., 2015; AN; MOE, 2016), além da biomassa microbiana que também contribui para disponibilizar P no solo.

A solubilização de P inorgânico no solo por bactérias, ocorrem por meio de mecanismos não enzimáticos, com a liberação de ácidos orgânicos, e H^+ (ZAIDI et al., 2009; JONES; OBURGER, 2011; HSU et al., 2015), solubilizando o P inorgânico devido a diminuição do pH, no caso de solos alcalinos, aumento da quelação dos cátions ligados ao P, ou competição com P pelos sítios de adsorção, ocorrendo a liberação de P para solução do solo (SHARMA et al., 2013).

Diversos são os microrganismos que realizam solubilização de fosfato, tais como: *Pseudomonas frederiksbergensis*, *Bacillus megaterium*, *Rhodococcus opacus*, *Arthrobacter phenanthrenivorans*, *Arthrobacter defluvii*, *Arthrobacter chlorophenolicus*, *Arthrobacter* sp, *Kurthia zopfii*, *Paenibacillus polymyxa*, *Telluria mixta*, *Streptomyces prasinopilosus*, *Streptomyces rishiriensis*, *Bacillus acidicer*, *Rhodanobacter* sp, *Rhodococcus* sp, *Burkholderia*, *Massilia putida*, *Duganella* sp, *Rhizobium leguminosarum*, *Pseudoduganella*, *Variovorax paradoxos*, *Kurthia zopfii*, *Leifsonia shinshuensi* (ZHENG et al., 2018).

Entre os mecanismos de disponibilização de P, o mais bem caracterizado, é mediante secreção de ácido glucônico (GOLDSTEIN, 1995; AN; MOE, 2016). O ácido glucônico é o principal ácido orgânico produzido devido à oxidação direta da glicose pelas enzimas glicose desidrogenase (GDH) (GOLDSTEIN; MEAD, 1993; NAIK et al., 2008) regulado pelo gene *gcd* (quinoproteína glicose desidrogenase). Estas enzimas estão presentes em grupos de bactérias solubilizadoras de Pi cuja biossíntese requer o cofator redox pyrroloquinoline quinone (PQQ), operon, composto por 11 genes (AN; MOE, 2016; ZHOU et al., 2018), este cofator possui produção exclusiva por microrganismos, e este é importante no processo na solubilização de Pi (MEYER, et al., 2011), sendo essencial para a produção do ácido (ZHOU et al., 2018).

Alguns estudos com mutantes bacterianos que não produziam o PQQ, verificaram o ácido glucônico não era produzido, mostrando a íntima relação do cofator com os processos

de solubilização do fosfato (HAN et al., 2008; DE WERRA et al., 2009). Assim, o PQQ pode ser um bioindicador alternativo para bactérias gram negativa solubilizadores de fosfato (RODRÍGUEZ et al., 2006).

Segundo o trabalho de An e Moe (2016), os níveis do PQQ variam de acordo com a fonte de carbono, e é ativado na presença de glicose em comparação com outras fontes. Também foi observado que a enzima glicose desidrogenase é mais abundante em condições onde o substrato está prontamente disponível e quando o fosfato solúvel é baixo (AN; MOE, 2016).

Burkholderiales, Chthniobacteriales e Actinomycetales, além de Pseudomonales, foram identificados a partir de sequências *pqqC* (LONG et al., 2018), embora os pares de primers de PCR tenham sido projetados para atingir o gênero *Pseudomonas* (MEYER et al., 2011). Os genes de biossíntese do PQQ foram verificados em vários microrganismos, incluindo proteobactérias, actinobactérias, firmicutes, cianobactérias, verrucomicrobia, acidobacteriales, planctomycetes e até algumas arqueias (LONG et al., 2018).

2.6 Técnicas moleculares no estudo de microrganismos

Os métodos microbiológicos convencionais foram facilmente adotados por técnicas moleculares, aliado a ferramentas de bioinformática, que permitem analisar comunidades microbianas complexas e diversas com maior facilidade e rapidez. Estas técnicas permitem a exploração de dados nos estudos da diversidade genética de microrganismos não cultiváveis em diversos ambientes, permitindo uma investigação mais ampla e completa sobre os microrganismos (BOUGHNER; SINGH, 2016).

As tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS), auxiliaram na determinação dos principais fatores responsáveis pela natureza dinâmica dessas comunidades complexas e sua interação com plantas e ambientes nativos. Entre estas tecnologias, a análise da comunidade microbiana com base no sequenciamento do gene 16S rRNA é uma ferramenta rápida e confiável que está sendo prontamente usada para análise abrangente de comunidades microbianas (KIMURA et al., 2007).

O gene 16S rRNA é atualmente considerado o marcador filogenético mais versátil, contém regiões hipervariáveis intercaladas com regiões altamente conservadas e está presente em todos os procariontes, permitindo sua aplicação ao estudo da estrutura da comunidade microbiana (TRINGE et al., 2008). Este funciona como um excelente marcador filogenético, sendo mais resistente às mutações em comparação com outros genes conservados (CLARRIDGE III, 2004).

Com o desenvolvimento destas técnicas, várias ferramentas de software foram desenvolvidas para analisar eficientemente a enorme quantidade de dados que são gerados (BOUGHNER; SINGH, 2016). As ferramentas de software mais utilizadas incluem Mothur (SCHLOSS et al., 2009) e QIIME (CAPORASO et al., 2010), que incluem etapas para a qualidade de filtragem dos conjuntos de dados, e verificação de quimeras (EDGAR et al., 2011).

Para a classificação filogenética, utiliza-se bases de dados de sequências de 16S rRNA bem conservadas que são periodicamente atualizadas nos bancos de dados (COLE et al., 2014). Além disso, outra técnica muito utilizada é a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), utilizada para avaliar a abundância quantitativa de genes funcionais e de marcadores filogenéticos, que são prontamente usada para a complementação e verificação dos dados de sequenciamento de genes de *16S rRNA* (HANG et al., 2014).

As tecnologias NGS foram utilizadas para triagem de alto rendimento e não só se tornaram ferramentas mais eficientes e acessíveis para o estudo de comunidades microbianas, mas também fornecem uma melhor visão das interações que ocorrem em comunidades microbianas complexas (BOUGHNER; SINGH, 2016).

3 HIPÓTESE

Neste trabalho hipotetizamos que, plantas com diferentes eficiências na utilização de P têm capacidade de alterar diferencialmente a microbiota da rizosfera, incluindo os microrganismos relacionados ao ciclo do P.

4 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a estrutura da comunidade microbiana, e quantificar a abundância de bactérias totais e mobilizadoras de fósforo, utilizando dois genótipos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L), um possuindo maior eficiência na assimilação de P (BAT 477) e outro menos eficiente (DOR 364), em dois tipos de solo: TPA – Terra preta da Amazônia com maior disponibilidade de nutrientes, e solo SA – Solo Agrícola, onde ocorre adubações fosfatadas e possui baixa disponibilidade de P, da região de Belterra, Santarém-Pará. Avaliou-se como essas plantas com diferentes eficiências na utilização do fósforo influenciam na estruturação e abundância da comunidade de bactérias mobilizadoras de fósforo, quando cultivados em solos com diferentes fertilidades.

5 JUSTIFICATIVA

Devido ao baixo teor de fósforo prontamente disponível na solução do solo em solos tropicais e a sua importância para o desenvolvimento de plantas, o presente trabalho buscou avaliar a microbiota associada à mobilização de fósforo, que aumentam a disponibilidade desse nutriente para as plantas, e avaliou a variação da comunidade microbiana estimulada por plantas que possuem diferentes eficiências na assimilação de P.

Com isso, investigou-se os genes funcionais *pqqC* (pyrroloquinoline quinone sintase C) associados à produção de ácido glucônico, principal ácido orgânico produzido por bactérias envolvidas no processo de solubilização de fosfato, e *phoD* (phosphomonoesterase D), presente nas enzimas fosfatases que promovem a mineralização de P orgânico. Também foram avaliadas por meio do sequenciamento do marcador filogenético 16S rRNA de *Bacteria*, a estrutura e composição desta comunidade.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Área de coleta e delineamento experimental

As áreas de coleta do solo estão localizadas na região centro-oeste do Pará, no município de Belterra. O clima regional é classificado como Am (Köppen), tropical úmido, temperatura média de 26 °C e precipitação total acima de 2.500 mm anuais, com regime pluviométrico com estação seca (ALVARES et al., 2013), onde 70% da precipitação anual é concentrada no período de dezembro a junho.

Na área de Terra Preta Amazônica (2° 38' 42" S e 54° 46' 88" W, altitude de 155 m), é cultivado mamão sem a adição de fertilizantes, e na área de agricultura, é feito rotação de cultura com soja (*Glycine max*), principal cultura cultivada, sorgo (*Sorghum bicolor*), e milho (*Zea mays*). A área de agricultura (2° 40' 98" S e 54° 55' 47" W, altitude de 158 m), é cultivada aproximadamente há 20 anos, sendo periodicamente adubada para o cultivo das culturas.

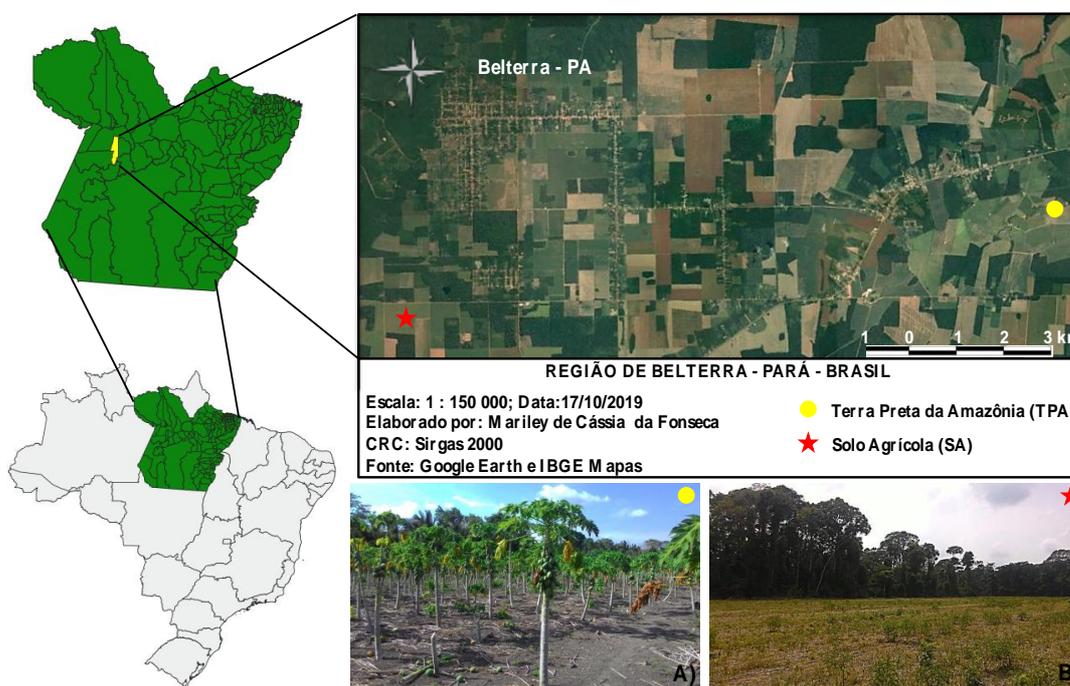


Figura 1 – Fotos das áreas da coleta localizadas no município de Belterra, estado do Pará: (A) Solo Terra Preta Amazônica (TPA), (B) Solo em pousio após colheita de soja

Os solos foram coletados em 5 pontos de cada área, onde a camada de serapilheira foi retirada e o solo da camada de 0 a 0,20 m de profundidade foi coletado, formando uma amostra composta para cada tipo de solo. A coleta foi realizada em outubro de 2017.

Para uma melhor visualização do desenvolvimento do trabalho, foi elaborado um fluxograma das atividades:

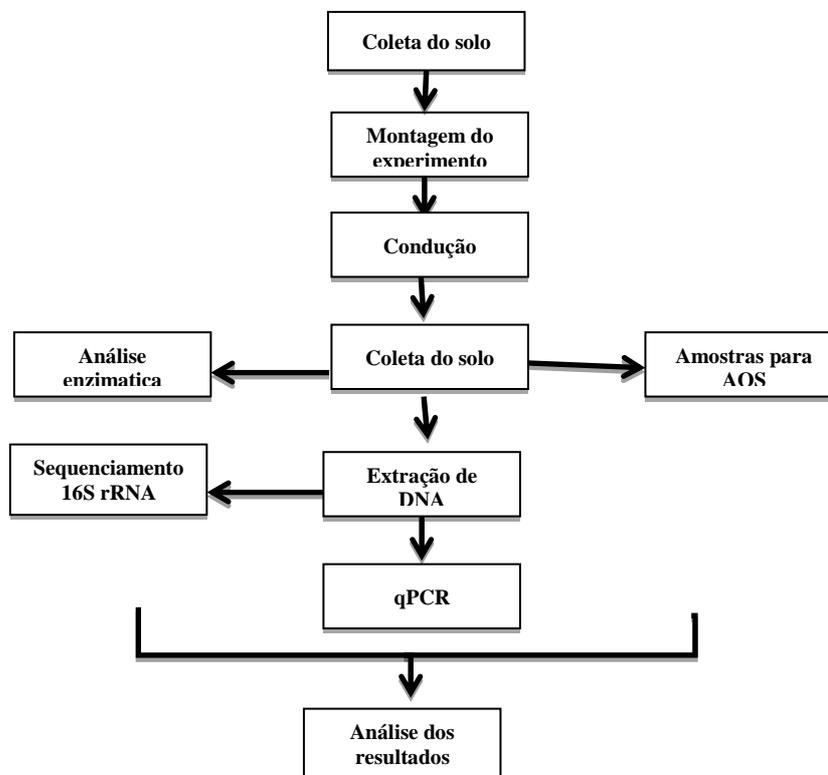


Figura 2 - Fluxograma de atividades desenvolvidas

Os solos foram peneirados para a retirada de impurezas como pedras, folhas e raízes. A condução do experimento em mesocosmo em casa-de-vegetação, o delineamento realizado foi inteiramente casualizado (DIC), composto por dois fatores (solo e cultivar), três níveis (tipos de solo, cultivar e controle – ausência de plantas) com 5 repetições.

Os genótipos de feijão utilizados foram DOR 364 e BAT 477 que mostram respostas contrastantes à eficiência de P, sendo DOR 364 suscetível e BAT 477 tolerante ao baixo teor disponível de P no solo. Ambos os genótipos foram desenvolvidos no Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) em Cali, Colômbia (RAMIREZ et al., 2013; LAZALI et al., 2014). Estes genótipos foram conduzidos até as plantas atingirem a fase de pré-florescimento (R5, aproximadamente 45 dias), após a condução, foi coletado o solo rizosférico dos tratamentos e de seus respectivos controles para análises microbiológicas, e parte do solo foi coletada para análises físico-químicas de solo. A figura 3 consta a representação esquemática da montagem do experimento em casa de vegetação:

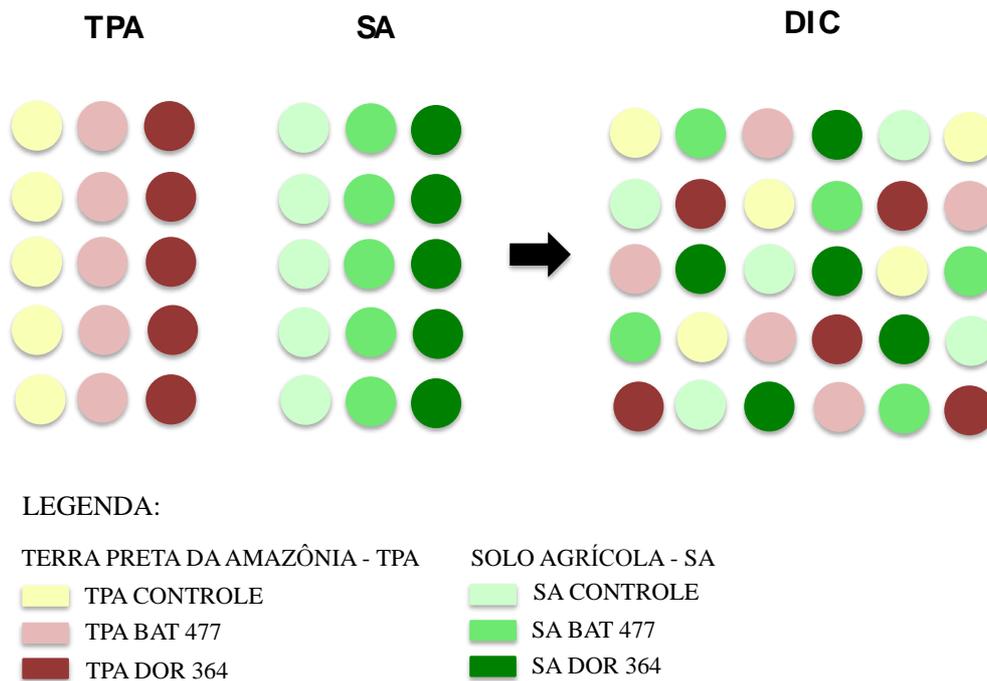


Figura 3 - Esquematização da montagem do experimento em mesocosmos, em casa de vegetação, antes e depois da casualização

Após a condução do experimento e suas respectivas coletas, os solos rizosféricos foram armazenados a temperaturas de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para extração de DNA, e parte do solo foi enviado ao laboratório de análises de fertilidade de solos. Estes dados da fertilidade do solo foram comparados por meio de análises estatísticas de comparação de média, teste *t student* a 5% de significância.

6.2 Caracterização dos parâmetros físico-químicos das amostras de solo

As amostras de solos foram enviada para o Laboratório de Análises Químicas Pirasolo, para a análise dos parâmetros físico-químicos. No laboratório, foram realizadas as análises para fins de avaliação da fertilidade do solo, tais como: Potencial hidrogeniônico (pH) em CaCl_2 , macro e micronutrientes, soma de bases (SB), capacidade de troca de cátions (CTC), saturação por bases (V%), saturação por alumínio (m%) e teor de matéria orgânica (M.O). A caracterização dos parâmetros físicos do solo pode ser verificada na Tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização dos parâmetros físicos dos solos

Solo		TPA g kg ⁻¹			SA g kg ⁻¹		
Argila	(<0,002mm)	608	613	654	826	825	784
Silte	(0,053-0,002mm)	222	207	176	124	115	166
Areia Grossa	(2,00-0,210mm)	110	110	110	30	40	40
Areia Fina	(0,210-0,053mm)	60	70	60	20	20	10
Areia Total		170	180	170	50	60	50

6.3 Análise das enzimas fosfatase ácida e alcalina

A análise enzimática foi realizada em dois valores de pH distintos, pH 6,5 para fosfatase ácida e pH 11,0 para fosfatase alcalina, utilizando o método descrito por Tabatabai e Bremner (1969), usando a atividade do substrato p-nitrofenil fosfato (AMES, 1996). Foi pesado 1 g de solo para cada amostra e colocado em tubos de vidro de 50 mL. Após a pesagem do solo foi adicionado 4 mL do tampão MUB (no pH 6,5 e 11) e 1 mL da solução p-nitrofenilfosfato de sódio (0,05 M).

Os recipientes foram incubados a 37 °C durante 30 minutos, e após a incubação foram adicionados 1 mL de CaCl₂ 0,5 M e 4 mL de NaOH 0,5 M. O conteúdo foi filtrado em papel filtro Whatman n° 2, e feito a leitura da absorbância a 420 nm em espectrofotômetro. O conteúdo de p-nitrofenol foi calculado por uma curva padrão previamente estabelecida com valor de R² de 0,995.

6.4 Extração e Quantificação de DNA de Solo

O DNA total do solo de cada réplica foi extraído em duplicata com o *Power Soil DNA Extraction Kit* (MoBio Laboratories), de acordo com o protocolo estabelecido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura. A qualidade das amostras de DNA foi inicialmente conferida em gel de agarose 1%, corado com GelRed em solução tampão TSB (do inglês *Sodium Borate Buffer*) (BRODY; KERN, 2004).

O gel foi submetido a um campo elétrico de 85 V por 45 minutos e foto-documentado. A qualidade e quantidade das amostras também foram analisadas em espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific) com densidade ótica de 260 nm. O DNA total extraído das amostras foi armazenado a -20 °C.

6.5 PCR Quantitativo em Tempo Real

A técnica de PCR quantitativo em tempo-real (qPCR) foi utilizada para quantificar os grupos de interesse a partir das amostras de DNA total. Para cada gene, foi construída uma curva padrão entre 10^2 a 10^8 cópias do gene de interesse, obtido previamente pela técnica de PCR a partir de estirpes padrão da DSMZ (do inglês *Deutsch Collection of Microorganism and Cell Cultures*), dos isolados 50090 de *Pseudomonas fluorescence* para a curva de bactéria e do gene *pqqC*, e para *Archaea*, foi utilizado amostra ambiental para a construção da curva.

Para a técnica de qPCR, as amostras foram pipetas em triplicata, para maior confiabilidade dos dados, utilizando o equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems). Para os genes 16S rRNA de *Bacteria* e *Archaea*, com volume final de 10 μL por reação, contendo 5 μL do SYBR Green ROX qPCR (Thermo Fisher Scientific), 1 μL de cada primer (5 pmols), 1 μL de DNA (20 ng/ μL de DNA), e 2 μL de água ultrapura (Milli-Q) estéril, e os ciclos de reação seguiram os protocolos estabelecidos nos trabalhos de referência dos iniciadores utilizados.

Para o gene *pqqC*, foi utilizado um volume final de 10 μL por reação, contendo 5 μL do SYBR Green ROX qPCR (Thermo Fisher Scientific), 0,7 μL de cada primer (5 pmols), 2 μL de DNA concentrado (100 ng/ μL de DNA) 1,4 μL de água ultrapura (Milli-Q) estéril, 0,2 μL de BSA e os ciclos de reação seguiram os protocolos estabelecidos nos trabalhos de referência dos iniciadores utilizados.

Para o gene *phoD*, foi utilizado um volume final de 25 μL por reação, contendo 12,5 μL do SYBR Green ROX qPCR (Thermo Fisher Scientific), 0,2 μL de cada primer (5 pmols), 2 μL de DNA concentrado (20 ng/ μL de DNA) 9,6 μL de água ultrapura (Milli-Q) estéril, 0,5 μL de BSA e os ciclos de reação seguiram os protocolos estabelecidos nos trabalhos de referência dos iniciadores utilizados.

Os primers e as referências utilizadas para realização da PCR em tempo real, podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2 - Genes analisados pela técnica de qPCR

GENE	GRUPO ALVO	PRIMERS	SEQUÊNCIA (5'-3')	REFERÊNCIAS
16S rDNA <i>Bacteria</i>	Comunidade total de Bacteria	515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	Caporaso et al. (2011)
		806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT	
16S rRNA <i>Archaea</i>	Comunidade total de Archaea	519F	CAGCCGCCGCGGTAA	Klindworth et al. (2013) Stahl; Amann (1991)
		915R	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	
<i>phoD</i>	Mineralização de P	ALPS-F730 ALPS-R1101	CAGTGGGACGACCACGAGGT GAGGCCGATCGGCATGTCG	Sakurai et al. (2008)
<i>pqqC</i>	Cofator ligado a produção de ác. glucônico	pqqCf1	CAGGGCTGGGTGCGCAACC	Meyer et al. (2011)
		pqqCr1	CATGGCATCGAGCATGCTCC	

Os dados obtidos por meio da técnica de qPCR foram analisados quanto a sua especificidade e eficiência. Os dados de abundância de cada amostra foram transformados em número de cópias por μL de DNA.

6.6 Sequenciamento do gene 16S rRNA de *Bacteria*

O sequenciamento em larga escala do gene 16S rRNA de *Bacteria* foi realizado no Centro de Genômica Funcional da ESALQ/USP. Este foi realizado a partir de amostras de DNA genômico extraído do experimento em mesocosmo.

As amplificações por PCR foram realizadas com o conjunto de primers 515f/806r modificado, Forward primer (515) 5'GTGYCAGCMGCCGCGGTAA (troca de C por Y) e Reverse primer (806) 5'GGACTACNVGGGTWTCTAAT (troca de H por N) (CAPORASO et al., 2011), que amplificam a região V4 do gene 16S rRNA de *Bacteria*, e o sequenciamento foi realizado na plataforma *Miseq* (Illumina, USA), com leituras pareadas de 250 pb (2x251).

A partir dos dados gerados, foi possível obter as estimativas de riqueza, medidas de diversidade e perfis taxonômicos das comunidades de *Bacteria* nos solos do presente estudo.

6.7 Análise de dados

Para análise química, foi realizada inicialmente duas comparações, a primeira foi entre os tipos de solos, sendo representadas pelas letras maiúsculas. A segunda, foi a comparação entre os tratamentos dentro de cada tipo de solo, sendo representados pelas letras minúsculas. Após as análises, como foi verificado diferença estatística a 5% de significância pelo teste *t de student*, por se tratar de solos bem diferentes, as análises seguiram de forma separada para avaliar o comportamento de cada genótipo em cada tipo de solo.

Os dados da análise qPCR foram obtidos pelo StepOne Software v.2.3 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), deste foram exportados para a o programa Excel (Microsoft) onde foram calculadas as quantidades de cópias do gene por nanograma de microlitro de DNA.

As sequências resultantes da análise de sequenciamento de *amplicons* de 16S rRNA de *Bacteria* e *Archaea* foram pré-processadas, filtradas por qualidade e analisadas através do software Qiime2 (ROUSK et al., 2010). A ferramenta dada2 (CALLAHAN et al., 2017) foi utilizada para correção das sequências e remoção de quimeras utilizando método consenso. As sequências *forward* e *reverse* após unidas apresentaram baixa qualidade média por *read*, que causaram uma redução das sequências por amostra. As sequências *forward* foram filtradas seguindo os parâmetros de qualidade recomendados pelo software, agrupando as *reads* em 260 pb. A identificação taxonômica foi realizada através da ferramenta q2-feature-classifier, treinada utilizando os *primers* do sequenciamento e utilizando o Banco de Dados SILVA (versão 128) (QUAST et al., 2012).

As análises de redundância (RDA) foram realizadas para avaliar a estrutura taxonômica da comunidade de *Archaea* e *Bacteria*, utilizando o software Canoco versão 4.5 (TER BRAAK; SMILAUER, 1998) baseadas no teste permutação de Monte Carlo a 5% de significância.

O índice de Shanno foi utilizado para avaliar a diversidade da comunidade microbiana, que corresponde ao número de espécies e como estes indivíduos se distribuem dentro da comunidade (equitatividade), e para avaliação da riqueza, que refere-se ao número de espécie em uma comunidade, foi utilizado o índice Taxa S. Ambas foram realizadas pelo software PAST versão 3 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001). Para ambas análises foi utilizado o teste estatístico *t de student* ($p < 0,05$).

Os gráficos e tabelas foram feitos através dos softwares PowerPoint e Excel (Microsoft), Sigmaplot (San Jose, CA, USA) e Canoco Draw (TER BRAAK; SMILAUER, 1998).

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Parâmetros químicos dos solos

7.1.1 Comparação entre os dois tipos de solo

Observou-se que o solo de TPA apresentou os maiores teores de matéria orgânica (M.O.), fósforo resina (Pres), cálcio (Ca), magnésio (Mg), acidez potencial (H+Al), capacidade de troca catiônica (CTC), saturação por bases (V%) e soma de bases (SB) quando comparado ao solo agrícola ($P < 0,05$). De acordo com Silva et al. (2016), solos de TPA, de maneira geral, apresentam elevados teores de M.O, Ca e Mg, o que corrobora com os resultados obtidos no presente estudo. Embora os teores de P resina não tenham sido tão altos no solo de TPA, como são encontrados na literatura, este foi significativamente maior quando comparado com o SA. Essa variação pode ser devida as diferenças dos hábitos de subsistência, dos povos que habitavam o local (SJOBERG, 1976). Sua alta disponibilidade, pode estar atribuída aos altos teores de M.O, e grupos carboxílicos (orgânicos) adsorvidos nos óxidos/hidróxidos de Fe e Al.

Por outro lado, o solo de agricultura apresentou teores de potássio (K) superiores aos encontrados no TPA ($P < 0,05$). Tal fato pode estar associado com as adubações periódicas, contendo K_2O , para produção agrícola. De acordo com Silva et al. (2006) os solos de TPA apresentam teores baixos de K, o que em muito das vezes, pode ser um fator limitante para a produção de diversas culturas nesse tipo de solo. O teor de K trocável encontrado no solo de TPA (Tabela 3) encontra-se muito abaixo da faixa considerada adequada, que é de 1,6 a 3,0 $mmol_c kg^{-1}$ (RAIJ et al., 1997). O baixo teor de K trocável, comparativamente aos altos teores de Ca e Mg trocáveis no solo de TPA, pode induzir a um desbalanço nutricional nas plantas cultivadas nesses solos, afetando a absorção pela inibição competitiva com Ca e Mg nos sítios de adsorção do solo (MOREIRA et al., 1999).

Em relação aos micronutrientes, observou-se maiores teores de cobre (Cu), manganês (Mn) e boro (B) no solo de TPA quando comparado ao solo agrícola ($P < 0,05$). Tal fato pode estar relacionado com o maior teor de M.O presente neste solo. Por outro lado, os teores de ferro (Fe) foram maiores no solo SA ($P < 0,05$). Cabe ressaltar que a fração argila foi maior no SA (81,2%) em comparação ao solo TPA (62,5%) ($P < 0,05$) (Tabela 1). De acordo com Fernandes et al. (2004), solos de coloração avermelhada, como é no caso do SA, apresentam em sua constituição, o mineral hematita, característico por apresentar Fe em sua composição,

promovendo tal coloração ao solo. Para os demais atributos químicos, não foi observada diferenças significativas entre os tipos de solo ($P > 0,05$).

Devido os solos apresentarem grandes diferenças, como pode ser observado na Tabela 3, o presente estudo buscou avaliar os tratamentos de forma separada, para cada tipo de solo.

7.1.2 Comparação entre os tratamentos em cada tipo de solo

Avaliando os tratamentos para cada tipo de solo, para a TPA cultivada com o genótipo BAT 477, apresentou maiores teores de Cu e Mn em relação ao solo em que foi cultivado o genótipo de feijão DOR 364 e ao controle (sem planta). Ainda, a saturação por bases foi superior no solo cultivado com o BAT 477 em relação ao DOR 364 e semelhante ao tratamento controle.

O tratamento controle da TPA obteve os maiores teores de K, provavelmente por não haver planta para a extração deste nutriente. No entanto os teores de K foram baixos para todos os tratamentos, corroborando com o trabalho realizado por Silva et al. (2006), onde também foram observados baixos teores de K em solos de TPA.

Para o solo de agricultura cultivados com o genótipo BAT 477, observou-se os maiores teores em de Pres, Cu, Mn, Zn, Cu e H+Al em relação ao controle. No entanto, não houve diferença estatística quando comparado ao solo cultivado com o genótipo DOR 364. Os teores de B foram maiores no solo cultivados com o genótipo BAT 477 em relação ao DOR 364, que não diferenciou estatisticamente do controle, provavelmente isso ocorreu devido a maior absorção deste nutriente pelo DOR 364.

Ambos os tratamentos sob influência dos genótipos, apresentaram maiores teores de Fe, e menor pH quando comparadas com o controle. Este aumento da acidez provavelmente ocorreu em função a liberação de prótons (H^+) pelas raízes, durante a absorção e assimilação dos cátions, liberando compostos orgânicos que aumentam a disponibilidade de Fe (TAIZ; ZEIGER, 2010). As demais variáveis estudadas não apresentaram diferença significativas ($P > 0,05$).

Tabela 3 – Valores médios dos parâmetros químicos em solos de Terra Preta da Amazônia (TPA) e solo de agricultura (SA), sob influência de dois genótipos de feijão (BAT 477 e DOR 364) e seus respectivos controles (ausência de planta)

	Terra Preta			Solo Agrícola			Em cada linhagem, os resultados apresentados correspondem às médias e aos desvios dos parâmetros
	BAT 477	DOR 364	CONTROLE	BAT 477	DOR 364	CONTROLE	
M.O. (g kg ⁻¹)	55,00 ± 0,00 a A	54,33 ± 1,41 a A	54,33 ± 2,31 a A	44,00 ± 1,73 a B	40,33 ± 1,15 b B	41,67 ± 1,15 ab B	
pH (CaCl ₂)	5,60 ± 0,10 a A	5,60 ± 0,00 a A	5,57 ± 0,05 a A	5,50 ± 0,00 b B	5,50 ± 0,00 b B	5,60 ± 0,00 a A	
P res (mg kg ⁻¹)	42,33 ± 2,08 a A	38,00 ± 3,00 a A	42,00 ± 5,20 a A	35,33 ± 1,53 a B	33,33 ± 2,08 ab B	31,00 ± 0,00 b B	
SO ₄ (mg kg ⁻¹)	5,33 ± 1,15 a A	6,00 ± 0,0 a A	9,00 ± 5,29 a A	8,67 ± 2,08 a A	7,33 ± 0,58 a A	7,67 ± 0,58 a A	
K (mmol _c kg ⁻¹)	0,67 ± 0,12 b B	0,60 ± 0,05 b B	1,27 ± 0,10 a B	1,13 ± 0,12 b A	0,93 ± 0,12 b A	2,43 ± 0,12 a A	
Ca (mmol _c kg ⁻¹)	91,00 ± 1,00 a A	91,33 ± 1,53 a A	93,00 ± 6,56 a A	45,67 ± 1,53 a B	47,00 ± 2,67 a B	45,00 ± 2,65 a B	
Mg (mmol _c kg ⁻¹)	19,67 ± 1,53 a A	17,67 ± 0,58 a A	18,00 ± 1,00 a A	10,33 ± 1,15 a B	11,33 ± 0,58 a B	10,00 ± 1,00 a B	
Al ³⁺ (mmol _c kg ⁻¹)	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A	
H+Al (mmol _c kg ⁻¹)	30,00 ± 1,73 b B	34,00 ± 0,01 a A	34,00 ± 0,00 a A	30,00 ± 1,73 a B	28,00 ± 0,00 ab B	26,00 ± 1,73 b B	
SB (mmol _c kg ⁻¹)	111,67 ± 2,31 a A	110,00 ± 2,00 a A	112,00 ± 7,55 a A	57,00 ± 2,65 a B	59,33 ± 3,21 a B	57,67 ± 4,04 a B	
CTC (mmol _c kg ⁻¹)	141,67 ± 4,04 a A	144,00 ± 2,00 a A	146,00 ± 7,55 a A	87,00 ± 2,65 a B	87,33 ± 3,21 a B	83,67 ± 2,89 a B	
V (%)	78,67 ± 1,15 a A	76,33 ± 0,58 b A	76,67 ± 1,53 ab A	66,00 ± 2,00 a B	67,67 ± 1,15 a B	68,67 ± 2,52 a B	
m (%)	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A	
Cu (mg kg ⁻¹)	0,60 ± 0,00 a A	0,46 ± 0,05 b A	0,46 ± 0,05 b A	0,50 ± 0,17 a B	0,30 ± 0,03 ab B	0,23 ± 0,05 b B	
Fe (mg kg ⁻¹)	31,50 ± 3,00 a B	33,00 ± 3,80 a B	30,40 ± 2,10 a B	58,60 ± 6,70 a A	53,10 ± 1,20 a A	41,30 ± 0,50 b A	
Zn (mg kg ⁻¹)	3,50 ± 0,10 a A	3,30 ± 1,00 a A	2,90 ± 0,10 a A	3,70 ± 0,40 a A	3,40 ± 0,30 ab A	3,00 ± 0,10 b A	
Mn (mg kg ⁻¹)	24,00 ± 1,80 a A	17,00 ± 3,60 b A	18,30 ± 2,40 b A	1,80 ± 0,20 a B	1,10 ± 0,30 ab B	1,30 ± 0,10 b B	
B (mg kg ⁻¹)	0,40 ± 0,04 a A	0,40 ± 0,10 a A	0,30 ± 0,06 a A	0,30 ± 0,07 a B	0,23 ± 0,02 b B	0,20 ± 0,02 b B	

micos analisados para cada área de estudo, utilizando o teste *t student*, a 5% de probabilidade. Letras minúsculas representam a comparação entre os tratamentos para cada tipo de solo. Letras maiúsculas representam a comparação entre os tipos de solo.

7.2 Sequenciamento do gene 16S rRNA bacteriano

O sequenciamento em larga escala de amplicons do gene 16S rRNA de *Bacteria* foi realizado com o objetivo de avaliar a diversidade e o perfil taxonômico das comunidades bacterianas presentes nos solos de TPA e SA. As amostras foram rarefadas para 35000 sequências de acordo com a amostra com o menor número de sequências.

7.2.1 Análise da estrutura da comunidade bacteriana

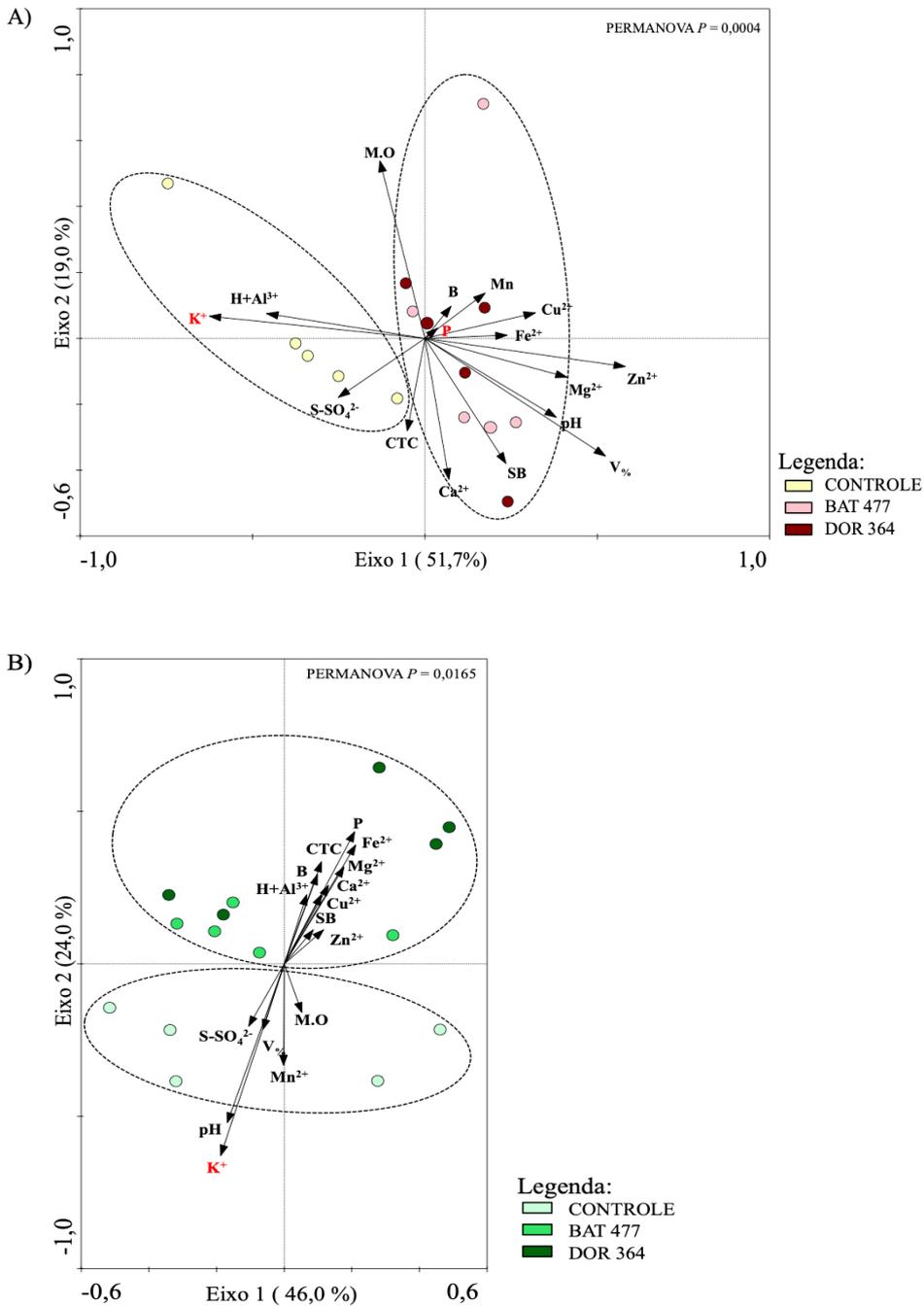
A análise de redundância (RDA) foi utilizada para avaliar a estrutura taxonômica da comunidade bacteriana e relacioná-las com os atributos químicos dos solos (Figura 4A e 4B). Para o solo de TPA, o primeiro e segundo eixo juntos explicaram mais de 70% da variação total da comunidade microbiana (Figura 4A). Os tratamentos foram separados em dois grupos distintos, de acordo com a análise de PERMANOVA ($P < 0,001$). A estrutura da comunidade obtida no controle (sem planta) foi significativamente diferente ($P < 0,05$) da obtida no solo em que foram cultivados os genótipos de feijão (BAT 477 e DOR 364), os quais não diferiram entre si. Diversos trabalhos verificaram que a estrutura de bactérias da rizosfera difere daquela do *bulk soil* (FOSTER, 1986; MARILLEY; ARAGNO, 1999; BERG et al., 2002; DE SOUZA et al., 2018). Segundo Spohn et al. (2013), a presença de grupos microbianos relacionados ao desenvolvimento de plantas é elevada na rizosfera, em comparação com o *bulk soil*.

De acordo com a análise da RDA seguida pela análise de Monte Carlo, os grupos microbianos presentes em solos de TPA apresentaram correlação significativa para os teores de K ($F = 2,70$; $P = 0,047$) e P ($F = 2,72$; $P = 0,049$). Ressalta-se que K foi o elemento químico que mais influenciou a estrutura taxonômica do tratamento controle em relação aos demais tratamentos. Muito provável, pelo maior teor deste nutriente no solo em que não houve o cultivo dos genótipos de feijão. De acordo com Silva et al. (2006), os solos de TPA naturalmente apresentam baixos teores de K, em detrimento da relação deste elemento com outros cátions, como o Ca e o Mg, que são encontrados em altos teores neste tipo de solo, como pode ser observado na análise química de solo (Tabela 3 - de análise química do solo). Altos teores de Ca e Mg, reduzem a disponibilidade de K, uma vez que a atração do K pelas cargas negativas dos coloides do solo é menor em comparação aos demais cátions bivalentes (inibição competitiva nos sítios de adsorção do solo), sendo portanto, passíveis de lixiviação, o que pode causar uma redução nos teores deste elemento neste tipo de solo (MOREIRA et al., 1999), ainda mais na região amazônica que apresenta altos índices pluviais.

Em relação ao P, observou-se que este elemento influenciou a estrutura da comunidade microbiana no solo em que foram cultivados os genótipos de feijão, fato este que pode estar relacionado à capacidade das plantas em recrutar microrganismos que possibilitem a solubilização e mineralização de diferentes formas de P do solo (RICHARDSON et al., 2009; SPOHN et al., 2015). Assim como acontece de apresentar uma microbiota diferencialmente distinta quando em presença de um genótipo elite de feijoeiro, quando selecionado geneticamente para maior tolerância ao fungo *Fusarium oxysporum* (MENDES et al., 2018). Cabe ressaltar que os solos de TPA apresentam naturalmente altos teores de P, porém, em distintas formas e quantidades (ex: mineral e orgânica). Altos teores de P orgânico mas de baixa pronta disponibilidade, são encontrados neste tipo de solo, sendo passíveis de absorção através de processos de mineralização e solubilização exercidos por alguns gêneros de microrganismos presentes no solo.

Para o SA, o primeiro e segundo eixo juntos também explicaram mais de 70% da variação total da comunidade microbiana (Figura 4B). Da mesma forma que foi obtido para o solo de TPA, os tratamentos utilizados foram segregados em dois grupos distintos, pela análise de PERMANOVA ($P = 0,0165$). A estrutura encontrada no solo do tratamento controle (sem planta) foi distinta ($P < 0,05$) da obtida no solo em que foram cultivados os genótipos de feijão (BAT 477 e DOR 364), sendo válido ressaltar que não houve distinção entre os genótipos. Além disso, baseados na análise de permutação de Monte Carlo, verificou-se que a estrutura da comunidade microbiana no solo de SA apresentou correlação significativa para os teores de K ($P = 0,042$; $F = 2,36$). O resultado obtido se assemelha ao encontrado para o solo de TPA, onde o tratamento controle foi influenciado pelos teores de K em relação ao solo em que foram cultivados os diferentes genótipos de feijão. Mesmo que em solos SA os teores de K sejam maiores que os encontrados em solos de TPA, principalmente pelo melhor equilíbrio entre os cátions do solo e pelo *input* anual de K via fertilizantes, fica claro que a absorção deste elemento pelas plantas, ocorreu (Tabela 3), modificando a estrutura da comunidade microbiana neste tipo de solo. Depois do nitrogênio (N), o K é o nutriente exigido em maior quantidade pelas plantas (CLOVER; MALLARINO, 2013), portanto, sua extração do solo é maior em solos cultivados, como pôde ser observado no presente estudo.

Figura 4. Análise de redundância (RDA) entre o perfil taxonômico da comunidade microbiana (baseado no sequenciamento de 16S rRNA à nível de gênero) e os atributos químicos dos solos de Terra preta da Amazônia (TPA) (Figura 4A) e de agricultura (SA) (Figura 4B). Parâmetros químicos em vermelho representam diferenças obtidas pelo teste de permutação de Monte Carlo ($P < 0.05$). Linhas tracejadas representam agrupamentos evidenciados pelo teste de PERMANOVA (Distância de Bray Curtis, $P < 0.05$)

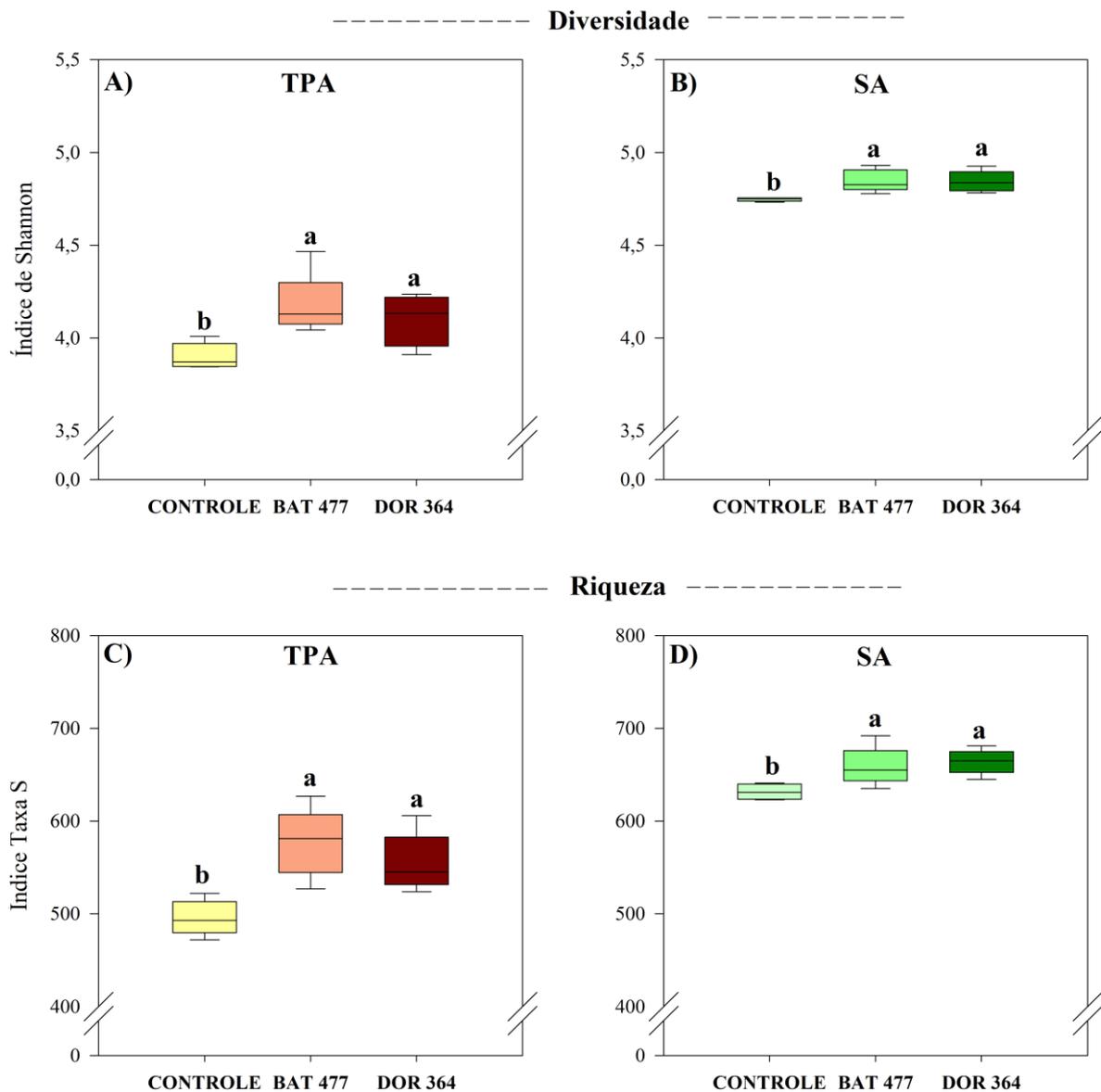


7.2.2 Diversidade e riqueza da comunidade bacteriana

Através do índice de Shannon, observou-se que a diversidade da comunidade microbiana foi diferente entre os tratamentos. Para o solo de terra preta (TPA), verificou-se que os tratamentos contendo os genótipos apresentaram maior diversidade quando comparadas com o tratamento controle (solo sem planta) ($P < 0,05$). Além disso, constatou-se o mesmo padrão para os solos de agricultura (SA), que também apresentaram maior diversidade nos tratamentos onde plantas estavam presentes (Figuras 5A e 5B) ($P < 0,05$).

Com relação a riqueza da comunidade microbiana dos solos de TPA, também se verificou diferenças entre os tratamentos. Os tratamentos contendo os genótipos feijoeiro apresentaram maior riqueza quando comparadas com o solo controle (sem plantas) ($P < 0,05$). O mesmo padrão foi observado para o solo SA, que também apresentou maior riqueza nos tratamentos com plantas (Figuras 5C e 5D) ($P < 0,05$). Desta forma, é possível notar como a planta pode influenciar positivamente a comunidade microbiana, tanto na diversidade quanto na riqueza de espécies. De acordo com Mendes et al. (2014) e Giles et al. (2018), as raízes das plantas são capazes de recrutar microrganismos através da produção e liberação de exsudados, que possuem na sua composição fontes simples de carbono e também são capazes de modificar as condições químicas do solo. Esta compreensão, das mudanças na função e diversidade, é muito dependente da biodisponibilidade dos compostos disponíveis (JACOBSEN et al., 2014).

Figura 5 – Índice de Shannon (A e B) e taxa S (C e D) para avaliação da diversidade e riqueza da comunidade microbiana em solos de Terra Preta da Amazônia (TPA) e solos de agricultura (SA) sob a influência de dois genótipos de feijão (BAT 477 e DOR 364) e seus respectivos controles (ausência de planta). Letras minúsculas representam diferença significativa entre os tratamentos de cada tipo de solo utilizando o teste de médias t de student ($P < 0,05$)



7.2.3 Composição da comunidade bacteriana

Aproximadamente 1.050.000 de sequências foram geradas a partir de 30 amostras utilizando o sequenciamento de amplicon do gene 16S rRNA de bactéria. De acordo com a versão 128 do Banco de Dados SILVA (QUAST et al., 2012), foram observados 37 filos, 33 pertencentes ao domínio *Bacteria* e apenas 4 pertencentes ao domínio *Archaea*. De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que a composição da comunidade microbiana do solo foi alterada de acordo com os tratamentos utilizados.

No solo de TPA, o filo Actinobacteria representou 26,05% da composição total da comunidade microbiana. Tal fato pode estar ligado com a preferência desse grupo por altos teores de M.O e pela alta disponibilidade de nutrientes. No solo SA, a abundância deste filo foi de 18,08%. Possivelmente, as práticas agrícolas adotadas nesta área, como por exemplo o preparo do solo que visa incorporação de material orgânico, possa ter distúrbios e acelerar o processo de decomposição do material orgânico, o que no fim afetou negativamente membros de Actinobacteria. Cabe ressaltar, que este filo é uma das maiores unidades taxonômicas dentre as principais linhagens atualmente reconhecidas no domínio *Bacteria* (LUDWIG et al., 2012). Além disso, diversos fatores podem afetar estes organismos, tais como pH do solo, M.O e a disponibilidade de nutrientes (BRYANT et al., 2007; BARKA et al., 2016). De acordo com Barka et al. (2016), o filo de Actinobacteria se adapta a uma ampla gama de ambientes, sendo mais abundantes em solos ricos em matéria orgânica, como os solos utilizados do presente estudo. As Actinobacterias realizam a decomposição e utilização de compostos orgânicos recalcitrantes, como celulose, lignina e quitina que podem ser usadas em condições abióticas desfavoráveis do solo (DELGADO-BAQUERIZO et al., 2017).

O filo de Proteobacteria, no solo de TPA apresentou uma abundância relativa de 11,85%, enquanto que o solo de agricultura foi de 16,14%. Assim como o filo Actinobacteria, Proteobacteria é um dos mais abundantes em solos, abrangendo um enorme nível de diversidade morfológica, fisiológica e metabólica, e apresentando grande importância para os ciclos globais de carbono, nitrogênio e enxofre (KERSTERS et al., 2006). Muitos membros de Proteobacteria são classificados como bactérias promotoras de crescimento de plantas, que são capazes de promover o desenvolvimento vegetal (ex: principalmente o sistema radicular), e conseqüentemente favorecer a aquisição de nutrientes (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009). Estudos anteriores mostram que este filo abriga grande variedade de microrganismos copiotróficos, que possuem seu crescimento favorecido em ambientes com altas disponibilidades de nutrientes (DAI et al., 2018), como é verificado no solo TPA. Os solos de SA, embora possuam baixa disponibilidade de nutrientes, estes recebem periodicamente adubações para a sustentação da produção agrícola, o que pode influenciar significativamente esta comunidade. Além disso, acredita-se que as Proteobacteria possuam um papel crucial em ambientes oligotróficos devido à sua capacidade de degradar polissacarídeos (VIKRAM et al., 2016; ZHANG et al., 2017).

Em relação ao filo Thaumarchaeota, verificou-se que o solo de TPA apresentou uma maior abundância deste filo (30,22% da comunidade microbiana), enquanto que no solo SA, a abundância deste filo foi de 13,60%. Cabe ressaltar que Thaumarchaeota é um filo proposto dentro do domínio *Archaea* (BROCHIER-ARMANET et al., 2008; SPANG et al., 2010). Os membros deste filo são caracterizados como quimioautótrofos capazes de oxidar NH_3 , sendo algumas das espécies mixotróficas ou heterotróficas (MUSSMANN et al., 2011). De acordo com estudo realizado por Cao et al. (2012), a estrutura das comunidades de arqueias em amostras de solo, (pH variando de 4 a 8,2), é dominada por membros deste filo. Diversas pesquisas, revelaram uma série de fatores que podem afetar a distribuição deste grupo, incluindo o pH do solo (NICOL et al., 2008; BENGTSON et al., 2012; CAO et al., 2012), clima e cobertura vegetal (ANGEL et al., 2009) e relação C/N (BATES et al., 2011).

O filo Acidobacteria, no solo de TPA, apresentou 8,53% de abundância relativa, enquanto no solo de SA 14,80%. Este grupo, é considerado um dos mais abundantes, mas notavelmente o conhecimento do papel dos diversos membros deste grupo no funcionamento dos ecossistemas terrestres permanece rudimentar (KIELAK et al., 2016). Este filo representa em média 20% da comunidade microbiana em diversos ambientes (JANSSEN, 2006). A dominância de Acidobacteria, em termos de abundância e atividade, sugere que elas têm um papel importante nos ciclos biogeoquímicos e também no funcionamento dos ecossistemas (LEE et al., 2008; WAKELIN et al., 2010). A presença de uma ampla gama de transportadores para a captação de nutrientes, também sugere uma vantagem adaptativa das Acidobacteria a ambientes oligotróficos (KIELAK et al., 2016), que normalmente são condições encontradas em solos de agricultura em ambientes de clima tropical. Além disso, Navarrete et al. (2013) verificaram que este filo responde a outros atributos químicos do solo, que não o pH, tais como Al, Ca, Mg, K, e micronutrientes.

O filo Firmicutes correspondeu a 5,88% da abundância relativa em solo de TPA, e 5,74% em solo SA. Este filo já foi descrito em áreas de agricultura (BAKKER et al., 2015) e solos de TPA (NAVARRETE et al., 2010). A maioria dos membros que representam o filo Firmicutes possui notável resistência à dessecação e extremos de variação ambiental (BATTISTUZZI; HEDGES, 2009). Segundo Rodrigues et al. (2013), é conhecido que estes microrganismos prosperam em ambientes onde o carbono está altamente disponíveis, como é verificado nos solos do presente estudo com alto teor de matéria orgânica.

O filo Chloroflexi, representou 5,48% da abundância em solo de TPA e 15,47% em solos de SA. Este filo já foi verificado em solo rizosférico (BULGARELLI et al., 2012), e parece ser influenciado pelo pH e conteúdo de N orgânico (ORR et al., 2015). Além disso, os

filos Chloroflexi está relacionados à degradação da matéria orgânica derivada de plantas (YAMADA et al., 2005; WANG et al., 2018). Assim, a dominância desses grupos microbianos pode desempenhar um papel fundamental na degradação de M.O.

No solo de TPA, a abundância do filo Verrucomicrobia foi de 2,85%, e no solo SA foi de 3,82%. Grande número de microrganismos pertencentes ao filo Verrucomicrobia são de vida livre (GRIFFITHS; GUPTA, 2007) facultativa ou obrigatoriamente anaeróbico (CHIN et al., 2001), sacarolítico (JANSSEN, 1998) e oligotrófico (SENECHKIN et al., 2010). Informações sobre a composição, diversidade e distribuição geral de comunidades de Verrucomicrobia em uma ampla variedade de tipos de solo é escassa. No entanto, características ambientais que mudam em relação ao tempo revela que uma quantidade significativa da variação na abundância de Verrucomicrobia pode ser explicada por alterações no teor de umidade do solo (BUCKLEY et al., 2001).

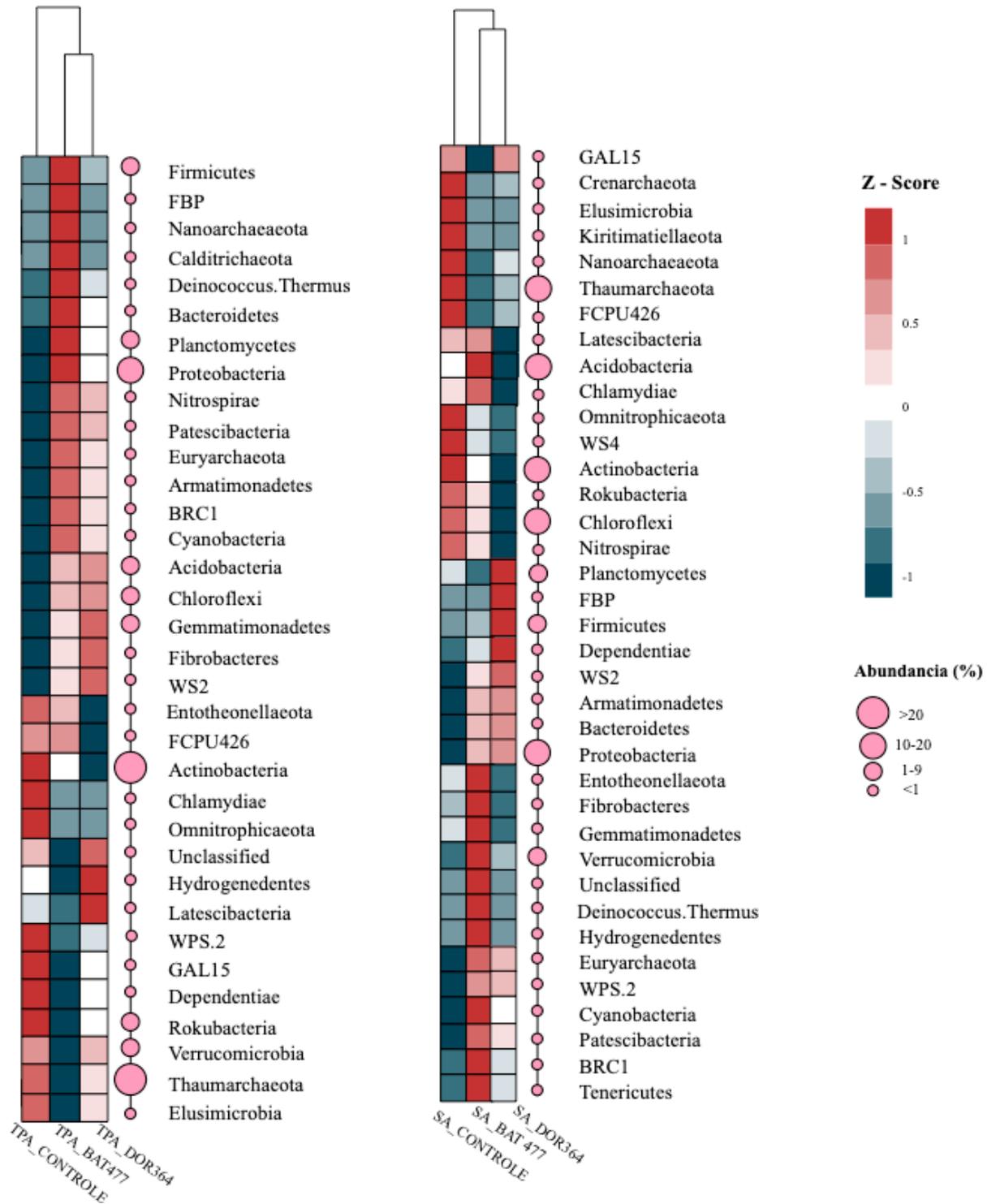
No solo de TPA, o filo Gemmatimonadetes representou 1,40%, e no solo de SA 1,55%. As bactérias pertencentes ao filo Gemmatimonadetes são frequentemente encontradas em solos, e representam cerca de 2% das comunidades bacterianas (JANSSEN, 2006). No entanto, alguns estudos indicam que este filo pode variar de 0,2 a 6,5%; no entanto, existem ainda poucas informações na literatura a respeito dos membros pertencente a este filo e sobre sua ecologia (DEBRUYN et al., 2011). Segundo Debruyne et al. (2011), o único parâmetro que se correlacionou significativamente com a abundância de Gemmatimonadetes é a umidade, sendo que as maiores abundâncias são observadas durante os períodos com menor umidade do solo. Outros estudos relataram maiores abundâncias relativas de Gemmatimonadetes em solos próximos ao pH neutro em relação à solos ácidos (MENDEZ et al., 2008; LAUBER et al., 2009).

No solo de TPA, Rokubacteria apresentou abundância de 1,81% e no solo SA 0,47%. Sua baixa abundância foi verificada em outros trabalhos (LIN et al., 2012; FIGUEROLA et al., 2015; BECRAFT et al., 2017), assim como no presente estudo. Segundo Kroeger et al. (2018), uma meta-análise deste filo, disponíveis no NCBI, revelaram várias características genômicas que suportam o potencial de metabolizar hidrocarbonetos de cadeias longas, e oxidação beta de ácidos graxos. Além disso, Rokubacteria foi descrita com potencial de oxidar metanol (BUTTERFIELD et al., 2016). Segundo Kroeger et al. (2018), as análises indicam um metabolismo diversificado dentro desse filo, incluindo uma ampla variedade de fontes de carbono que variam de substratos gasosos a hidrocarbonetos complexos.

Para o filo Planctomycetes, o solo de TPA apresentou 3,82% e o solo SA a abundância foi de 6,43%. A maioria dos isolados já obtidos são quimiorganotróficos aeróbicos ou facultativos de crescimento lento, especializados no metabolismo de carboidratos (FUERST et al., 1995; PEARSON et al., 2003; WARD et al., 2006). O entendimento sobre Planctomycetes é limitado pelo fato de que apenas alguns desses organismos foram caracterizados através de cultivo. Tal fato se torna evidente ao se observar que mais de 92% das 1.344 sequências de genes de 16S rRNA de Planctomycetes atualmente arquivadas no Ribosomal Database Project II, serem sequências de organismos não cultivados (COLE et al., 2005). Em estudo realizado Buckley et al. (2006), os autores observaram Planctomycetes membros correlacionaram-se com nitrato, assim como pode ter acontecido no SA em nosso estudo. Estes teores de $N-NO_3$, são em função da entrada de fertilizantes que ocorrem em solos de SA e de processos naturais ligados à ciclagem de nutrientes que ocorrem em ambos os solos. As diferenças na abundância e diversidade de Planctomycetes parecem ocorrer em escalas de tempo razoavelmente longas e, como resultado, provavelmente estão ligadas a mudanças nas características do solo que demoram a se recuperar em virtude dos distúrbios causados pela agricultura (BUCKLEY et al., 2006).

Os demais filios representaram 2,12 % das sequências no solo de TPA, e para o solo SA, o restante representaram 3,64%. As alterações, observadas na composição da comunidade microbiana, podem ser explicadas como uma adaptação de comunidades dos sistemas de cultivo e compostos orgânicos recalcitrantes (WEI et al., 2018). Além disso, estudos com solos da região amazônica mostraram que as comunidades bacterianas foram influenciadas pelo uso da terra e características químicas dos metabólitos da vegetação (JESUS et al., 2009; NAVARRETE et al., 2010; LIMA et al., 2014).

Figura 6 – Heatmap representando a abundância de filos da comunidade microbiana em diferentes solos amazônicos e sob influência de genótipos de feijão (BAT 477 e DOR 364). As tonalidades de cores representam a abundância dos filos calculados pelo Z-Score. Os círculos representam à abundância relativa de cada filo em todas as amostras



Com base no Heatmap, foi possível observar a clusterização entre os tratamentos. De maneira geral, ocorreu um agrupamento dos tratamentos contendo plantas quando comparados com o controle (ausência de plantas), esta tendência foi observada nos dois tipos de solo. A diferença da comunidade que é recrutada em solo rizosférico mostra que a exsudação radicular é um forte fator modulador das comunidades das rizobactérias, onde vários taxa podem prosperar e se tornar altamente abundantes, enquanto outros membros da comunidade exibem baixa abundância (JONES et al., 2009), como foi observado neste trabalho. No trabalho desenvolvido por Mendes et al. (2014), a ordenação dos perfis taxonômicos também revelou uma separação entre amostras de *bulk soil* e do solo rizosférico, indicando uma mudança seletiva na estrutura da comunidade microbiana. A pressão seletiva da rizosfera na composição do microbioma é conhecida (BADRI et al., 2013). Segundo Bulgarelli et al. (2012), o tipo de solo define a composição das comunidades microbiana que habitam as raízes e os genótipos modulam os seus perfis em uma extensão limitada. Estes, podem fornecer uma série de funções benéficas para a planta hospedeira, em especial a aquisição de nutrientes (MENDES et al., 2014).

7.2.4 Microrganismos solubilizadores de fósforo

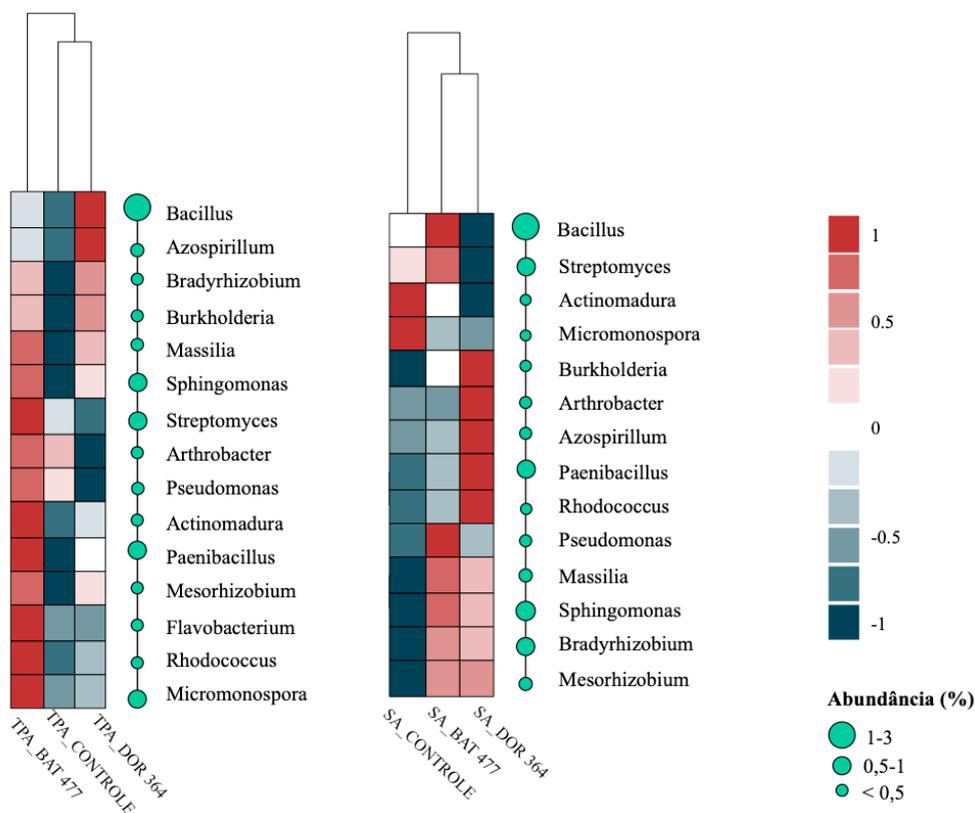
Com base nos dados de sequenciamento de amplicon do gene 16S rRNA, foi possível investigar alguns dos grupos descritos na literatura que solubilizam P. Tais grupos estão presentes nos filos de Proteobacteria, Actinobacteria, e Firmicutes. Entre eles destacam-se os gêneros: *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Pseudoduganella*, *Duganella*, *Burkholderia*, *Variovorax*, *Telluria*, *Massilia*, *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Kurthia*, *Leifsonia*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Rhodanobacter*. A partir destas informações, foi construído um Heatmap destes grupos de interesse, para avaliação da abundância nos tratamentos do experimento (Figura 7). Os microrganismos que solubilizam P tendem a ser mais abundantes no solo rizosférico em ambos os solos. Pela clusterização, o tratamento BAT 477 se destacou mais dos outros tratamentos quando cultivado em solo com maior disponibilidade de nutrientes (TPA). No entanto, realizando um teste estatístico como análise complementar foi possível observar que, para alguns gêneros, ambos os genótipos se destacaram em relação ao controle.

No solo de agricultura, a clusterização ocorreu de forma a agrupar tratamentos contendo os genótipos, quanto à abundância destes gêneros. Dentre os gêneros descritos na literatura como solubilizadores de P, e verificados neste trabalho, o gênero *Bacillus*

pertencente ao filo Firmicutes, foi o gênero que apresentou maior abundância em ambos os solos. No trabalho de Zheng et al. (2019), este resultado também foi verificado entre os microrganismos solubilizadores. De acordo com Abiala et al. (2015) estes microrganismos promovem o crescimento de plantas e são capazes de se adaptar à diferentes condições encontradas no solo (ex: variação de temperatura, água e pH).

De maneira geral, plantas exsudam compostos com diferentes perfis químicos na região da rizosfera, causando mudanças nas comunidades microbianas desta região (ALVEY et al., 2003). Essa diferença entre os genótipos pode estar relacionada às diferenças na exsudação radicular, e provavelmente motivada pela quantidade e qualidade dos exsudatos radiculares em combinação com diferentes taxas de crescimento, utilização de substratos e habilidades competitivas dos gêneros de rizobactérias (PÉREZ-JARAMILLO et al., 2017).

Figura 7 – Heatmap mostrando a diferença de abundância entre os microrganismos solubilizadores de P, encontrados no solo de Terra Preta da Amazônia (TPA), e em solos de agricultura (SA), sob influência de duas variedades de feijão (BAT 477 e DOR 364) e na ausência de planta (controle). As tonalidades de cores estão relacionadas com a abundância relativa de cada gênero em cada área avaliada, calculadas através do z-score em cada tratamento. Os círculos são proporcionais à abundância relativa destes gêneros



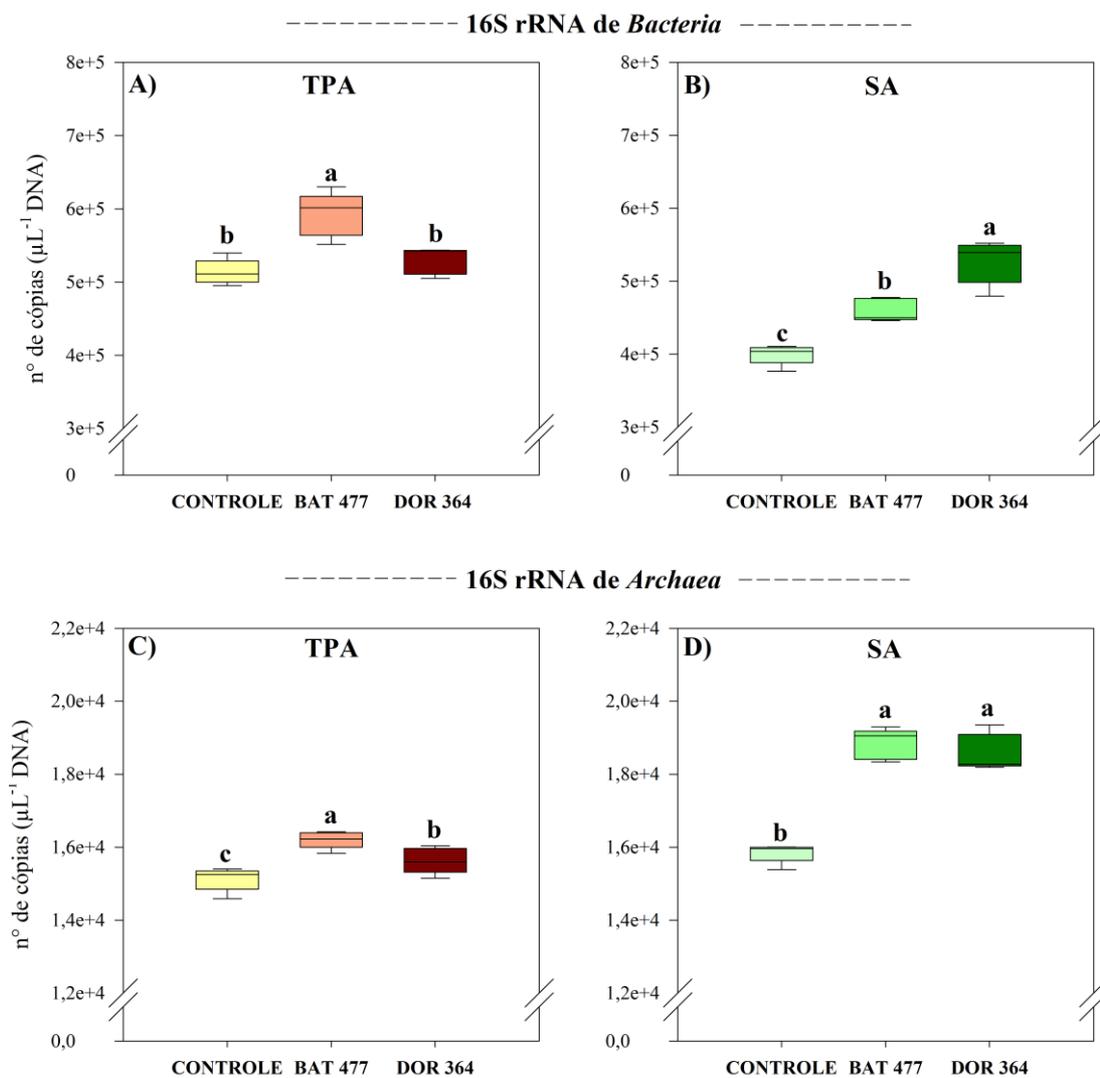
7.3 Abundância da comunidade *Archaea* e *Bacteria*

7.3.1 Análise de PCR em tempo real (qPCR)

A análise de qPCR foi realizada com o uso de uma curva padrão para cada um dos genes avaliados. De maneira geral, coeficiente de determinação das curvas foram superiores a de $r^2 = 0,96$ e eficiência foi superior a 98%. Para esta análise, foi realizado a padronização da quantidade de DNA das amostras extraídas do solo, e o valor final das quantificações foram expressas em número de cópias por microlitro de DNA. Nos solos de TPA, a abundância do gene de 16S rRNA de *Bacteria* foi maior no tratamento contendo o genótipo BAT 477, do que o tratamento com DOR 364 e controle, que não apresentaram diferença significativa entre si (Figura 8A). Para os solos de SA, o tratamento com o genótipo DOR 364 obteve a maior abundância, seguida do tratamento BAT 477, e por último o controle (Figura 8B). De modo geral, os resultados indicam mudanças na abundância da comunidade bacteriana na rizosfera em comparação com o *bulk soil*, embora a resposta dos genótipos tenha sido diferentes nos dois tipos de solo. Essa diferença, pode ter ocorrido devido a disponibilidade de nutrientes em cada um dos solos, que juntamente com a resposta de cada genótipo na assimilação de nutriente, podem estar relacionados com a qualidade dos exsudatos que são liberados, embora os exsudatos não tenham sido caracterizados no presente estudo. Os exsudatos radiculares são geralmente de baixo peso molecular e, portanto, facilmente decompostos (MARSCHNER et al., 2011). A liberação de exsudatos pelas raízes resulta em maior densidade microbiana e atividade metabólica na região da rizosfera do que na do *bulk soil* (NORTON; FIRESTONE, 1991; SODERBERG; BÅÅTH, 1998), pois estes compostos são capazes de estimular o crescimento microbiano e de atrair mais microrganismos do solo (MARSCHNER et al., 2011).

Para a comunidade de *Archaea*, foi possível verificar que em ambos os solos, os genótipos também influenciaram na abundância destes microrganismos, sendo que as maiores abundâncias foram observadas nos solos rizosféricos, e isso foi verificado nos dois tipos de solo. No entanto, foi possível observar que no solo de TPA o tratamento com o genótipo BAT 477 obteve a maior abundância (Figura 8C), e no solo de agricultura (Figura 8D), os tratamentos com os genótipos não apresentaram diferença significativa entre si. De acordo com Araujo et al. (2018), o pH do solo é principal fator modulador das comunidades de arqueias. Ainda, Tripathi et al. (2013) observaram que o pH domina a variação da diversidade e composição da comunidade em solos tropicais, o que explica haver maior abundância de arqueias na rizosfera uma vez que as raízes liberam H^+ acidificando o meio.

Figura 8 – Abundância dos genes marcadores filogenéticos *16S rRNA de Bacteria* (A) e (B) *16S rRNA de Archaea* (C) e (D) em solos de Terra Preta da Amazônia (TPA) (A) e (C), e em solo de agricultura (B) e (D), sob influência de dois genótipos de feijão (BAT 47 e DOR 364), e o controle (ausência de planta). Letras minúsculas representam diferença significativa entre os tratamentos em cada tipo de solo, utilizando o teste de médias t de student ($p < 0,05$)

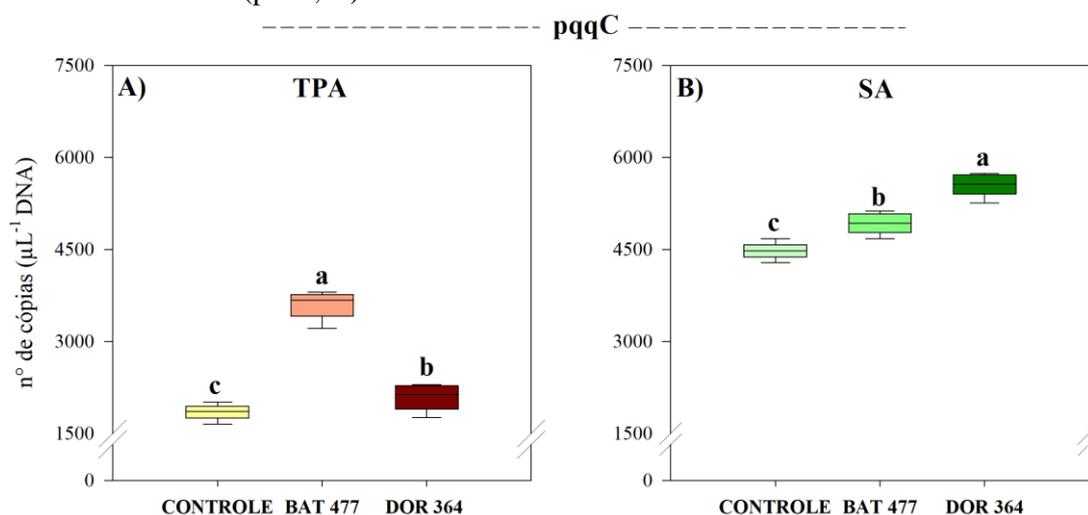


Para o gene *pqqC*, o gene foi mais abundante nos tratamentos contendo os genótipos de planta em ambos os solos. Este gene, presente em alguns grupos de gram negativas, é essencial para produção de ácido glucônico (De WERRA et al., 2009; ZHOU, et al., 2018), este ácido orgânico promove a solubilização do P inorgânico. Segundo Long et al. (2018) este gene já foi identificado em diversos microrganismos incluindo Proteobactérias, Actinobactérias, Firmicutes, Cianobactérias, Verrucomicrobia, Acidobacteriales, Planctomycetes e até em algumas arqueias, embora pouco se saiba a respeito.

No solo de TPA, que possui maior disponibilidade de nutrientes, ambos os genótipos obtiveram maior abundância do gene *pqqC* em relação ao controle ($P < 0,05$). Para os tratamentos contendo planta, verificou-se que no solo de TPA o tratamento com o genótipo BAT 477 destacou-se em relação ao DOR 364 ($P < 0,05$).

A resposta destes genótipos em solo de agricultura mostrou que o tratamento DOR 364 apresentou maior abundância em relação ao tratamento com o genótipo BAT 477 ($P < 0,05$). Pode ser que isso ocorra porque a planta que possui menor eficiência na utilização de P (DOR 364), utilize de mecanismos que recrutem mais microrganismos do que a que já possui uma maior eficiência na utilização deste nutriente (PÉREZ-JARAMILLO et al., 2017). Além disso, foi verificado por Long et al. (2018), que a baixa disponibilidade de P aumenta a abundância de genes *pqqC*, indicando diferenças na resposta das bactérias portadoras de *pqqC* à adição de fosfato.

Figura 9 – Abundância do gene funcional *pqqC* em solos de TPA (A) e SA (B), sob influência de dois genótipos de feijão (BAT 477 e DOR 364), e o controle (ausência de plantas). Letras minúsculas representam diferença significativa entre os tratamentos de cada tipo de solo utilizando o teste de médias t de student ($p < 0,05$)



Para o gene *phoD*, a abundância foi significativamente maior, verificada pelo, nos tratamentos contendo os genótipos do que no tratamento controle, sendo o genótipo DOR 364 o que apresentou a maior abundância do gene ($P < 0,05$). Essa tendência foi verificada em ambos os solos, como pode ser observado na Figura 10.

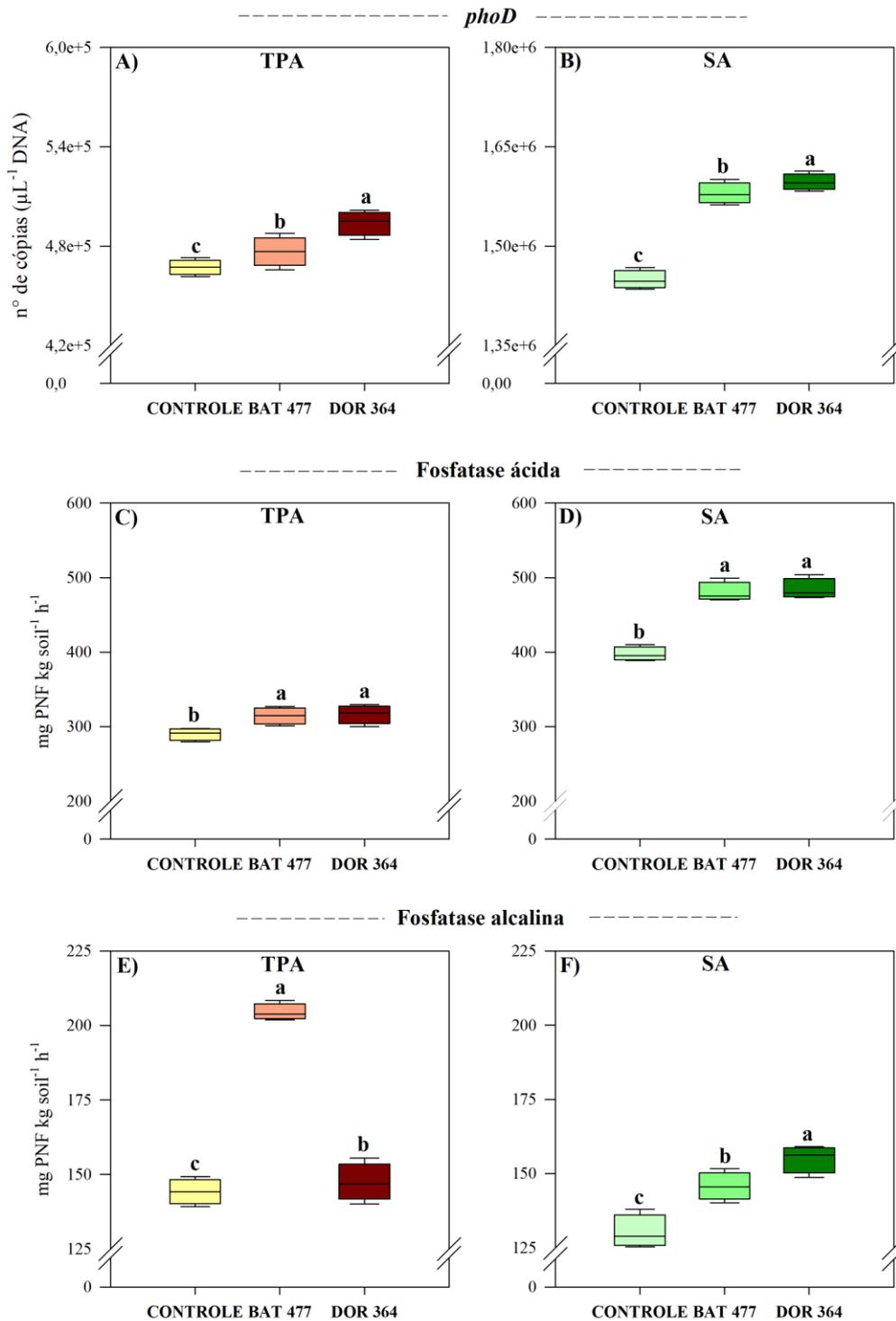
7.3.2 Enzimas

Para as fosfatases ácidas (Figura 10C e 10D), ambos os tratamentos contendo os genótipos apresentaram maior atividade enzimática em relação ao tratamento controle, enquanto os genótipos não apresentaram diferença entre si. Para a fosfatase alcalina, os tratamentos contendo os genótipos também se destacaram em relação ao controle, porém, a atividade enzimática teve diferentes respostas conforme o genótipo e o tipo de solo, como pode ser verificado na Figura 10E e 10F.

Essa maior atividade das enzimas e abundância do gene nos tratamentos contendo os genótipos, ocorre porque, como foi já discutido anteriormente, os microrganismos são recrutados para o ambiente rizosférico devido a maior disponibilidade de fontes de C de fácil degradação (MARSCHNER et al., 2011). Quando ocorre a deficiência de P, o gene que regula a expressão das enzimas fosfomonoesterases são ativados, induzindo a produção destas enzimas (WANNER, 1996; VERSHININA; ZNAMENSKAYA, 2002; APEL et al., 2007). Estas enzimas promovem a mineralização do P orgânico, e os fosfomonoesteres podem representar até 90% do P orgânico nos solos (CONDRON et al., 2005).

Além disso, como os sistemas agrícolas recebem periodicamente adubações fosfatadas, estas podem afetar a abundância, a diversidade e o funcionamento da comunidade microbiana (FANIN et al., 2015; FRASER et al., 2015), e conseqüentemente a expressão do gene *phoD*. Este *input* de P, pode ser um dos fatores que explique a diferença da atividade enzimática da fosfatase alcalina dos dois genótipos, apresentando comportamento diferentes para os dois solos pesquisados.

Figura 10 – Abundância do gene funcional *phoD* em solos de TPA (A) e SA (B), potencial da atividade enzimática fosfatase ácida em solo TPA (C) e SA (D), e potencial da atividade da enzima fosfatase alcalina em solo de TPA (E) e SA (F), sob influência de dois genótipos de feijão (BAT 477 e DOR 364), e o controle (ausência de plantas). Letras minúsculas representam diferença significativa entre os tratamentos de cada tipo de solo utilizando o teste de médias t de student ($p < 0,05$)



8. CONCLUSÕES

Os atributos químicos do solo influenciaram significativamente a estrutura da comunidade bacteriana, principalmente os altos teores de P em TPA, e os baixos teores de K em ambos os solos.

Os genótipos de feijão aumentaram a riqueza e diversidade das espécies em ambos os tipos de solo. Provavelmente, este aumento da riqueza e diversidade de espécies se deve a liberação de fontes de carbono de fácil degradação.

A composição da comunidade bacteriana variou conforme o tipo de solo. Na composição em solo de TPA os grupos que apresentaram maiores abundâncias foram: Thaumarchaeota 30,58%, Actinobacteria 25,95%, Acidobacteria 14,86%, Proteobacteria 11,84%. No solo de SA foram: Actinobacteria 18,15%, Proteobacteria 16,20%, Chloroflexi, 15,54% e Thaumarchaeota 13,65%. Dentre os tratamentos, Os genótipos estimularam diferencialmente a microbiota em sua rizosfera.

De modo geral, a abundância de *Archaea* e *Bacteria* foi maior em solo rizosférico do que em *bulk soil*, independente do tipo de solo. O genótipo BAT 477 obteve maiores resultados em relação a abundância *Archaea* e *Bacteria*, do gene *pqqC* e da atividade da fosfatase alcalina em relação ao genótipo DOR 364 no solo de TPA. No entanto, o genótipo DOR 364 se destacou mais em SA quanto à abundância de fosfatase alcalina, do gene *phoD* e *pqqC*. Essas diferenças podem ser dadas devido à perfis químicos dos genótipos quanto a exsudação radicular, que podem variar conforme a disponibilidade de nutrientes no solo.

Tanto os microrganismos solubilizadores quanto os mineralizadores de P foram mais abundantes em solo rizosférico, indicando que as plantas possuem grande efeito modulador da comunidade bacteriana. Embora os exsudatos não tenham sido avaliados, foi possível verificar que estes possuem grande potencial modulador. No entanto, mais estudos precisam ser realizados a respeito da quantidade e qualidade (composição) destes exsudatos.

REFERÊNCIAS

- ALVARES, C. A. et al. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013.
- ALVEY, S. et al. Cereal/legume rotation effects on rhizosphere bacterial community structure in West African soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 37, n. 2, p. 73-82, 2003.
- AMES, B. N. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. **Methods in Enzymology**, v. 8, p. 115-118, 1966.
- AN, R.; MOE, L. A. Regulation of pyrroloquinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase activity in the model rhizosphere-dwelling bacterium *Pseudomonas putida* KT2440. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, p. 4955-4964, 2016.
- ANGHINONI, I.; BISSANI, C. A. Fósforo e adubos fosfatados. In: BISSANI, C. A. et al. **Fertilidade dos solos e manejo da adubação de culturas**. Porto Alegre: Genesis, 2004. p. 117-138.
- ANGEL, R. et al. Biogeography of soil archaea and bacteria along a steep precipitation gradient. **The ISME Journal**, v. 4, n. 4, p. 553-563, 2010.
- APEL, A. K. et al. Phosphate control of *phoA*, *phoC* and *phoD* gene expression in *Streptomyces coelicolor* reveals significant differences in binding of PhoP to their promoter regions. **Microbiology**, v. 153, n. 10, p. 3527-3537, 2007.
- ARAÚJO, A. S. F. D. et al. Archaea diversity in vegetation gradients from the Brazilian Cerrado. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 522-528, 2018.
- BADRI, Dayakar V. et al. Application of natural blends of phytochemicals derived from the root exudates of *Arabidopsis* to the soil reveal that phenolic-related compounds predominantly modulate the soil microbiome. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 7, p. 4502-4512, 2013.
- BAKKER, M. G. et al. Impacts of bulk soil microbial community structure on rhizosphere microbiomes of *Zea mays*. **Plant and Soil**, v. 392, n. 1-2, p. 115-126, 2015.
- BARKA, E. A. et al. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1-43, 2016.
- BATES, S. T. et al. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. **The ISME Journal**, v. 5, p. 908-917, 2011.
- BATTISTUZZI, F. U.; HEDGES, S. B. A major clade of prokaryotes with ancient adaptations to life on land. **Molecular Biology and Evolution**, v. 26, n. 2, p. 335-343, 2009.
- BECRAFT, E. D. et al. Rokubacteria: genomic giants among the uncultured bacterial phyla. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2264, 2017.
- BENGTSON, P.; STERNNGREN, A. E.; ROUSK, J. Archaeal abundance across a pH gradient in an arable soil and its relationship to bacterial and fungal growth rates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 5906-5911, 2012.

BERG, G. et al. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 7, p. 3328-3338, 2002.

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

BOUASRIA, A. et al. Changes in root-associated microbial communities are determined by species-specific plant growth responses to stress and disturbance. **European Journal of Soil Biology**, v. 52, p. 59-66, 2012.

BOUGHNER, L. A.; SINGH, P. Microbial ecology: Where are we now? **Postdoc Journal: A Journal of Postdoctoral Research and Postdoctoral Affairs**, v. 4, n. 11, p. 3-17, 2016.

BOWMAN, R. A.; COLE, C. V. An exploratory method for fractionation of organic phosphorus from grassland soils. **Soil Science**, v. 125, n. 2, p. 95-101, 1978.

BRADY, N. C.; WEIL, R. R. **The nature and properties of soils**. 11 ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996.

BRINCK, J. W. World resources of phosphorus. **Ciba Foundation Symposium**, v. 57, p. 23-48, 1977.

BROCHIER-ARMANET, C. et al. Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 245-252, 2008.

BRODY, J. R.; KERN, S. E. Sodium boric acid: atriz-less, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, v. 36, p. 214-216, 2004.

BRYANT, D. A. et al. Candidatus *Chloracidobacterium thermophilum*: an aerobic phototrophic acidobacterium. **Science**, v. 317, n. 5837, p. 523-526, 2007.

BUCKLEY, D. H. et al. Diversity of Planctomycetes in soil in relation to soil history and environmental heterogeneity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 4522-4531, 2006.

BUCKLEY, D. H.; SCHMIDT, T. M. Environmental factors influencing the distribution of rRNA from Verrucomicrobia in soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 35, n. 1, p. 105-112, 2001.

BULGARELLI, D. et al. Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota. **Nature**, v. 488, n. 7409, p. 91-95, 2012.

BÜNEMANN, E. K. Assessment of gross and net mineralization rates of soil organic phosphorus. A review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 89, p. 82-98, 2015.

BÜNEMANN, E. K. et al. Phosphorus dynamics in a highly weathered soil as revealed by isotopic labeling techniques. **Soil Science Society of America Journal**, v. 68, n. 5, p. 1645-1655, 2004.

BUTTERFIELD, C. N. et al. Proteogenomic analyses indicate bacterial methylotrophy and archaeal heterotrophy are prevalent below the grass root zone. **PeerJ**, v. 4, p. e2687, 2016.

CAO, P. et al. Distribution and diversity of archaeal communities in selected Chinese soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 80, p. 146-158, 2012.

CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, n. 5, p. 335, 2010.

CAPORASO, J. G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 108, p. 4516-4522, 2011. Suppl. 1.

CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D.; **Microbiologia do solo**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ, 2016.

CHAPARRO, J. M. et al. Root exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. **Plos One**, v. 8, p. 55731-55735, 2013.

CHIN, K. J.; LIESACK, W.; JANSSEN, P. H. *Opitutus terrae* gen. nov., sp. nov., to accommodate novel strains of the division Verrucomicrobia isolated from rice paddy soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 1965-1968, 2001.

CLARRIDGE, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 840-862, 2004.

CLOVER, M. W.; MALLARINO, A. P. Corn and soybean tissue potassium content responses to potassium fertilization and relationships with grain yield. **Soil Science Society of America Journal**, v. 77, n. 2, p. 630-642, 2013.

COLE, J. R. et al. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. D294-D296, 2005. Suppl. 1.

COLE, J. R. et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. D633-D642, 2013. Suppl. 1.

CONDRON, L. M.; TURNER, B. L.; CADE-MENUN, B. J. Chemistry and dynamics of soil organic phosphorus. In: SIMS, J. T.; SHARPLEY, A. N. **Phosphorus: Agriculture and the environment**. Madison: ASA; CSSA; SSSA, 2005. Chap. 4, p. 87-122. (Agronomy Monograph, 46).

CORDELL, D.; DRANGERT, J.; WHITE, S. The story of phosphorus: global food security and food for thought. **Global Environmental Change**, v. 19, n. 2, p. 292-305, 2009.

CORDELL, D.; WHITE, S. Life's bottleneck: sustaining the world's phosphorus for a food secure future. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 39, p. 161-188, 2014.

CORRELL, D. L. Phosphorus: a rate limiting nutrient in surface waters. **Poultry Science**, v. 78, n. 5, p. 674-682, 1999.

CUI, H. et al. The combined effects of cover crops and symbiotic microbes on phosphatase gene and organic phosphorus hydrolysis in subtropical orchard soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 82, p. 119-126, 2015.

CALLAHAN, B. J.; MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. P. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. **The ISME Journal**, v. 11, n. 12, p. 2639-2643, 2017.

DAI, Z. et al. Long-term nitrogen fertilization decreases bacterial diversity and favors the growth of Actinobacteria and Proteobacteria in agro-ecosystems across the globe. **Global Change Biology**, v. 24, n. 8, p. 34-52-3461, 2018.

DANESHGAR, S. et al. The potential phosphorus crisis: resource conservation and possible escape technologies: a review. **Resources**, v. 7, n. 2, p. 37, 2018.

DE SOUZA, R. C. et al. Analysis of a bacterial community structure and the diversity of phzF gene in samples of the Amazonian Dark Earths cultivated with cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Wald]. **African Journal of Agricultural Research**, v. 13, n. 38, p. 1980-1989, 2018.

DE WERRA, P. et al. Role of gluconic acid production in the regulation of biocontrol traits of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 4162-4174, 2009.

DEBRUYN, J. M. et al. Global biogeography and quantitative seasonal dynamics of Gemmatimonadetes in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 17, p. 6295-6300, 2011.

DELGADO-BAQUERIZO, M. et al. Microbial richness and composition independently drive soil multifunctionality. **Functional Ecology**, v. 31, n. 12, p. 2330-2343, 2017.

DESMIDT, E. et al. Global phosphorus scarcity and full-scale P-recovery techniques: a review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 4, p. 336-384, 2015.

DUNBAR, J. et al. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 3035-3045, 2002.

EDGAR, R. C. et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**, v. 27, n. 16, p. 2194-2200, 2011.

FANIN, N. et al. Interactive effects of C, N and P fertilization on soil microbial community structure and function in an Amazonian rain forest. **Functional Ecology**, v. 29, n. 1, p. 140-150, 2015.

FERNANDES, R. B. A. et al. Quantificação de óxidos de ferro de Latossolos brasileiros por espectroscopia de refletância difusa. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, n. 2, p. 245-257, 2004.

FIGUEROLA, E. L. M. et al. Crop monoculture rather than agriculture reduces the spatial turnover of soil bacterial communities at a regional scale. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 678-688, 2015.

FIXEN, P. Phosphorus: world wide supplies and efficiency. In: MANITOBA AGRONOMISTS CONFERENCE, 2009, Winnipeg, Manitoba. Winnipeg, Manitoba: INPI, 2009.

FOSTER, R. C. The ultrastructure of the rhizoplane and rhizosphere. **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, n. 1, p. 211-234, 1986.

FRASER, T. D. et al. Soil bacterial phoD gene abundance and expression in response to applied phosphorus and long-term management. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 88, p. 137-147, 2015.

FRASER, T. et al. Linking alkaline phosphatase activity with bacterial *phoD* gene abundance in soil from a long-term management trial. **Geoderma**, v. 257, p. 115-122, 2015.

FUERST, J. A. The planctomycetes: emerging models for microbial ecology, evolution and cell biology. **Microbiology**, v. 141, n. 7, p. 1493-1506, 1995.

GENG, J. J. et al. Distribution of phosphine and microorganisms in partial sediments of Lake Taihu. **Biogeochemistry**, v. 76, p. 283-298, 2005.

GILES, C. D. et al. Phosphorus acquisition by citrate- and phytase- exuding *Nicotiana tabacum* plant mixtures depends on soil phosphorus availability and root intermingling. **Physiologia Plantarum**, 2018.

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

GOLDSTEIN, A. H.; ROGERS, R. D.; MEAD, G. Separating phosphate from ores via bioprocessing. **Biotechnology**, v. 11, p. 1250-1254, 1993.

GOLDSTEIN, A. H. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria. **Biological Agriculture and Horticulture**, v. 12, p. 185-193, 1995.

GRIFFITHS, E.; GUPTA, R. S. Phylogeny and shared conserved inserts in proteins provide evidence that Verrucomicrobia are the closest known free-living relatives of chlamydiae. **Microbiology**, v. 153, n. 8, p. 2648-2654, 2007.

GRIGGS, D. et al. Policy: Sustainable development goals for people and planet. **Nature**, v. 495, n. 7441, p. 305, 2013.

GUSTAFSSON, J. P.; MWAMILA, L. B.; KERGOAT, K. The pH dependence of phosphate sorption and desorption in Swedish agricultural soils. **Geoderma**, v. 189, p. 304-311, 2012.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.; RYAN, P. **PAST - Palaeontological statistics**. València, ES: Universitat de València, 2001. Disponível em: www.uv.es/~pardomv/pe/2001_1/past/pastprog/past.pdf. Acesso em: 25 jul. 2018.

HAN, C. et al. Production and emission of phosphine gas from wetland ecosystems. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, n. 9, p. 1309-1311, 2010.

HAN, S. H. et al. Inactivation of *pqq* genes of *Enterobacter intermedium* 60-2G reduces antifungal activity and induction of systemic resistance. **FEMS Microbiology Letters**, v. 282, p. 140-146, 2008.

HANG, J. et al. 16S rRNA gene pyrosequencing of reference and clinical samples and investigation of the temperature stability of microbiome profiles. **Microbiome**, v. 2, n. 1, p. 31, 2014. DOI: 10.1186/2049-2618-2-31.

HINSINGER, P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. **Plant and Soil**, v. 273, p. 173-195, 2001.

HOFFLAND, E.; FINDENEGG, G. R.; NELEMANS, J. A. Solubilization of rock phosphate by rape. **Plant and Soil**, v. 113, n. 2, p. 155-160, 1989.

HSU, P. C. L. et al. HemX is required for production of 2-ketogluconate, the predominant organic anion required for inorganic phosphate solubilization by *Burkholderia* sp. HA185. **Environmental Microbiology Reports**, v. 7, p. 918–928, 2015.

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

JASINSKI, S. M. **Phosphate Rock**, USGS Mineral Commodities Summary, February 2019. Available online: http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/phosphate_rock/. Acesso em: 10 nov. 2019.

JACOBSEN, C. S.; HJELMSØ, M. H. Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 15-20, 2014.

JANSSEN, P. H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1719-1728, 2006.

JANSSEN, P. H. Pathway of glucose catabolism by strain VeGlc2, an anaerobe belonging to the *Verrucomicrobiales* lineage of bacterial descent. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4830-4833, 1998.

JESUS, E. C. et al. Changes in land use alter structure of bacterial communities in western amazon soils. **The ISME Journal**, v. 3, p. 1004-1011, 2009.

JONES, D. L.; NGUYEN, C.; FINLAY, R. D. Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil-root interface. **Plant and Soil**, v. 321, n. 1-2, p. 5-33, 2009.

JONES, D. L.; OBURGER, E. Solubilization of phosphorus by soil microorganisms. In: BÜNEMANN, E.; OBERSON, A.; FROSSARD, E. (Ed.). **Phosphorus in action**. Berlin: Springer Publishing, 2011. p. 169-198.

JUMA, N. G.; TABATABAI, M. A. Comparison of kinetic and thermodynamic parameters of phosphomonoesterases of soils and of corn and soybean roots. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 20, p. 533–539, 1988.

KAMH, M. et al. Mobilization of soil and fertilizer phosphate by cover crops. **Plant and Soil**, v. 211, p. 19-27, 1999.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; MUSARRAT, J. **Phosphate solubilizing microorganisms**. Chan: Springer, 2014. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-08216-5>.

KERSTERS, K. et al. Introduction to the Proteobacteria. In: DWARKIN, M. et al. (Ed.). **The Prokaryotes**. 3. ed. New York: Springer, 2006. p 3–37.

KIELAK, A. M. et al. The ecology of Acidobacteria: moving beyond genes and genomes. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 744, 2016.

KIMURA, H. et al. Selective phylogenetic analysis targeting 16S rRNA genes of hyperthermophilic archaea in the deep-subsurface hot biosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 7, p. 2110-2117, 2007.

- KLINDWORTH, A. et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, 2013. DOI: 10.1093/nar/gks808.
- KROEGER, M. E. et al. New biological insights into how deforestation in amazonia affects soil microbial communities using metagenomics and metagenome-assembled genomes. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1635, 2018.
- LAUBER, C. L. et al. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 15, p. 5111-5120, 2009.
- LAZALI, M. et al. Discrimination against 15 N among recombinant inbred lines of *Phaseolus vulgaris* L. contrasting in phosphorus use efficiency for nitrogen fixation. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 3, p. 199-204, 2014.
- LEE, S. H.; KA, J. O.; CHO, J. C. Members of the phylum Acidobacteria are dominant and metabolically active in rhizosphere soil. **FEMS Microbiology Letters**, v. 285, n. 2, p. 263-269, 2008.
- LIM, B. L. et al. Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. **The ISME Journal**, v. 1, p. 321-330, 2007.
- LIMA, A. B. et al. Amazonian dark earth and plant species from the amazon region contribute to shape rhizosphere bacterial communities. **Microbial Ecology**, v. 68, p. 1-14, 2014
- LIN, X. et al. Vertical stratification of subsurface microbial community composition across geological formations at the Hanford Site. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 414-425, 2012.
- LONG, X. E. et al. Phosphate levels influence the utilisation of rice rhizodeposition carbon and the phosphate-solubilising microbial community in a paddy soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 118, p. 103-114, 2018.
- LUDWIG, W. et al. Road map of the phylum Actinobacteria. In: BERGEY, D. H. **Bergey's manual® of systematic bacteriology**. New York: Springer, 2012. p. 1-28.
- LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, p. 541-556, 2009.
- MARILLEY, L.; ARAGNO, M. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. **Applied Soil Ecology**, v. 13, n. 2, p. 127-136, 1999.
- MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.; RENGEL, Z. Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis—model and research methods. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 5, p. 883-894, 2011.
- MAT HASSAN, H.; MARSCHNER, P.; MCNEILL, A.; TANG, C. Growth, P uptake in grain legumes and changes in rhizosphere soil P pools. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, p. 151-159, 2011.
- MENDES, I. D. C.; DOS REIS JUNIOR, F. B. **Microrganismos e disponibilidade de fósforo (P) nos solos: uma análise crítica**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. 24 p. (Documentos, 85).

MENDES, L. W. et al. Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. **The ISME Journal**, v. 8, n. 8, p. 1577-1587, 2014.

MENDES, L. W. et al. Influence of resistance breeding in common bean on rhizosphere microbiome composition and function. **The ISME Journal**, v. 12, n. 1, p. 212-224, 2018.

MENDEZ, M. O.; NEILSON, J. W.; MAIER, R. M. Characterization of a bacterial community in an abandoned semiarid lead-zinc mine tailing site. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 12, p. 3899-3907, 2008.

MEYER, J. B. et al. Pyrroloquinoline quinone biosynthesis gene pqqC, a novel molecular marker for studying the phylogeny and diversity of phosphate-solubilizing pseudomonads. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 20, p. 7345-7354, 2011.

MOREIRA, A.; CARVALHO, J. G. de; EVANGELISTA, A. R. Influência da relação cálcio:magnésio do corretivo na nodulação, produção e composição mineral da alfafa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 249-255, 1999.

MUSSMANN, et al. Thaumarchaeotes abundant in refinery nitrifying sludges express amoA but are not obligate autotrophic ammonia oxidizers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 108, p. 16771-16776, 2011.

NAIK, P. R.; et al. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 230, 2008.

NANNIPIERI, P. et al. Role of phosphatase enzymes in soil. In: BÜNEMANN, E.; OBERSON, A.; FROSSARD, E. (Ed.). **Phosphorus in action**. Berlin: Springer Publishing, 2011. p. 215-243.

NAVARRETE, A. A. et al. A molecular survey of the diversity of microbial communities in different amazonian agricultural model systems. **Diversity**, v. 2, p. 787-809, 2010.

NAVARRETE, A. A. et al. Acidobacterial community responses to agricultural management of soybean in Amazon forest soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 83, n. 3, p. 607-621, 2013.

NICOL, G. W. et al. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 10, p. 2966-2978, 2008.

NORTON, J. M.; FIRESTONE, M. K. Metabolic status of bacteria and fungi in the rhizosphere of ponderosa pine seedlings. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 1161-1167, 1991.

NURUZZAMAN, M. et al. Phosphorus benefits of different legume crops to subsequent wheat grown in different soils of Western Australia. **Plant and Soil**, v. 271, p. 175-187, 2005a.

NURUZZAMAN, M. et al. Phosphorus uptake by grain legumes and subsequently grown wheat at different levels of residual phosphorus fertiliser. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 56, p. 1041-1047, 2005b.

OBERSON, A.; JONER, E. J. Microbial turnover of phosphorus in soil. In: TURNER, B. L.; FROSSARD, E.; BALDWIN, D. S. (Ed.). **Organic phosphorus in the environment**. Wallingford: CAB International, 2005. p. 133-164.

OLANDER, L. P.; VITOUSEK, P. M. Biological and geochemical sinks for phosphorus in soil from a wet tropical forest. **Ecosystems**, v. 7, n. 4, p. 404-419, 2004.

ORR, C. H. et al. Effect of crop management and sample year on abundance of soil bacterial communities in organic and conventional cropping systems. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 1, p. 208-214, 2015.

OTIENO, N. et al. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 745, 2015.

PASEK, M. A.; SAMPSON, J. M.; ATLAS, Z. Redox chemistry in the phosphorus biogeochemical cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 111, n. 43, p. 15468-15473, 2014.

PAUL, E. A.; CLARK, F. E. **Soil microbiology and biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1988.

PAVINATO, P. S.; ROSOLEM, C. A. Disponibilidade de nutrientes no solo: decomposição e liberação de compostos orgânicos de resíduos vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 911-920, 2008.

PEARSON, A.; BUDIN, M.; BROCKS, J. J. Phylogenetic and biochemical evidence for sterol synthesis in the bacterium *Gemmata obscuriglobus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 100, n. 26, p. 15352-15357, 2003.

PEIFFER, J. A. et al. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 110, p. 6548-6553, 2013.

PÉREZ-JARAMILLO, J. E. et al. Linking rhizosphere microbiome composition of wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* to genotypic and root phenotypic traits. **The ISME Journal**, v. 11, n. 10, p. 2244-2257, 2017.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. 590-596, 2012.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2017.

RAGOT, S. A. et al. Total and active microbial communities and phoD as affected by phosphate depletion and pH in soil. **Plant and Soil**, v. 408, n. 1-2, p. 15-30, 2016.

RAGOT, S. A.; KERTESZ, M. A.; BÜNEMANN, E. K. phoD alkaline phosphatase gene diversity in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 20, p. 7281-7289, 2015.

RAIJ, B. V. et al. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agrônomo/Fundação IAC, 1997.

RAMÍREZ, M. et al. Two common bean genotypes with contrasting response to phosphorus deficiency show variations in the microRNA 399-mediated PvPHO2 regulation within the PvPHR1 signaling pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 4, p. 8328-8344, 2013.

RANDRIAMANANTSOA, L. et al. Gross organic phosphorus mineralization rates can be assessed in a Ferralsol using an isotopic dilution method. **Geoderma**, v. 257, p. 86-93, 2015.

RICHARDSON, A. et al. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and Soil**, v. 321, p. 305-339, 2009.

RODRÍGUEZ, H. et al. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. **Plant and Soil**, v. 287, n. 1-2, p. 15-21, 2006.

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

RODRIGUES, J. L. et al. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 110, n. 3, p. 988-993, 2013.

ROMANYÀ, J.; BLANCO-MORENO, J. M.; SANS, F. X. Phosphorus mobilization in low-P arable soils may involve soil organic C depletion. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 113, p. 250-259, 2017.

ROUSK, J. et al. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. **The ISME Journal**, v. 4, n. 10, p. 1340-1351, 2010.

SAKURAI, M. et al. Analysis of bacterial communities on alkaline phosphatase genes in soil supplied with organic matter. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 54, n. 1, p. 62-71, 2008.

SCHENK, M. K.; BARBER S. A. Root characteristics of corn genotypes as related to P uptake. **Agronomy Journal**, v. 71, p. 921-924, 1979.

SCHLESINGER, W. H.; BERNHARDT, E. S. **Biogeochemistry**: an analysis of global change. Hoboken: Academic Press, 2013.

SCHLOSS, P. D. et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009.

SENECHKIN, I. V. et al. Isolation and partial characterization of bacterial strains on low organic carbon medium from soils fertilized with different organic amendments. **Microbial Ecology**, v. 60, n. 4, p. 829-839, 2010.

SHARPLEY, A. N. Phosphorus cycling in unfertilized and fertilized agricultural soils 1. **Soil Science Society of America Journal**, v. 49, n. 4, p. 905-911, 1985.

SHARMA, S. B. et al. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 587, 2013.

SHEN, J. et al. Phosphorus dynamics: from soil to plant. **Plant Physiology**, v. 156, p. 997-1005, 2011.

SILVA, A. C. S. da et al. **Avaliação da fertilidade de Solos Antrópicos (Terra Preta de Índio) com ênfase na biodisponibilidade do fósforo**. 2006. Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2006.

SINGH, B. K. et al. Influence of grass species and soil type on rhizosphere microbial community structure in grassland soils. **Applied Soil Ecology**, v. 36, p. 147-155, 2007.

SJOBERG, A. Phosphate analysis of anthropic soils. **Journal of Field Archaeology**, v. 3, p. 447-454, 1976.

SÖDERBERG, K. H.; BÅÅTH, E. Bacterial activity along a young barley root measured by the thymidine and leucine incorporation techniques. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 10-11, p. 1259-1268, 1998.

SPANG, A. et al. Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota. **Trends in Microbiology**, v. 18, p. 331-340, 2010.

SPOHN, M.; KUZYAKOV, Y. Distribution of microbial-and root-derived phosphatase activities in the rhizosphere depending on P availability and C allocation—Coupling soil zymography with ¹⁴C imaging. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 67, p. 106-113, 2013.

SPOHN, M. et al. Distribution of phosphatase activity and various bacterial phyla in the rhizosphere of *Hordeum vulgare* L. depending on P availability. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 89, p. 44-51, 2015.

STAHL, D. A.; AMANN, R. Development and application of nucleic acid probes in bacterial systematics. In: STACHEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Chichester: John Wiley & Sons, 1991. p. 205-248.

SYERS, J. K.; JOHNSTON, A. E.; CURTIN, D. **Efficiency of soil and fertilizer phosphorus use**. Rome: FAO, 2008. 123 p. (Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin, 18).

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

TABATABAI, M. A. Soil enzymes. In: WEAVER, R.W.; ANGLE, S.; BOTTOMLEY, P. **Methods of soil analysis**. Part 2. Chemical and microbiological properties. Madison: SSSA, 1994. p. 903-947.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Titulo: **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 819 p.

TAN, H. et al. Long-term phosphorus fertilisation increased the diversity of the total bacterial community and the phoD phosphorus mineraliser group in pasture soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 6, p. 661-672, 2013.

TER BRAAK, C. J.; SMILAUER, P. **CANOCO reference manual and user's guide to Canoco for Windows**: software for canonical community ordination (version 4). Itaka: Micromputer Power: Centre for Biometry, 1998.

TRINGE, S. G.; HUGENHOLTZ, P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 442-446, 2008.

TRIPATHI, B. M. et al. pH dominates variation in tropical soil archaeal diversity and community structure. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 86, p. 303-311, 2003.

TURNER, T. R. et al. Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. **The ISME Journal**, v. 7, p. 2248–2258, 2013.

VACCARI, D. A. Phosphorus: a looming crisis. **Scientific American**, v. 300, n. 6, p. 54-59, 2009.

VAN KAUWENBERGH, S. J. **World phosphate rock reserves and resources**. Muscle Shoals: IFDC, 2010. 48 p.

VAN VUUREN, D. P.; BOUWMAN, A. F.; BEUSEN, A. H. Phosphorus demand for the 1970–2100 period: a scenario analysis of resource depletion. **Global Environmental Change**, v. 20, n. 3, p. 428-439, 2010.

VANCE, C. P. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. **Plant Physiology**, v. 127, p. 390-307, 2001.

VERSHININA, O. A.; ZNAMENSKAYA, L. V. The Pho regulons of bacteria. **Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 497-511, 2002.

VIKRAM, S. et al. Metagenomic analysis provides insights into functional capacity in a hyperarid desert soil niche community. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 1875-1888, 2016.

YAN, X.; LYNCH, J. P.; BEEBE, S. E. Utilization of phosphorus substrates by contrasting common bean genotypes. **Crop Science**, v. 36, p. 936–941, 1996.

YADAV, B. K.; VERMA, A. Phosphate solubilization and mobilization in soil through microorganisms under arid ecosystems. In: ALI, M. **The functioning of ecosystems**. London: IntechOpen, 2012. DOI: 10.5772/35917.

YAMADA, T. et al. Diversity, localization, and physiological properties of filamentous microbes belonging to *Chloroflexi* subphylum I in mesophilic and thermophilic methanogenic sludge granules. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7493-7503, 2005.

WAKELIN, S. A. et al. A single application of Cu to field soil has long-term effects on bacterial community structure, diversity, and soil processes. **Pedobiologia**, v. 53, n. 2, p. 149-158, 2010.

WANG, C. et al. Bacterial communities and their predicted functions explain the sediment nitrogen changes along with submerged macrophyte restoration. **Microbial Ecology**, v. 76, n. 3, p. 625-636, 2018.

WANNER, B. L. Signal transduction in the control of phosphate-regulated genes of *Escherichia coli*. **Kidney International**, v. 49, n. 4, p. 964-967, 1996.

WARD, N. et al. The Order Planctomycetales, Including the Genera Planctomyces, Pirellula, Gemmata and Isosphaera and the Candidatus Genera Brocadia, Kuenenia and Scalindua. In: DWORKIN, M. et al. (Ed.). **The Prokaryotes**. New York, NY: Springer, 2006. p. 757-793,

WATT, M. et al. Numbers and locations of native bacteria on field-grown wheat roots quantified by fluorescence in situ hybridization (FISH). **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 871-884, 2006.

WEI, H. et al. Succession of the functional microbial communities and the metabolic functions in maize straw composting process. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 333-341, 2018.

WESTHEIMER, F. H. Why nature chose phosphates. **Science**, v. 235, n. 4793, p. 1173-1178, 1987.

ZAIDI, A. et al. Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes. In: KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; MUSARRAT, J. (Ed.). **Microbial strategies for crop improvement**. Berlin: Springer Publishing, 2009. p. 23-50.

ZHANG, F. H. et al. Temporal changes in soil organic carbon and aggregate-associated organic carbon after reclamation of abandoned, salinized farmland. **The Journal of Agricultural Science**, v. 155, n. 2, p. 205-215, 2017.

ZHENG, B. X. et al. Identification and characterization of inorganic-phosphate-solubilizing bacteria from agricultural fields with a rapid isolation method. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 47, 2018.

ZHENG, B. X. et al. Responses to soil pH gradients of inorganic phosphate solubilizing bacteria community. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 25, 2019.

ZHOU, Y.; ZHU, H.; YAO, Q. Contrasting P acquisition strategies of the bacterial communities associated with legume and grass in subtropical orchard soil. **Environmental Microbiology Reports**, v. 10, n. 3, p. 310-319, 2018.

ZHOU, Y. et al. Variation in soil microbial community structure associated with different legume species is greater than that associated with different grass species. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1007, 2017.