

UFRRJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FITOSSANIDADE
E BIOTECNOLOGIA APLICADA**

DISSERTAÇÃO

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE FITASE EM SOLO E
SERRAPILHEIRA DA FLORESTA ESTACIONAL SEMIDECÍDUA NO BIOMA
CERRADO, SETE LAGOAS – MG.**

Alexandre De Donato

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E
BIOTECNOLOGIA APLICADA**

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE FITASE EM SOLO
E SERRAPILHEIRA DA FLORESTA ESTACIONAL SEMIDECÍDUA
NO BIOMA CERRADO, SETE LAGOAS – MG.**

ALEXANDRE DE DONATO

Sob Orientação do Professor
Dr. Marcelo Elias Fraga

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de Concentração em Biotecnologia Aplicada.

Seropédica, RJ
Agosto/2013

631.422098151

D677b

T

Donato, Alexandre de, 1988-

Bioprospecção de fungos produtores de fitase em solo e serrapilheira da floresta estacional semidecídua no bioma cerrado, Sete Lagoas – MG / Alexandre de Donato – 2013.

71 f. : il.

Orientador: Marcelo Elias Fraga.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada.

Bibliografia: f. 44-55.

1. Fertilidade do solo – Sete Lagoas (MG) – Teses. 2. Serapilheira – Sete Lagoas (MG) – Teses. 3. Solos – Teor de fósforo – Sete Lagoas (MG) – Teses. 4. Micro-organismos do solo – Teses. 5. Biotecnologia florestal – Teses. I. Fraga, Marcelo Elias, 1967-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada. III. Título.

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

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E
BIOTECNOLOGIA APLICADA

ALEXANDRE DE DONATO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, área de concentração em Biotecnologia Aplicada.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 12/08/2013

Prof. Marcelo Elias Fraga, D.Sc., Biólogo
UFRRJ/IV/Depto. Microbiologia e Imunologia Veterinária (DMIV)
(Orientador)

Prof. Carlos Antonio Inácio, PhD., Eng. Florestal
UFRRJ/IB/Depto. Entomologia e Fitopatologia (DEnF)
(Membro Titular)

D.Sc. José Carlos Polidoro, Eng. Agrônomo
Pesquisador da Embrapa Solos
(Membro Titular)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e aos meus professores, pelos ensinamentos.

Ao professor Marcelo Elias Fraga, pela orientação e ajuda para concretização deste trabalho.

Ao professor Francisco Adriano Souza pela ajuda na coleta de amostras de solo na Embrapa Milho e Sorgo - Sete Lagoas – MG

Ao Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI) pelo fomento do presente projeto durante os seus primeiros 18 meses de realização, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo fomento nos 6 meses finais e subsequentes.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada (PPGFBA), por todo empenho e dedicação na melhoria da qualidade de curso oferecido.

À Embrapa Milho e Sorgo – Sete Lagoas - MG, pela permissão da coleta de amostras na área de transição entre Cerrado e Mata Atlântica situada na área pertencente à mesma.

Ao pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, João Herbert Moreira Viana, pelas análises químicas e do perfil do solo.

Ao pesquisador Thomaz Correa e Castro da Costa, pelo ensaio dos sítios florestais e seu estudo florístico, por meio do projeto CNPq 561864/2010-1 “Parâmetros da fragmentação florestal como subsídio para qualidade ambiental e recuperação de ambientes degradados”.

A coordenadora do PPGFBA, Profa. Elen de Lima Aguiar Menezes, pelos ensinamentos dados durante a graduação, que me permitiram ser aprovado no processo seletivo do PPGFBA, e pelo esforço e empenho na melhoria da qualidade do curso.

À mestrandia Tatiana Faria Maia, pela ajuda nas análises e demais procedimentos laboratoriais realizados ao longo desta pesquisa.

Ao secretário do PPGFBA, Roberto Tadeu Souza de Oliveira, pela boa vontade, prestatividade, empenho e responsabilidade na suas atribuições.

Aos funcionários do DEnF que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

Aos meus amigos pela convivência e apoio.

À minha família, sem a qual não poderia concluir minha pós-graduação.

RESUMO

DE DONATO, Alexandre. **Bioprospecção de fungos produtores de fitase em solo e serrapilheira da Floresta Estacional Semidecídua no Bioma Cerrado, Sete Lagoas, MG.** 2013. 71 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada). Instituto de Biologia, Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2013.

No Brasil grande parte dos solos agricultáveis tem baixa disponibilidade de fósforo, um nutriente limitante para diversas culturas nos solos brasileiros. A habilidade dos fungos filamentosos em solubilizar o fósforo de várias fontes, tem sido considerada como uma desejável característica para usos diversos. O Brasil possui uma enorme biodiversidade, e uma das maneiras de se extrair valor econômico da mesma é a bioprospecção, onde apresenta uma busca sistemática por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de seres vivos em geral, que possam, eventualmente, levar ao desenvolvimento de um produto. O objetivo foi o isolamento de fungos filamentosos solubilizadores de fósforo do solo e serrapilheira e a quantificação da micobiota fúngica. O trabalho foi realizado em uma floresta estacional semidecídua no bioma Cerrado, Município de Sete Lagoas, MG, no qual as amostras de solo foram coletadas de 8 fragmentos florestais distintos, 2 épocas de coleta, e 2 profundidades, camada de 0-5 cm, e 5-10 cm, e serrapilheira, para o isolamento da micobiota, e posterior avaliação quanto à capacidade de solubilização de fósforo. Os solos foram classificados segundo o Sistema Brasileiro de Classificação dos Solos. A micobiota foi quantificada por meio da metodologia de unidade formadora de colônia e identificada com base no estudo morfológico. A fertilidade do solo e o teor de nutrientes trocáveis foram avaliados para camada de 0-10 cm do solo. A identificação dos isolados capazes de solubilizar fósforo foi feita por meio do plaqueamento dos mesmos em meio de cultura Pikovskaya. A serrapilheira apresentou maior número de UFC nas amostras coletadas na época chuvosa (C1) em relação à época seca (C2), e em ambas as épocas a serrapilheira apresentou um número superior de UFC que as outras duas profundidades. Na coleta C1, realizada no final de janeiro de 2012, foram isolados 907 fungos, destes, 103 (11,35%) eram filamentosos que apresentavam capacidade de solubilizar fósforo. Na coleta C2, realizada no início de setembro de 2012, foram isolados 947 fungos, 152 (16,76%) eram filamentosos que apresentavam a capacidade de solubilizar fósforo. A C2 mostrou maior porcentagem de espécies produtoras de fitase pertencentes ao gênero *Penicillium*, enquanto C1 mostrou maior porcentagem de fungos pertencentes à seção *Nigri* do gênero *Aspergillus* com capacidade de produção de fitase. O número total de isolados fúngicos produtores de fitase foi maior em C2. Concluiu-se que os solos situados na região do estudo possuem uma elevada diversidade de micobiota e elevado número de fungos solubilizadores de fósforo, e são potencialmente exploráveis no tocante à obtenção destes.

Palavras-chave: Biotecnologia, Fósforo, Micro-organismos.

ABSTRACT

DE DONATO, Alexandre. **Bioprospecting of phytase producing fungi in soil and litter of Semi-deciduous Forest in the Cerrado Biome, Sete Lagoas, MG.** 2013. 71 p. Dissertation (Master Science in Phytosanitary and Applied Biotechnology). Institute of Biology, Department of Entomology and Plant Pathology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2013.

In Brazil most of the agricultural soils have low availability of phosphorus, a nutrient limiting for several crops in Brazilian soils. The ability of filamentous fungi in solubilizing the phosphorus from various sources, has been considered as a desirable characteristic for various uses. Brazil has a huge biodiversity, and one way of extracting economic value of it, is bioprospecting, which presents a systematic search for organisms, genes, enzymes, compounds, processes and parts from living beings in general, which may eventually lead to the development of a product. The goal was the isolation of filamentous fungi solubilizing phosphorus of soil and litter, and quantification of fungal mycoflora. The study was conducted in one Semi-deciduous forest biome Cerrado of Sete Lagoas, MG city, in which soil samples were collected from eight distinct forest fragments, two collection periods, and 2 depths, layer 0 - 5cm, 5 -10cm and litter, for the isolation of mycobiota, and subsequent evaluation of the ability to solubilize phosphate. The soils were classified according to the Brazilian System of Soil Classification. The mycoflora was quantified using the methodology of colony-forming unit and identified based on morphological study. Soil fertility and nutrient content were evaluated for exchangeable nutrients, for the 0-10 cm layer of soil. The identification of isolates capable of solubilizing phosphorus was made by plating in the same culture medium Pikovskaya. The litter showed higher CFU in samples collected during the rainy season (C1) compared to the dry season (C2), and for both periods of collect, the litter had a higher number of UFC the other two depths. In the collection C1, held in late January 2012, 907 fungi were isolated, of these, 103 (11.35%) were filamentous had capacity to solubilize phosphorus. In the collection C2, held in early September 2012, 947 fungi were isolated, 152 (16,76%) were filamentous had the capacity to solubilize phosphorus. The C2 showed higher percentage of phytase-producing species belonging to the genus *Penicillium*, while C1 showed higher percentage of fungi belonging to the genus *Aspergillus* section *Nigri* with production capacity of phytase. The total number of fungal isolates producing phytase was higher in C2. It was concluded that the soil in the area in the study have high mycobiota diversity and high number of phosphorus solubilizing fungi, and are potentially exploitable with respect to obtaining these.

Key words: Biotechnology, Microorganism, Phosphorus.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estimativas mais comuns do número mundial de espécies fúngicas	14
Tabela 2. Quantificação da micobiota na época chuvosa (C1) dos fragmentos florestais em UFC (10^5) nas 3 profundidades avaliadas	30
Tabela 3. Quantificação da micobiota na época seca (C2) dos fragmentos florestais em UFC (10^5) nas 3 profundidades avaliadas	31
Tabela 4. Distribuição dos diferentes gêneros e espécies de fungos ao longo das profundidades e fragmentos na época chuvosa.....	33
Tabela 5. Distribuição dos diferentes gêneros e espécies de fungos ao longo das profundidades e fragmentos na época seca.....	34
Tabela 6. Distribuição numérica dos diferentes grupos fúngicos avaliados ao longo dos fragmentos florestais na época chuvosa	35
Tabela 7. Distribuição numérica dos diferentes grupos fúngicos avaliados ao longo dos fragmentos florestais na época chuvosa	36
Tabela 8. Distribuição das frequências da família <i>Fabaceae</i> , de outras famílias e de árvores mortas nos fragmentos florestais	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG	25
Figura 2. Análise multivariada por componentes principais da composição química dos solos dos fragmentos florestais F1 a F8.....	39

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

Al – Alumínio
Aspergillus NPF – Fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* que não produzem fitase
ATP – Adenosina Trifosfato
BDA – Batata Dextrose Ágar
Ca- Cálcio
CTC – Capacidade de Troca Catiônica
Cu – Cobre
C1 - Primeira coleta de amostras de solo, realizada em janeiro de 2012
C2 - Segunda coleta de amostras de solo, realizada em setembro de 2012
DAP – Diâmetro à Altura do Peito
DRBC – Dicloran Rosa Bengala de Cloranfenicol
Fe – Ferro
F1 – Fragmento Florestal 1 (varia de 1 a 8,2)
FES – Fermentação em Estado Sólido
FSM – Fermentação Submersa
FSS – Fermentação Semi-sólida
HPO₄ – Ácido ortofosfórico
H₂PO₄ - Ácido Fosfórico
Mg – Magnésio
MSP - Microrganismo Solubilizador de Fosfato
NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
P – Fósforo
pH – Potencial Hidrogeniônico
RPM – Rotações por minuto
T - Temperatura
U – Unidades
UFC - Unidade formadora de colônia
UR - Umidade Relativa do ar
Zn – Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 O fósforo nos solos tropicais	3
2.2 Microrganismos solubilizadores de fosfato	6
2.3 Microbiota dos solos tropicais.....	13
2.4 Caracterização do Cerrado, Mata Atlântica e área de transição	18
2.5 Aplicações da enzima fitase	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Local de Estudo	25
3.2 Amostragem do solo	27
3.3 Quantificação da microbiota do solo	27
3.4 Teste de solubilização de fósforo	28
3.5 Análises químicas e de perfil do solo	28
3.6 Identificação e preservação dos fungos	28
3.7 Análises estatísticas	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Variações quantitativas da microbiota.....	30
4.1.1 Época de coleta chuvosa (C1).....	30
4.1.2 Época de coleta seca (C2).....	30
4.1.3 Relação entre épocas C1 e C2	31
4.2 Variações qualitativas da microbiota nas diferentes épocas de coleta	32
4.3 Relação entre épocas C1 e C2	37
4.4 Aspectos químicos do solo	38
4.5 Aspectos florísticos	41
5. CONCLUSÕES	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
7. ANEXOS	56

1. INTRODUÇÃO

No Brasil grande parte dos solos agricultáveis tem como problema agrícola a acidez, sendo os mesmos caracterizados por possuir baixa disponibilidade de nutrientes, toxidez de alumínio e principalmente baixa disponibilidade de fósforo, que é o macronutriente de menor mobilidade no solo, sendo um nutriente limitante para diversas culturas nos solos brasileiros. A aquisição deste elemento é essencial para o desenvolvimento vegetal, desempenhando importantes papéis em funções fisiológicas básicas, como formação de ácidos nucleicos, fosfolipídios, metabolismo energético, ativação de metabolismo intermediário e regulação enzimática. Estima-se que cerca de 25% dos solos situados nas regiões tropicais e subtropicais apresentam deficiência acentuada de fósforo.

A quantidade de fósforo presente nos solos seria por si só suficiente para suprir as demandas de qualquer cultura agrícola, contudo, estima-se que após a primeira hora de aplicação da adubação fosfatada, mais de 80% deste nutriente é adsorvido as partículas de solo, formando o fósforo não-lábil, o qual não pode ser absorvido pelas raízes das plantas.

O Brasil é um país megadiverso, e uma das maneiras de se extrair valor econômico da biodiversidade é a bioprospecção, que pode ser definida como a busca sistemática por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de seres vivos em geral, as quais possam ter um potencial econômico e, eventualmente, levar ao desenvolvimento de um produto. Em programas de bioprospecção, o solo representa uma das mais importantes fontes de diversidade genética, um fato de grande relevância para estudos ecológicos e de desenvolvimento tecnológico. Infelizmente a bioprospecção é relativamente inexplorada tanto em relação ao aspecto biológico quanto ao jurídico, não resultando, portanto, em grandes fluxos de recursos para os países em desenvolvimento, onde a maioria das riquezas biológicas se encontra (JUNIOR, 2012). A habilidade dos micro-organismos em solubilizar o fósforo de várias fontes insolúveis, orgânicas e inorgânicas, tem sido considerada como uma desejável característica para usos diversos.

O desenvolvimento de uma tecnologia capaz de tornar disponível (lábil) o fósforo não lábil presente no solo, teria resultados econômicos muito expressivos, uma vez que a quantidade de fósforo presente nos solos, é de 200 a 500 vezes maior que a quantidade que se encontra efetivamente disponível para absorção vegetal. Dentre as enzimas que atuam na disponibilização de fósforo, se encontra a fitase, a qual atua na solubilização de fontes de fósforo insolúveis, tornando este elemento disponível para a absorção radicular das plantas.

Considerando que a utilização desta enzima em aplicações industriais é considerada incipiente, em virtude do fato de não haver uma fitase capaz de atuar em diversas faixas de pH e temperatura, otimizando a sua aplicação, o desenvolvimento de estudos que visem encontrar novas fontes biológicas de fitase tem alta relevância, pois esta nova fitase encontrada, pode tanto atender à demanda da indústria, como também vir a ser aplicada na agricultura, seja por inserção do gene, presente no fungo, responsável pela produção de fitase, no DNA de uma cultura agrícola, ou pelo desenvolvimento de uma variedade fúngica capaz de crescer em simbiose com determinadas culturas, disponibilizando o fósforo para as mesmas.

A fitase pode ser de origem fúngica ou vegetal, e dentre as fitases de origem fúngica, há as intracelulares (produzidas no interior das células) e as extracelulares (produzidas no exterior das células). Sabe-se que a fitase fúngica é mais eficiente, no tocante à utilização em processos industriais, que a fitase de origem vegetal, e que apenas a fitase extracelular é potencialmente explorável do ponto de vista industrial.

Estudos prévios que objetivaram isolar fungos com produção de fitase extracelular, constataram que a maioria dos fungos que a produzem, pertencem aos gêneros *Aspergillus* P. Micheli ex Haller e *Penicillium* Link, enquanto outros estudos concluíram que os Biomas Cerrado e Mata Atlântica apresentam alta diversidade de micro-organismos em seus solos, e possuem um predomínio de tais gêneros nestes.

Considerando que a probabilidade de serem encontrados fungos com eficiente capacidade de solubilização de fósforo, aumenta conforme a diversidade microbiana do solo em estudo aumenta, e considerando os demais argumentos acima expostos, o objetivo do presente trabalho foi estudar a biodiversidade e bioprospecção da fitase de fungos filamentosos do solo e serrapilheira, de uma floresta estacional semidecídua do bioma Cerrado, sendo um dos fragmentos florestais estudados considerado uma área de transição de Mata Atlântica para Cerrado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O fósforo nos solos tropicais

O fósforo está envolvido em inúmeros processos biológicos, como a formação de ácidos nucleicos, fosfolipídeos, formação de ATP e NADPH (moléculas de fluxo e estoque de energia), além de ser indispensável à fotossíntese e respiração, sendo portanto, um macronutriente essencial para o desenvolvimento vegetal, por influenciar todo o ciclo da planta (NOVAIS & MELLO, 2007).

O P total do solo pode estar na forma orgânica ou inorgânica, sendo que em sistemas de plantio direto, da quantidade total de fósforo presente no solo, até 80% pode ser de origem orgânica (ARAÚJO & MACHADO, 2006; GYANESHWAR et al., 2002). Este ocorre principalmente na forma indisponível de fosfato inositol (fitato) e outras como fosfomonoésteres, fosfolipídios, ácidos nucleicos e fosfotriésteres (GYANESHWAR et al., 2002), podendo se tornar disponível pela mineralização por enzimas fosfatases liberadas pelas raízes das plantas e pelos micro-organismos. O fósforo inorgânico na forma de ânions fosfato (H_2PO_4^-) pode ser imobilizado no solo pela precipitação com cátions, tais como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} e Al^{3+} , ou adsorvido aos óxidos de Fe e de Al, silicatos de Al e carbonatos de Ca, dependendo das propriedades do solo (MARSCHNER et al., 2006; DA SILVA, 2013).

O clima é um dos fatores de formação dos solos que mais influencia em suas características. Os solos situados nas regiões tropicais são mais intemperizados, apresentando certas características em comum, dentre as mais importantes, podemos citar a baixa CTC, alta acidez, toxidez de Al, e principalmente baixa disponibilidade de P, essencial para o desenvolvimento vegetal, e um nutriente limitante para diversas culturas nos solos brasileiros (NEVES et al., 2010). Em decorrência do fenômeno de fixação, mais de 80 % do P aplicado no solo é adsorvido após a primeira hora de contato com o mesmo, se tornando não lábil. Estima-se que 25% dos solos tropicais apresentam deficiência acentuada de P (RICHARDSON, 2001; SANTOS, 2009).

O ciclo biogeoquímico do fósforo tem como único composto essencial para os seres vivos o íon fosfato, e se divide em dois ciclos: Ecológico, onde o fosfato é incorporado localmente ao solo e absorvido pelas plantas; ou o geológico, onde o fósforo decomposto (solúvel) é incorporado à rocha matriz após ser arrastado para lagos, rios ou mar. O ciclo de tempo ecológico pode ser resumido à absorção do fosfato da solução do solo pelas raízes das

plantas, e incorporação nos componentes orgânicos, principalmente fitatos, ácidos nucleicos e fosfolipídios (OLIVEIRA & ALIXANDRE, 2013). A atuação de micro-organismos no processo de imobilização de fósforo, indisponibiliza quantidades pouco expressivas de fósforo (sendo que este volta ser disponível após a morte destes micro-organismos), sendo assim, a diferença desta atuação em solos de diferentes climas não causa diferenças significativas na disponibilidade de P entre eles, apesar do metabolismo microbiano em solos tropicais ser maior. As perdas por erosão e lixiviação, variam de acordo com as condições em que os solos se encontram, podendo chegar a 0,8 kg por tonelada de solo (MENDONÇA, 2006; CARNEIRO et al., 2009; RIBAS JUNIOR, 2012), porém não são significativas do ponto de vista agrícola, especialmente as perdas por lixiviação, uma vez que segundo Malavolta (2006) a mobilidade do P no solo é medida na ordem dos angstroms (10^{-10} m).

A aquisição de fertilizantes fosfatados tem custos elevados para o setor agrícola, e pode causar poluição quando estes atingem rios ou mananciais (MILLER et al., 2001). Os fosfatos naturais são as matérias-primas para a obtenção dos fertilizantes fosfatados solúveis, como superfosfato simples, triplo ou fosfatos de amônio, que são processados quimicamente por meio de ácido sulfúrico ou ácido nítrico, processo de alto custo energético. A utilização direta das fontes naturais de P como fertilizantes, principalmente para culturas anuais, pode em muitos casos não ser economicamente viável, particularmente em solos com alta capacidade de adsorção e baixa capacidade de troca iônica, como é o caso dos solos de Cerrado, devendo por isso ser utilizada com restrição. No entanto, novas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de melhor avaliar a utilização de fosfatos naturais brasileiros quanto à disponibilização de P no solo, a fim de utilizá-los como fonte alternativa de P para as culturas, reduzindo o uso de produtos químicos e favorecendo a sustentabilidade ambiental e agrícola. Mesmo em solos com pH abaixo de 5.5-6.0, os fosfatos de rocha se tornam tão eficientes quanto superfosfatos, somente depois de quatro anos de aplicação direta anual (GEORGE et al., 2005; PENA et al., 2013).

A alteração dos minerais de rochas em ambientes naturais é um processo conhecido, causado pela ação da água e de ácidos orgânicos exsudados pelas raízes das plantas, e por micro-organismos que aceleram este processo. Por essa razão, existe um renovado e crescente interesse na manipulação dos fosfatos de rochas por métodos biológicos, visando o aumento de sua eficiência agrônômica. Dessa forma, alguns estudos têm buscado o uso de micro-organismos com potencial de solubilização de P, agregados aos fosfatos naturais, para aumentar a disponibilização deste elemento (STAMFORD et al., 2004).

De acordo com Gonçalves (1988), em solos situados sob matas nativas da região do Cerrado, o estoque de P orgânico é mais baixo que o de outros biomas, geralmente se situando abaixo de 15 % do P total. Já nos solos cultivados, tal estoque é maior, principalmente nos cultivados em sistema de plantio direto, contudo, a fixação de P ocorrida é equivalente à dos solos não cultivados, com mais de 400 kg de P por hectare, retido ou fixado nas partículas do solo. Desta forma, a biodisponibilidade de P nos solos do Cerrado em geral é muito baixa, e para atenuar este problema, a calagem é muito utilizada no intuito de reduzir a toxidez do Al, e aumentar a biodisponibilidade e absorção de P e outros nutrientes. Tais dados indicam o quanto é grande o retorno que se pode esperar do desenvolvimento de uma tecnologia capaz de aumentar a disponibilidade de fósforo a partir da fitase produzida por fungos filamentosos.

Os solos das regiões tropicais são naturalmente ácidos, devido ao alto grau de intemperização, o que resulta em maior número de minerais secundários insolúveis (não são lixiviados) como por exemplo os óxidos, hidróxidos, oxi-hidróxidos de Fe e Al. Esses minerais tem forte afinidade com P, então por possuírem grupamento funcional carboxílico (predominantemente) se ligam covalentemente ao P e o indisponibilizam no solo (ARAÚJO & MACHADO, 2006; SOARES & ALLEONI, 2008). Considerando que Pang e Kolenko (1986), Nahas (2002) e Pereira *et al.* (2012), concluíram que existe correlação negativa entre a quantidade de fungos solubilizadores de fósforo presente em um solo, com sua respectiva quantidade de fósforo disponível, e considerando que Cavalcanti *et al.* (2006), Coutinho *et al.* (2010), Fraga e Pereira (2010), Fraga *et al.* (2012) e Grishkan e Nevo (2008) identificaram os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* como os mais frequentes em solos tropicais, e por serem os solos do Cerrado, tipicamente tropicais, estes podem apresentar tal frequência, e considerando também que Guimarães *et al.* (2006), afirmam serem estes gêneros os mais promissores no tocante a obtenção de fitase extracelular, podemos concluir que uma bioprospecção de fungos produtores de fitase no bioma Cerrado apresenta resultados promissores.

2.2 Micro-organismos solubilizadores de fosfato

Segundo Hattenschwiler *et al.* (2005), a diversidade de espécies que compõem a serrapilheira e de espécies decompositoras, pode influenciar significativamente a decomposição e liberação de nutrientes para o solo, sendo estes de grande relevância para a comunidade de organismos presentes, bem como para o funcionamento dos ecossistemas.

Nas interações com raízes de plantas, os micro-organismos podem ser endofíticos, simbióticos ou de vida livre. Entre aqueles de vida livre, destacam-se os micro-organismos

solubilizadores de fosfato (MSP), que são bactérias ou fungos capazes de solubilizar diferentes formas de fosfato de baixa solubilidade, deixando-os disponíveis para as plantas (BAREA et al., 2005).

Micro-organismos endofíticos são principalmente fungos ou bactérias que habitam o interior de plantas, de modo geral partes aéreas como folhas e caules, sem causar nenhum dano a seus hospedeiros, fato que os diferencia de micro-organismos patogênicos (SOUZA VIEIRA et al., 2012) Já os simbióticos, são aqueles que estabelecem relações interespecíficas (trocas de alimentos e de produtos do metabolismo que beneficiam a ambos) harmoniosas, sendo a dependência entre eles tamanha, que a vida em separado, de um ou de ambos, seria muito difícil ou mesmo impossível, sendo portanto tal relação obrigatória, fato que os diferencia dos micro-organismos que vivem em protocooperação (POLLI et al., 2012).

A habilidade dos micro-organismos em solubilizar o P de várias fontes de P insolúveis, orgânicas e inorgânicas, tem sido considerada uma desejável característica para usos diversos (RICHARDSON et al., 2005).

Os MSP são comuns no solo, onde as bactérias constituem um grupo que varia de 1-50% e os fungos de 0,5 a 1,0% da população total destes micro-organismos (KUCEY, 1983). A maior proporção de MSP está concentrada na rizosfera, sendo estes metabolicamente mais ativos que aqueles isolados de outros locais (VAZQUEZ et al., 2000; BAREA et al., 2005). A maioria destes micro-organismos solubiliza P ligado ao Ca e somente poucos conseguem solubilizar complexos de P-Al e P-Fe, podendo ser ainda, eficientes na solubilização de fosfatos de rocha (GYANESHWAR et al., 2002; MYAOKA, 2013).

O fosfato insolúvel mobilizado pelos micro-organismos pode ser absorvido pelas raízes das plantas, enquanto as plantas exsudam compostos de carbono, principalmente açúcares, que podem ser metabolizados pelos micro-organismos da rizosfera. MSP são caracterizados pela sua capacidade de solubilizar formas precipitadas de P quando cultivados em meios de cultura em laboratório, e incluem uma ampla variedade de organismos simbióticos e não simbióticos, como espécies de *Pseudomonas* Migula, *Bacillus* Cohn e *Rhizobium* Frank, actinobactérias e vários fungos como *Aspergillus* e *Penicillium* (WHITELAW, 2000; GYANESHWAR et al., 2002). A seleção de MSP é rotineiramente baseada na solubilização de fosfatos de Ca moderadamente solúveis {geralmente, fosfato de tricálcio $[(Ca_3(PO_4)_2)]$ e fosfatos contendo hidróxi- e fluorapatitas $[Ca_5(PO_4)_3OH$ e $Ca_{10}(PO_4)_6F_2]$ } e fosfatos de Fe ($FePO_4 \cdot 2H_2O$) e Al ($AlPO_4 \cdot 2H_2O$) (GYANESHWAR et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2013).

A quantidade de P solubilizado é altamente dependente da fonte (solubilidade) de P e, para diferentes micro-organismos, é influenciada pelas condições de cultivo. Por exemplo, comumente relata-se serem os fungos, mais eficientes na solubilização de fosfatos de Fe e Al, enquanto a capacidade dos diferentes organismos de solubilizar fosfatos de Ca é influenciada pela fonte de carbono e nitrogênio no meio, pela capacidade de tamponamento do meio e da fase em que as culturas são amostradas. A natureza da fonte de nitrogênio utilizada no meio de cultura também afeta a capacidade de solubilização dos micro-organismos, sendo observada maior taxa de solubilização na presença de sais de amônio, do que na presença de nitrato como fonte de nitrogênio (KUCEY, 1983; WHITELAW, 2000).

Dentre os principais mecanismos que influenciam a eficiência de aquisição de P no solo, estão: modificações de atributos morfológicos da raiz, a presença de aerênquimas, modificações de características químicas na rizosfera, alterações de características fisiológicas de cinética de absorção, alterações em processos bioquímicos e interações com micro-organismos do solo (BALIGAR & FAGERIA, 2001).

A descoberta desta mútua relação entre plantas e MSP tem estimulado o desenvolvimento de novas tecnologias, tais como os biofertilizantes. Nesse contexto, vários estudos têm sido realizados com a finalidade de avaliar micro-organismos com capacidade de solubilizar fontes pouco solúveis de P (ACHAL et al., 2007; XIAO et al., 2008; OGBO, 2010).

A fitase pode ser intracelular ou extracelular, sendo a última a única potencialmente explorável do ponto de vista industrial. Os fungos filamentosos se mostraram predominantes na produção da fitase extracelular, o que nos permite inferir que um estudo aprofundado, destes organismos em especial, poderia trazer resultados promissores. Além do fato de serem pouco explorados, há de se considerar que muitos destes seres possuem uma capacidade de sobrevivência e colonização em ambientes inóspitos, muito acima da maioria dos seres vivos (ABREU & PFENNING, 2008), o que constitui um forte indício de que, provavelmente, os mesmos possuem enzimas e outros componentes metabólicos altamente eficientes, ou que têm determinadas características peculiares potencialmente exploráveis em atividades agropecuárias e industriais. Estes fatores levam a crer que os fungos de solos, especialmente os filamentosos, que têm demonstrado particular potencial de exploração, devem ter seu estudo intensificado e ampliado.

Os principais fungos filamentosos que possuem capacidade de produzir fitase e/ou fosfatase, se encontram dentro dos gêneros: *Aspergillus*, *Rhizopus* Ehrenb, *Penicillium*

Link, *Mucor* Fresen, *Pseudeurotium* Stolk e *Trichoderma* Persoon e também alguns fungos termófilos como *Thermomyces lanuginosus* Tsikl. e *Sporotrichum thermophile* Apinis. Contudo, em termos de utilização industrial, os fungos do gênero *Aspergillus* são, basicamente, representados por duas espécies; *A. niger* Tiegh e *A. ficuum* Thom & Currie, as quais são as mais promissoras, sendo cultivadas em bioreatores, através do processamento de Fermentação em Estado Sólido (FES) (ASCHERI et al., 2012). O FES aplica-se ao crescimento de micro-organismos sem a presença de água livre, estando esta ligada a fase sólida. O meio de cultura denominado FES atua como fonte de C, N e outros componentes, e serve como suporte para o crescimento microbiano. Caracteriza-se também por apresentar ar atravessando os espaços vazios, em pressões relativamente baixas, pelo crescimento microbiano ocorrer em condições próximas às dos habitats naturais dos micro-organismos, e pelo fato do meio apresentar alta heterogeneidade, não estando os substratos completamente acessíveis aos micro-organismos (PINTO et al., 2005).

A fitase pode também ser obtida de fontes vegetais, pois algumas plantas, como por exemplo o trigo (*Triticum aestivum* L.) conseguem exsudar esta enzima de suas raízes, porém, esta fitase é menos eficiente quanto a exploração industrial, pois a fitase microbiana geralmente apresenta maior resistência à degradação proteolítica e a temperaturas elevadas (GOLOVAN et al., 2000; TEIXEIRA et al., 2013).

O processo de solubilização de fósforo no solo efetuado por micro-organismos através da fitase, ocorre por meio da excreção de ácidos orgânicos e seus prótons associados, que atuam dissolvendo diretamente o material fosfático, ou quelando os cátions que acompanham o ânion fosfato. Destacam-se, dentre estes ácidos, os ácidos láctico, glicólico, cítrico, málico, oxálico, tartárico e succínico (RICHARDSON, 2001).

Fiacadori *et al.* (2007), estudou a produção de fitases por diferentes linhagens de fungos filamentosos isoladas do solo da Região de Ribeirão Preto-SP. Os micro-organismos foram cultivados em fermentação submersa (FSM) e semi-sólida (FSS), com diferentes fontes de carbono, por 72h à 40 °C. A temperatura (20-80 °C) e o pH (3,0-6,0) ótimos de ensaio foram determinados. Entre as linhagens estudadas, *Aspergillus* sp. foi a melhor produtora de fitases, quando cultivada em meio semi-sólido com farelo de trigo (2.722 U totais) como fonte de carbono. Em cultivos submersos, os maiores níveis enzimáticos intra e extracelular foram obtidos com glicose (521 U totais) e milho moído (3.068 U totais), respectivamente. As fitases intra e extracelular apresentaram temperatura ótima de atividade, de 50 °C e 40 °C, respectivamente, enquanto que o pH ótimo foi 5,0 para ambas.

2.2.1 O gênero *Aspergillus* Link

O gênero *Aspergillus* foi descrito pela primeira vez pelo padre-micologista e biólogo, Pier Antonio Micheli, em 1729, e validado por Haller. O nome desta espécie foi inspirado em um aspergidor de água benta (*Aspergillum*), já que quando observada ao microscópio sua estrutura, foi percebida a semelhança com tal objeto. Trata-se de um gênero mitospórico, pertencente a Ordem *Eurotiales* (Classe *Eurotiomycetes*) que se caracteriza pela produção de hifas especializadas, denominadas conidióforos, onde se encontram as células conidiogênicas que dão origem aos conídios ou esporos assexuais. Todas as espécies de *Aspergillus* formam colônias filamentosas de diferentes características, que microscopicamente apresentam hifas septadas de aproximadamente 4 µm de diâmetro, e estruturas de frutificação típica, formada por célula-pé, conidióforo, vesícula, métula e/ou fiálide, que promovem a reprodução assexuada do fungo através da produção de fialoconídios. Algumas espécies de *Aspergillus* apresentam a forma sexuada caracterizada pela presença de cleistotécios, ascos e ascósporos. Nestes casos, o fungo é classificado como teleomorfo e pertencente a um dos oito gêneros a seguir: *Emericella* Berk, *Eurotium* Link, *Chaetosartorya* Subram, *Neosartorya* Malloch e Cain, *Petromyces* Malloch e Cain, *Hemicarpenales* A. K. Sarbhoy & Elphick, *Sclerocleista* Subram ou *Fennellia* Wiley E. G. & Simmons (KLICH, 2008).

Os fungos do gênero *Aspergillus* são os mais abundantes no planeta, alimentando-se de diversos substratos, e crescendo em diversas condições abióticas (entre 6 e 55 °C). O sucesso desta dispersão é atribuído à sua gigantesca produção de esporos, os quais são as estruturas mais dominantes no ar, dispersando-se por longas e curtas distâncias (GRIJGSHELD et al., 2013).

Espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* (conhecidos como *Aspergillus* negros) tem sido amplamente utilizadas para vários propósitos biotecnológicos, e estão entre os fungos mais estudados. A identificação destas espécies é muito importante para a exploração dos resultados destes estudos. O conceito de espécie distinta é claramente abstrato e frequentemente não consensual. Algumas propostas práticas têm sido criadas com o objetivo de superar estas dificuldades, mas seus resultados tem sido muito limitados. Os *Aspergillus* negros tem sido considerados um grupo taxonomicamente desafiante, e várias técnicas têm sido desenvolvidas com o objetivo de diminuir esta dificuldade de identificação, a principal delas é a taxonomia polifásica, que envolve métodos moleculares com bioquímicos, morfológicos e/ou outros (SIMÕES et al., 2013b).

Dentro do gênero *Aspergillus* estão compreendidas entre 267 e 837 espécies, sendo que a 20 são atribuídas infecções oportunistas no homem, denominadas aspergilose brônquiopulmonar, aspergiloma e aspergilose invasiva, doenças que afetam seres humanos imunocomprometidos e animais (RIBEIRO et al., 2009; GRIJGSHELD et al., 2013). Estas micoses são geralmente adquiridas por inalação dos propágulos fúngicos presentes no ambiente, podendo caracterizar uma infecção nosocomial (RIBEIRO et al., 2009). No tocante a infecções em humanos, as espécies de maior interesse clínico são *Aspergillus fumigatus* Fresen, *Aspergillus terreus* Thom, *Aspergillus flavus* Link, *Aspergillus niger* Tiegh e *Aspergillus ustus* (Bainier) Thom & Church. Dentro da seção *Fumigati*, a qual pertence a espécie mais importante do gênero; *A. fumigatus*, tem se produzido importantes mudanças, como a recente publicação de *Neosartorya fumigata* O' Gorman, H. T. Fuller & P. S. Dyer como estado sexual de *A. fumigatus*. Dentro da seção *Usti*, *A. ustus* tem sido tradicionalmente considerado como um patógeno humano, mesmo pouco frequente. Além das citadas, um considerável número de espécies de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus tamarii* Kita, *Aspergillus nomius* Kurtzman, B. W. Horn & Hesselt, *Aspergillus pseudonomius* Varga, Samson & Frisvad, *Aspergillus granulatus* Raper & Thom, *Aspergillus deflectus* Fennell & Raper e *Emericella quadrilineata* (Thom & Raper) C. R. Benj, entre outras, têm causado infecções humanas nos últimos anos (BOHEKOUT et al., 2009; GRIJGSHELD et al., 2013).

Outro aspecto importante sobre este gênero fúngico, é a contaminação de rações avícolas por micotoxinas da sua microbiota. O crescimento fúngico reduz o valor nutricional, e a digestibilidade dos alimentos, podendo intoxicar animais e humanos, resultando nas micotoxicoses, causadas pela ingestão das aflatoxinas produzidas por estes fungos, sendo estas moléculas carcinogênicas (FIGUEIRA, 2003; VARGA et al., 2011). Adicionalmente, diferentes espécies de *Aspergillus*, como por exemplo *A. westerdijkiae* Frisvad & Samson, podem produzir ocratoxinas em produtos alimentícios como café e uvas (LEONG et al., 2007).

Aspergillus spp produzem um ampla variedade de enzimas que degradam polímeros de substratos, os quais servem como fonte de nutrientes. Sua capacidade de secreção de uma grande quantidade de proteínas (e outros metabólicos, como ácidos orgânicos), combinada com uma tecnologia de fermentação e biologia molecular estabelecidas, tornam espécies de *Aspergillus* como *A. niger*, *A. oryzae* (Ahlb.) Cohn (= *Aspergillus flavus* Link), *A. awamori* Nakaz, *A. sojae* Sakag. & K. Yamada e *A. terreus* atrativas para a produção de proteínas homólogas e heterólogas (MEYER et al., 2011).

2.2.2 O gênero *Penicillium* Link

O gênero *Penicillium* foi descrito por Link, em 1809, sendo assim denominado devido ao fato de ter sido observada a produção de conidióforos em forma de pincel, cujo significado em latim é designado pela palavra *Penicillius*. A espécie *Penicillium expansum* foi designada como espécie tipo para este gênero em 1910, por Thom. Trata-se de um dos diversos gêneros que se reproduzem por meio da produção de esporos denominados conídios, que são originados a partir de estruturas designadas conidióforos ou esporóforos. As espécies pertencentes a tal gênero geralmente utilizam uma ampla diversidade de monossacarídeos, alcoóis e ácidos para seu crescimento, como única fonte de carbono. Os polióis e a trealose são compostos importantes armazenados em seus conídios e hifas. As espécies deste gênero são capazes de crescer na presença de nitrato como única fonte de carbono, embora o crescimento da maioria delas seja acelerado com a adição de peptona. Muitas das espécies deste gênero não necessitam de vitaminas complexas para crescerem (RAPER & THOM, 1949).

De acordo com Alexopoulos *et al.* (1996), o gênero *Penicillium* se constitui somente por espécies anamorfais incluídas no Filo *Ascomycota*, Classe *Plectomycetes*, Ordem *Eurotiales* e Família *Trichocomaceae*. Contudo, Samson e Houbraken (2011) propuseram a separação da família *Trichocomaceae* em três famílias: *Aspergillaceae*, *Thermoascaceae* e *Trichocomaceae*. Análises filogenéticas e morfológicas basearam esta separação. Após esta última reclassificação, o gênero *Penicillium* foi denominado *Penicillium sensu stricto*, no qual se encontram tanto espécies anamorfais quanto teleomorfais. O gênero *Penicillium sensu stricto* foi assim reclassificado e inserido na família *Aspergillaceae*. Kirk *et al.* (2008), aceitam esta família no Filo *Ascomycota*, subfilo *Eurotiomycetes*, Classe *Pezizomycotina*, Ordem *Eurotiales*, e Família *Eurotiomycetidae*.

As espécies do gênero *Penicillium* atuam na decomposição de matéria orgânica, participando ativamente de ciclos biogeoquímicos, tendo por conseguinte grande importância ecológica. São consideradas capazes de tolerar imensa variedade de condições físico-químicas, como pH, atividade de água e temperatura, além de serem pouco exigentes nutricionalmente (dotadas de competência metabólica) contudo, também são capazes de crescer em ambientes ricos em minerais e com complexas fontes de carbono. Apesar do solo ser o habitat natural destas espécies, elas podem ser encontradas em todos os ecossistemas (ONIONS & BRADY, 1987; DA SILVA, 2013). *Penicillium* spp. em solos tropicais, são

encontrados com maiores frequências em temperaturas e umidades do solo menores (DA SILVA, 2013).

2.2.3 O gênero *Trichoderma* Pers.

A primeira descrição do gênero foi registrada em 1794 por Persoon. Contudo, a classificação destas espécies por análises morfológicas era tão complexa, que já foi sugerida uma redução taxonômica para apenas uma única espécie; *Trichoderma viride* Pers. Os fungos do gênero *Trichoderma* se encontram na classe *Deuteromycetes*, Ordem *Moniliales*, e Família *Moniliaceae*. Sua fase perfeita está na classe dos *Ascomycetes*, Ordem *Hypocreales*, gênero *Hypocrea* Fr. Atualmente, são registradas 471 espécies de *Hypocrea* e 165 de *Trichoderma*. Produzem conídios hialinos e tem capacidade de produzir clamidósporos em substratos naturais, estrutura vital para sobrevivência de suas espécies em condições adversas. *Trichoderma* spp. produzem uma ampla diversidade de cores, de amarelo esverdeado claro até avermelhadas, contudo há algumas espécies incolores. Seu habitat natural é o solo, sendo considerado um saprófito deste e da madeira. O crescimento dos fungos deste gênero no solo é muito rápido (SCHUSTER & SCHMOLL, 2010).

O modo de ação dos fungos do gênero *Trichoderma* está associado à transformação da matéria orgânica que existe no solo, participando da biotransformação de celulose e hemicelulose, e da mineralização do nitrogênio, além de atuar na degradação e decomposição da lignina e do húmus, que por terem suas estruturas baseadas em núcleos aromáticos, são degradados por oxidação das cadeias laterais (REIS et al., 2013).

Trichoderma spp. são altamente bem sucedidos na colonização de seus habitats, o que é reflexo de sua eficiente utilização do substrato, como também de sua capacidade de secreção de metabólitos antibióticos e enzimas (SCHUSTER & SCHMOLL, 2010).

Os fungos deste gênero são os agentes de controle biológico de fitopatógenos mais estudados e utilizados a nível nacional e internacional (MORANDI & BETTIOL, 2009), em função de suas características de antagonismo, e por serem fungos naturais isolados do solo e da rizosfera, tendo um sucesso no controle de doenças radiculares superior ao de doenças foliares. Suas linhagens tem recebido atenção na pesquisa em função de sua versatilidade de ação, sendo utilizadas no controle de fitopatógenos, por meio de associação ou não de

parasitismo, competição e antibiose; além de suas ações como indutores de resistência de plantas contra doenças, bem como promotores de crescimento de plantas e aumento da biomassa radicular, representando uma alternativa promissora para minimizar o impacto de produtos químicos e a redução de suas doses de aplicação (HARMAN et al., 2004; FORTES et al., 2007).

A promoção de crescimento de plantas pela aplicação de isolados de *Trichoderma* spp. foi, inicialmente, relacionada ao controle de micro-organismos prejudiciais presentes na rizosfera e/ou no solo e, mais recentemente, tem sido relacionada à produção de hormônios ou fatores de crescimento; maior eficiência no uso de alguns nutrientes e aumento da disponibilidade e absorção de nutrientes pela planta (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2009).

2.3 Microbiota dos solos tropicais

O solo deve ser definido como um ecossistema e não como um substrato. Esse fato traz à tona problemas envolvendo definições e metodologias, já que o solo representa uma complexa mistura de frações orgânicas e inorgânicas com água e organismos vivos. As frações orgânicas são compostas por material vegetal fresco e em diferentes estágios de decomposição, tal como raízes ativas, pequenos invertebrados e seus excrementos, exsudatos e micro-organismos. Devido a essa complexidade, o solo abriga uma considerável parte da diversidade de fungos, e inexistente uma estimativa precisa do número de espécies fúngicas existente no solo (MOREIRA et al., 2008).

Além dos horizontes que compõem o solo, há também a serrapilheira, a qual não integra o solo e nem é utilizada para classificá-lo dentre de suas diferentes classes. Contudo, esta camada que recobre o solo é essencial para a sua fertilidade, por suprir o solo e as raízes com nutrientes e matéria orgânica. Atua também como redutora dos processos erosivos por minimizar o impacto e consequente efeito dispersivo das gotas de chuva, e retém umidade, diminuindo, portanto, o processo de evaporação que ocorre no solo propriamente dito (KINDEL, 2001; FIGUEIRÓ, 2005).

Na biosfera, o hábitat mais rico em fungos é o solo. A principal função desses organismos é a decomposição da matéria orgânica, envolvendo pelo menos quatro grupos distintos: celulolíticos, hemicelulolíticos, pectinolíticos e ligninolíticos (TAUK, 1990). Resultados de experimentos desenvolvidos por Fraga e Pereira (2010) indicam que a uniformidade da cobertura vegetal (plantios homogêneos) pode influenciar a diversidade dos fungos no solo.

Dados a respeito das interações microbianas no solo e na rizosfera em ecossistemas tropicais são esparsos, mesmo que a sua importância no equilíbrio ecológico seja elevada (ABREU & PFENNING, 2008; MOREIRA et al., 2008). De acordo com Simões et al. (2013a), não há um consenso sobre o número total de espécies fúngicas existentes no mundo (Tabela 1).

Tabela 1. Estimativas mais comuns do número mundial de espécies fúngicas

Publicação	Número estimado de espécies
Hawsworth (1991)	1.500.000
Hammond (1992)	1.000.000
Rossmann (1994)	1.000.000
Hammond (1995)	1.000.000
Cannon (1997)	9.900.000
Fröhlich e Hyde (1999)	1.500.000
May (2000)	500.000
Hawsworth (2001)	2.270.000
O’Brein et al. (2005)	3.500.000 – 5.100.000
Schmit e Mueller (2007)	712.000
Mora et al. (2011)	611.000

FONTE: SIMÕES et al. (2013a)

O primeiro estudo da diversidade da microbiota presente nos solos, foi relatado por Farrow (1954), onde foram identificadas 135 espécies de fungos provenientes de 31 amostras de solos da Costa Rica e Panamá, por meio da técnica de diluição em placa, sendo encontrados como gêneros mais frequentes: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* Mart, *Trichoderma* e *Chaetomium* Kunze. Deste ano até o final dos anos 90, outros estudos semelhantes foram realizados utilizando esta mesma técnica, os quais muitos encontraram como gêneros mais frequentes *Aspergillus* e *Penicillium* (MOREIRA et al., 2008).

Já no Brasil, o início dos estudos sobre a diversidade fúngica dos solos ocorreu posteriormente, sendo o primeiro sobre este tema efetuado por Katz (1981), onde este estudou a serrapilheira de um solo situado na região de Manaus, AM. Lourd et al. (1986), verificaram que a incidência de fungos patogênicos em solos cultivados e florestas naturais era

semelhante, mas que nos últimos a doença não se manifestava, enquanto nos primeiros sim, concluindo que poderia estar havendo um fenômeno de bioproteção que impede a manifestação dos patógenos. Outros autores fizeram estudos, em solos do Maranhão, Pará e Amazônia, descrevendo a frequência de ocorrência de gêneros fúngicos do solo, encontrando novamente *Aspergillus* e *Penicillium* como os mais frequentes (MOREIRA et al., 2008). Um dado de especial interesse para o presente estudo, sobre a microbiota do solo, é a baixa especificidade de fungos que colonizam a rizosfera vegetal em relação à planta hospedeira (PFENNING, 1997).

Modificações no cultivo do solo podem provocar alterações significativas na frequência de ocorrência de certas espécies fúngicas. Entretanto, uma recuperação relativamente rápida da comunidade pré-existente pode ocorrer caso o solo seja deixado em pousio (FASI et al., 2011). O impacto do desmatamento e queimadas causa alterações mais quantitativas do que qualitativas na comunidade de fungos do solo (GOBERNA et al., 2012).

De acordo com Gama-Rodriguez (1997), Neves *et al.* (2002) e Silva *et al.* (2010), a mensuração das alterações da qualidade do solo, em decorrência de seu manejo intensivo, tem crescido nos últimos anos. Para isto, tem se utilizado determinados atributos do solo, dentre eles, os microbiológicos, como a biomassa e atividade microbiana, e a frequência relativa de gêneros fúngicos e bacterianos, os quais são considerados indicativos sensíveis às alterações na qualidade do solo, causadas por mudanças de uso e práticas de manejo.

Em um estudo realizado por Silva *et al.* (2010), os diferentes sistemas de uso e manejo do solo promoveram alterações no carbono da biomassa microbiana e a relação deste com o carbono orgânico (quanto do carbono orgânico está aprisionado na biomassa microbiana), em todas as profundidades amostradas (0-10 cm, 10-20 cm, 20-30 cm). O maior teor de carbono da biomassa microbiana e maior taxa de “sequestro de carbono foram detectadas no Cerrado nativo, notadamente na profundidade de 0–10 cm. Isso indica uma condição mais favorável à microbiota do solo, atribuída possivelmente, ao maior aporte contínuo e variado de substratos orgânicos provenientes da maior diversidade de espécies na vegetação nativa, e com diferentes graus de suscetibilidade à decomposição. Os diferentes sistemas de uso e manejo do solo avaliados foram: 1. Cultivo convencional com batata, 2. Cultivo convencional com batata, sucedido por aveia e rotacionado com milho, 3. Cultivo convencional com milho, 4. plantio direto com milho, 4. Cultivo convencional com eucalipto, 5. Cerrado nativo.

Em solos de regiões tropicais e temperadas, a frequência de espécies cosmopolitas é elevada. Contudo, as espécies tipicamente tropicais ocorrem em solos temperados com

menores frequências. Há diferenças quantitativas e qualitativas nas comunidades fúngicas de solos tropicais e temperados, contudo, as diferenças quantitativas se sobressaem (THROCKMORTON et al., 2010).

Em regiões de clima temperado com formações vegetais mais homogêneas e com menor riqueza de espécies, a correlação entre comunidade de fungos, tipo de vegetação e condições edafoclimáticas é suficiente para prever, com baixa probabilidade de erro, as comunidades fúngicas que ocorrerão com maior frequência. Já em regiões de clima tropical, tal previsão não é ainda possível. Tal diferença é devida não somente ao maior número de estudos realizados nas regiões de clima temperado, como também em virtude do fato das regiões de clima tropical apresentarem padrão de distribuição menos previsível, em função de sua maior biodiversidade (JUMPPONEN & JONES, 2009).

O solo florestal é um habitat que oferece ambiente propício ao desenvolvimento microbiano. E a participação da microbiota do solo no funcionamento e sustentabilidade dos ecossistemas é bem reconhecida (MOREIRA et al., 2008). Os resultados do estudo realizado por Nie et al. (2012), sugerem que a comunidade fúngica é mais sensível do que a bacteriana, no tocante à caracterização dos impactos oriundos de coberturas vegetais plantadas em relação às naturais, e que nas florestas naturais a diversidade fúngica é significativamente maior que nas florestas plantadas.

Fraga *et al.* (2010) concluíram que os principais gêneros presentes nos solos cultivados com as espécies florestais *Pinus* Engelm e *Corymbia* Engelm foram *Penicillium* e *Aspergillus*, e observou também que as espécies fúngicas isoladas destes solos cultivados sofreram uma variação quantitativa e qualitativa em função das diferentes condições de temperatura e umidade à época de coleta. O número de espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* se concentrou em determinadas épocas de coleta (de um total de 5 coletas realizadas), enquanto as espécies de *Penicillium* se apresentaram com uma distribuição homogênea nas cinco coletas. As espécies mais abundantes foram: *Penicillium decumbens* Thom, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium griseofulvum* Dierckx e *Penicillium purpurogenum* Flerov. E as consideradas raras foram: *Aspergillus auricomus* (Gueg) Saito, *Aspergillus candidus* Link, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niveus* Blochwitz, *Aspergillus sojae* Sakag & Yamada, *Aspergillus ustus*, *Eupenicillium javanicum* (J. F. H. Beymann) Stolk, *Penicillium brevicompactum* Dieckx, *Penicillium chrysogenum* Thom, *Penicillium crustosum* Thom, *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc., *Penicillium expansum* Link, *Penicillium rugulosum* Thom e *Penicillium vulpinum* (Cooke & Masee) Seifert & Samson. O

número total de fungos foi de 190 isolados, pertencentes a cinco gêneros e 54 espécies diferente, sendo 32 *Penicillium* spp. e 19 *Aspergillus* spp.

Fraga e Pereira (2010), identificaram 32 espécies dentro de 13 gêneros ao longo de 3 terços (inferior, médio e superior) de uma duna localizada na Restinga de Marambaia-RJ, área que se destaca por apresentar florestas de encosta, com elementos típicos de Serra do Mar e um mosaico vegetacional que recobre as planícies arenosas, por dunas de até 30 m de altura, com cerca de 40 km de extensão. Os gêneros que apresentaram as maiores ocorrências foram *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma*. A espécie *Trichoderma pseudokoningi* foi à única encontrada nos três diferentes terços da duna. A maior riqueza ocorreu no terço médio com 23 espécies, seguida do terço superior com 20 e terço inferior com 17. Uma espécie (*Trichoderma pseudokoningi*), porém, foi comum entre as áreas, sugerindo que a restinga apresenta grande diversidade fúngica. *Aspergillus* e *Penicillium* também foram os 2 gêneros mais representativos nos solos dos municípios da região de Xango no Brasil, de acordo com o estudo realizado por Cavalcanti et al. (2006).

O predomínio dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* parece ocorrer também nos solos onde não há cobertura vegetal natural ou arbórea, visto que estes também foram os mais frequentes nos isolamentos ocorridos na região da rizosfera de meloeiros plantados em um solo situado no Vale de São Francisco, em Petrolina-PE. Do total de 78 espécies encontradas, 15 pertenciam ao gênero *Aspergillus* e 13 ao *Penicillium* (COUTINHO et al., 2010).

Em um estudo feito em Paracambi, RJ (Mata Atlântica) cujo objetivo foi fornecer dados para uma melhor compreensão entre a interação de micro-organismos e fatores ambientais, onde foram avaliadas diferentes áreas, algumas com forte e outras com fraco grau de antropização, Fraga et al. (2012), concluíram que tanto na serrapilheira como no solo, foi observada uma distribuição diferenciada dos micro-organismos devido a variação da UR e T, sendo as bactérias as predominantes, padrão este também observado para as diferentes áreas.

Em solos da alta Galileia em Israel, foi encontrada a espécie *Penicillium simplicissimum* (Oudem.) Thom como dominante, tanto em solos cultivados como em não cultivados. Neste mesmo estudo, foi concluído que a atividade agrícola prolongada pode diminuir a diversidade de fungos (GRISHKAN & NEVO, 2008).

Em um estudo realizado por Aburjaile et al. (2012), cujo objetivo foi avaliar as alterações de atributos microbiológicos da serrapilheira e da camada superficial do solo, em decorrência da substituição de cobertura florestal nativa por plantações de eucalipto, em diferentes sítios florestais da região de São José do Buriti - MG, foi observado que a

diversidade microbiológica em solos de cerrado preservado e em solos de plantio de Eucalipto é diferente. No que diz respeito a quantificação de micro-organismos, os resultados se assemelham em ambas as áreas verificadas, porém, a quantidade de morfotipos de fungos e bactérias se apresentou superior nas áreas de Cerrado nativo do que nas áreas de plantio de Eucalipto. Observa-se que o Cerrado apresenta microhabitats mais satisfatórios, oferecendo condições favoráveis para o crescimento bacteriano, por causa da disponibilidade de água e substrato (matéria orgânica variada), difusão de gases e proteção contra predadores.

Ainda de acordo com Aburjaile *et al.* (2012), diante dos conhecimentos atuais, o uso da diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo vem avançando de maneira notável. Isso porque tem sido consensual o fato da diversidade microbiana possuir importantes vantagens como indicador de qualidade do solo.

2.4 Caracterização do Cerrado, Mata Atlântica e área de transição

O Cerrado tem como característica climática verões chuvosos e invernos secos, temperaturas médias entre 21,3 °C e 27,2 °C e precipitação de 1500 mm +/- 500 mm, e pode atingir, em algumas regiões e épocas do ano, UR abaixo de 10%. A maioria dos solos presentes neste bioma é classificado como Latossolo, de relevo plano a leve ondulado, e distróficos. Considerando que o Cerrado é o segundo maior bioma presente no Brasil, ocupando mais de 20% do território nacional, presente em 10 Estados, e que 60% da expansão da fronteira agrícola nos últimos 40 anos se deu neste bioma, pode-se perceber o quanto o desenvolvimento de tecnologias ligadas à fertilidade do solo é importante para o desenvolvimento da agricultura nacional (EMBRAPA, 2005; COUTINHO, 2006).

Embora seja considerada uma das regiões de maior biodiversidade do planeta, a Mata Atlântica é, paradoxalmente, uma das mais ameaçadas do mundo. Para Peixoto (1991/92), comparando-se a biodiversidade da Mata Atlântica com outras regiões tropicais, os dados de maior destaque são o grande número de espécies da família *Myrtaceae* e a quantidade de fungos associados à rizosfera. Hawsworth (2001), indicou que grande parte das espécies de fungos não conhecidas deve ser encontrada em florestas tropicais, enfatizando a necessidade de amostragens nessas regiões.

A regeneração de áreas degradadas e a racionalização da utilização das terras agrícolas se constituem em um desafio para proteção dos recursos naturais, em um contexto onde tem aumentado a destruição dos habitats tropicais. A frequência de ocorrência de fungos patogênicos para plantas e seus antagonistas naturais, assim como outras informações a

respeito da estrutura e composição das populações de fungos, podem consistir em bons indicativos sobre o nível de estabilidade das comunidades de organismos do solo, e o grau de interferência na biota do solo em florestas perturbadas (MOREIRA et al., 2008).

O Brasil é um país com enorme biodiversidade, abrigando mais de 10% de todos os organismos descritos na Terra. Mesmo que a maioria das discussões sobre diversidade focalize a região Amazônica, é fundamental lembrar que os ecossistemas denominados Cerrado e Mata Atlântica, são da mesma forma muito ricos em espécies endêmicas, além de se constituírem em biomas genuinamente brasileiros. Mais de 11 milhões de ha de florestas tropicais foram convertidas em plantações, pastagens e possuem ocupação humana desordenada, portanto, a conservação da diversidade biológica, especialmente, em áreas ainda não degradadas, é prioridade mundial (PINTO et al., 2002). A área de transição entre Cerrado e Mata Atlântica ocupa 30.490.310 ha, correspondendo a aproximadamente 3,5% da área do território nacional (MAZZETTO SILVA, 2009).

Tradicionalmente, distinguem-se como fatores condicionantes para a separação entre os biomas Mata Atlântica e Cerrado, certas características relativas aos solos deste último. Entre as teorias mais aceitas, está a de que os solos sob os Cerrados apresentam elevados teores de toxicidade relativa ao alumínio, tais que apenas as plantas adaptadas à convivência com este macroelemento conseguiriam perseverar. Adicionalmente, acrescenta-se que a presença de Neossolos Litólicos, Cambissolos e outros solos rasos, especialmente nas áreas topograficamente mais elevadas, também constituiriam ambientes singulares (campos rupestres), inóspitos para a maior parte das espécies de Mata Atlântica (WALTER, 2006).

2.5 Aplicações da enzima fitase e de MSP na agropecuária

A fitase (mio-inositol-hexaquisfosfato fosfohidrolase) é uma fosfatase, capaz de iniciar a defosforilação inicial do fitato (mio-inositol-hexaquisfosfato) a inositol e fosfato inorgânico, tornando o fósforo disponível para as plantas. O ácido fítico serve como reserva de fósforo nas sementes de plantas, como por exemplo cereais (milho, cevada, trigo e aveia), que são comumente usados como ingredientes para ração animal, e têm níveis similares de fitato, aproximadamente 0,25% de matéria seca. Em média 70% do total de fósforo nos ingredientes dos alimentos são encontrados na forma de fitato (MAENZ, 2001; ASCHERI et al., 2012).

Três terminologias são utilizadas para descrever o substrato da enzima fitase: ácido fítico, fitato e fitin. O ácido fítico é a forma livre do mio-inositol hexaquisfosfato ou IP6. Fitato

é a forma aniônica do IP6, encontrado nas plantas. O termo fitin refere-se especificamente aos complexos de IP6 com K, Mg e Ca, e pode às vezes também estar ligado a proteínas e amidos (ANGEL et al., 2002; SELLE & RAVINDRAN, 2008).

A tentativa de utilizar micro-organismos para disponibilizar o fósforo presente no solo não é recente. Na década de 1950, foi comercializado na antiga União das Repúblicas Socialistas Soviéticas (URSS), um produto denominado fosfobacterin, o qual consistia em uma mistura de caulim e esporos de bactérias da espécie *Bacillus megatherium* de Bary var *phosphaticum*, e seu principal objetivo era aumentar as taxas de disponibilização do fósforo orgânico do solo para as plantas. Contudo os efeitos deste produto não foram confirmados (MENDES & REIS JUNIOR, 2003).

Um dos subprodutos da pecuária é o estrume, o qual por conter uma quantidade demasiada de fosfato em sua composição (aquele que não foi aproveitado na alimentação animal), pode vir a contribuir para o problema global da eutrofização, que ocorre quando este fosfato atinge rios, e propicia o crescimento de cianobactérias e algas, provocando a hipoxia (carência de oxigênio) desses ecossistemas e a consequente morte de animais aquáticos, visto que, a proliferação demasiada destes, consome grande parte do oxigênio presente na água, impedindo a respiração da fauna local (BANERJEE et al., 2004). Uma maneira de contribuir para a solução deste problema é a suplementação de fitase na dieta animal, reduzindo para 30 % a quantidade de fosfato presente no estrume (PANDEY et al., 2001).

A molécula de fitato é um grande fator antinutricional para animais monogástricos, (MIYAOKA, 2013). Dentre os minerais exigidos pelas aves, o P e o Ca são considerados os mais importantes (BONATO et al., 2001; PENA et al., 2013). Segundo Classen et al. (1985) e Lyons (1996), a alimentação de frangos de corte tem sua base em alimentos de origem vegetal, que são uma importante fonte de P, porém de acordo com Brandão et al. (2007) a maior parte (aproximadamente 66 % do P na forma de fitato) encontra-se combinado com o inositol, formando uma ampla variedade de sais insolúveis, diminuindo assim a solubilidade e a digestibilidade dos nutrientes. Segundo Ravindran et al. (1995), a habilidade de aves em utilizar o P fítico é baixa, portanto a biodisponibilidade deste elemento nos ingredientes de origem vegetal também é muito baixa, necessitando da adição do P inorgânico nas rações, consequentemente elevando o custo da alimentação.

Um dos adventos históricos que sinaliza a importância da utilização da fitase no cenário agropecuário mundial, é o da proibição da adição de farelo de carne e ossos à ração de criação de animais monogástricos, a qual gerou, teoricamente, uma demanda mundial de 110

mil ton de P elementar, visto que tais farelos forneciam 57% do P adicionado as rações. Contudo, a utilização da fitase microbiana reduziu essa demanda para 26 mil ton, uma vez que, ao se aplicar às rações esta enzima, a mesma aumenta a biodisponibilidade de P naquelas, permitindo que uma maior nutrição de P seja proporcionada para os animais, por uma mesma quantidade de ração (SELLE & RAVINDRAN, 2008).

A possibilidade de expressão da fitase microbiana em plantas as quais serão utilizadas na alimentação animal é de especial interesse na atualidade. Embora uma expressão eficiente destas enzimas em plantas transgênicas seja tecnicamente factível, dados a respeito das propriedades destas enzimas nestas condições são escassos. O gene *phyA*, proveniente do DNA de *Aspergillus ficuum* (Reichardt) Thom & Currie, o qual codifica a expressão da fitase deste fungo, foi introduzido em plantas de Tabaco e expresso nas folhas das mesmas, exibindo as mesmas propriedades catalíticas da fitase extraída do fungo propriamente dito. A expressão da fitase em plantas utilizadas na alimentação de animais da pecuária é uma linha de pesquisa promissora (GEORGE et al., 2005; DA SILVA et al., 2011).

Sob condições controladas de crescimento, vários estudos têm demonstrado um maior crescimento e uma maior nutrição de P das plantas inoculadas com MSP, fato que é muitas vezes atribuído à atividade de solubilização de P dos micro-organismos envolvidos (RODRIGUEZ & FRAGA, 1999; WHITELAW, 2000; GYANESHWAR et al., 2002). Por outro lado, a promoção do crescimento pode não estar exclusivamente associada à solubilização de P, uma vez que a produção de fitohormônios pode estar envolvida (WAKELIN et al., 2006). Em razão de seus altos rendimentos e tolerância a condições ácidas, culturas fúngicas vem sendo utilizadas para produção de fitase desde 1991, apesar do estudo desta enzima ter se iniciado em 1962 (SELLE & RAVINDRAN, 2008; RIBAS JUNIOR, 2012).

Fungos com elevada capacidade de hidrolisar fontes orgânicas de fósforo por meio de secreção de fitase e fosfatase, podem ser usados como eficientes inóculos para exploração de solos orgânicos e nutrição de culturas. Contudo, ainda não foi determinada a quantidade de P, liberado por estes, que se mantém prontamente assimilável às plantas (ASERI et al., 2009).

Conforme já mencionado, a fitase pode ser intracelular ou extracelular, e apenas a última é potencialmente explorável do ponto de vista industrial e agropecuário. Foi encontrada atividade de fitase extracelular em 30 fungos filamentosos, sendo 28 pertencentes ao gênero *Aspergillus*, 1 pertencente ao gênero *Penicillium* e o outro ao gênero *Mucor* (GUIMARÃES et al., 2006).

Na abordagem do uso de MSP como inoculante de sementes, a capacidade dos MSP de competir com outros micro-organismos estabelecidos na rizosfera pode ser baixa, fazendo com que a quantidade de P liberada por eles seja insuficiente para um aumento substancial do crescimento vegetal (RICHARDSON et al., 2009). Neste sentido, uma alternativa seria a substituição da inoculação de sementes com MSP, pelo uso destes para produção de fertilizantes organominerais, a partir da mistura com fosfato de rocha moído, e uma fonte de carbono. Com isto, deve-se produzir biofertilizantes contendo formas solúveis de P a um custo bem mais baixo que os fosfatos solúveis (superfosfatos simples ou triplo), atualmente utilizados (GOLDSTEIN et al., 1993; GOMES et al., 2010).

Por outro lado, plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* L. que expressaram a fitase extracelular de *Aspergillus* sp, foram capazes de satisfazer suas próprias necessidades de fósforo por assimilação direta de fitatos do solo (GEORGE et al., 2009). Experimentos similares foram conduzidos com outras plantas. Espécimes de *Trifolium subterraneum* L. secretaram fitase de *Aspergillus niger* diretamente das células de suas raízes (MUDGE et al., 2006).

Atualmente existem na Austrália e Canadá, produtos utilizando MSP como inoculantes, tais como JumpStart; Philom Bios, no Canadá, à base de *Penicillium bilaiae* Chalab., e na Austrália, o PR-70 Release, produzido pela Bio-Care Technology, utilizando *P. radicum* A. D. Hocking & Whitelaw. Apesar de algumas tentativas comerciais nessa linha existirem no Brasil, como o BioAtivo, produzido pelo Instituto de Fosfato Biológico Ltda, a produção destes biofertilizantes ainda se encontra em um estágio inicial, necessitando de mais resultados de pesquisa, tanto na área de isolamento dos micro-organismos mais eficientes, quanto na determinação de combinações ideais de isolados de MSP, na fonte de fosfato natural e na fonte de carbono, e finalmente na confirmação do valor agrônomo desta tecnologia. Esta tecnologia impactaria a agricultura em função de a) permitir o uso em larga escala de reservas nacionais de fosfato de baixa reatividade; b) reduzir a dependência do país de fertilizantes químicos processados; c) possibilitar uso mais nobre de grandes reservas de matéria orgânica, como esterco bovino e cama de frango, para a produção de fertilizantes organo-minerais, reduzindo o impacto ambiental destes resíduos d) usar esta tecnologia de produção de biofertilizante também na agricultura familiar (GOMES et al., 2010).

Estes MSP seriam produzidos em biofábricas e repassados em doses adequadas aos produtores interessados. Com isso, será possível ao agricultor obter um fertilizante fosfatado eficiente e de custo bem mais baixo que os das fontes de alta solubilidade atuais

(superfosfatos simples e triplo). Outra vantagem desta tecnologia, é que os micro-organismos solubilizadores ficam ativos nos solos, promovendo a solubilização gradativa do P que foi adicionado na forma de fosfato solúvel, e que se encontra adsorvido a partículas do solo e indisponível para as plantas (GOMES et al., 2010; ASCHERI et al., 2012). Contudo, fatores já mencionados nas páginas anteriores, como a impossibilidade de determinar o percentual de fósforo solubilizado por estes micro-organismos que fica prontamente assimilável para as plantas, ou quanto do crescimento de plantas com alta concentração de MSP em sua rizosfera, é devido à solubilização de fosfato e não à produção de fitormônios, e principalmente devido às atuais metodologias de avaliação de eficiência da enzima fitase, o fazerem em condições de laboratório, sendo incapazes de avaliarem tal eficiência em condições agrícolas, tornam o desenvolvimento de MSP capazes de proporcionar, de fato, economia em adubação fosfatada , algo a curto prazo, pouco provável (DE DONATO, 2013).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local de estudo

3.1.1 Georeferenciamento da região

Os fragmentos florestais se encontram no município de Sete Lagoas - MG, na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, situada aproximadamente entre as Latitudes: $19^{\circ} 26' 10''$ e $19^{\circ} 27' 38''$ e a Longitude: $44^{\circ} 08' 52''$ e $44^{\circ} 11' 10''$ e altitude média de 710 m.

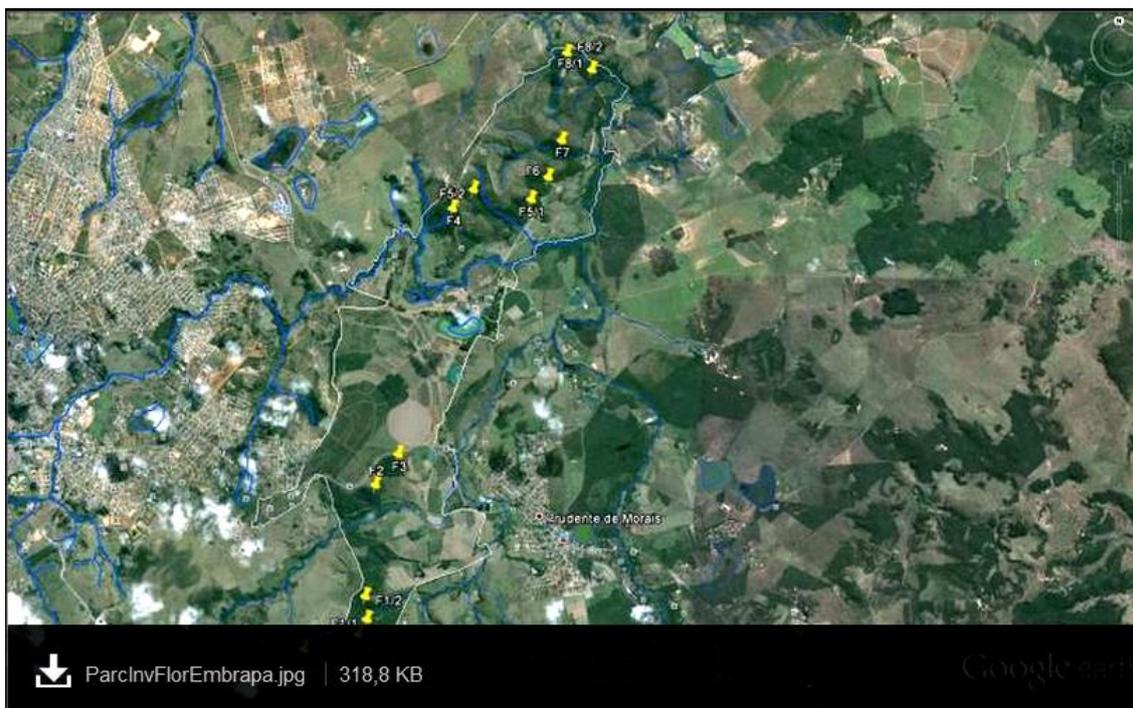


Figura 1. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG

3.1.2 Análise dos dados climáticos

Os dados climáticos foram obtidos da estação meteorológica da Embrapa Milho e Sorgo, situada dentro da própria área experimental, em Sete Lagoas - MG. A distância máxima da estação do INMET, dentro da área experimental, aos fragmentos florestais estudados é de aproximadamente 8 km.

Na primeira coleta (C1), a média mensal das temperaturas diárias médias (Tmed) foi $22,8^{\circ}\text{C}$, enquanto a média mensal das temperaturas diárias máximas (Tmax) e mínimas (Tmin) foi 29°C e 18°C , respectivamente. Já para a segunda coleta (C2), Tmed foi igual a $18,7^{\circ}\text{C}$, enquanto Tmax e Tmin foram $26,8^{\circ}\text{C}$ e 12°C , respectivamente. O gráfico com estes dados se encontra disponível no anexo A. A temperatura máxima registrada no mês da coleta C1 foi $35,4^{\circ}\text{C}$ e a mínima foi $15,1^{\circ}\text{C}$. Para C2, tais temperaturas foram $31,8^{\circ}\text{C}$ e 8°C .

A precipitação pluviométrica média (Ppm), no mês em que foi realizada a primeira coleta, foi 12,37 mm, enquanto a evapotranspiração média (Evp_m) foi 2,42 mm, totalizando um balanço hídrico médio (Bhm) de 9,95 mm, conseqüentemente, 298,5 mm de chuva se acumularam na região (Anexo B). Já para C2 o balanço hídrico do mês foi negativo. A média diária da umidade relativa do ar no mês de janeiro de 2012 variou entre 55% e 97%, enquanto em C2 entre 32% e 74 % (Anexo C).

3.1.3 Análises florísticas dos pontos de coleta de solo

Os fragmentos ocorrentes na fazenda experimental da Embrapa foram amostrados por meio do método de parcelas (MUELLER-DOMBOIS & ELLENBERG, 1974) observando-se as recomendações do protocolo de Medições de Parcelas Permanentes da Rede de Manejo Florestal (Comitê Técnico Científico da Rede de Manejo Florestal da Caatinga, 2005), com parcelas de 20 x 20 m, orientadas no sentido N-S, L-O, distantes 100 m da borda do fragmento, para o inventário fitossociológico. De posse do mapa da área e da estratificação dos fragmentos por feição (topos de morro, vegetação ciliar, encostas e interflúvio), foram lançadas 27 parcelas. Foram amostrados todos os indivíduos arbustivos ou arbóreos que possuíam diâmetro a altura do peito de 1,30 m (DAP) \geq 5 cm, e foram anotadas as espécies, o nome vulgar, o DAP, utilizando uma suta graduada em milímetros, e altura das árvores, com hipsômetro. A frequência relativa das diferentes famílias arbóreas ao longo dos fragmentos se encontra disponível no anexo E.

A altura média das árvores dos diferentes fragmentos se manteve entre um mínimo de 8,62 m e um máximo de 12,07 m, enquanto a declividade média do terreno (em graus) entre e 5° e 26,5°. Já o Índice de Shannon esteve entre 2,19 e 2,92. Informações mais detalhadas sobre estas características dos fragmentos se encontram disponíveis no anexo D.

Foram coletados material botânico de todos os indivíduos. Para as árvores altas foi contratado profissional para trabalho em altura. O material botânico, após ser etiquetado e prensado, foi identificado pela curadora do Herbário PAMG/EPAMIG (Herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais), Andréia Fonseca Silva, pela comparação com material-tipo “*typus*” ou chaves taxonômicas. A classificação adotada foi a APG II, e as exsiccatas foram depositadas no Herbário.

3.2 Amostragem do solo

As amostras foram coletadas em duas diferentes épocas, a primeira no final de janeiro de 2012 (C1), e a segunda no início de setembro de 2012 (C2). C1 foi realizada três dias após um período de quatro dias de intensa chuva, onde no total houve uma precipitação de 101,2mm. C2 foi realizada 22 dias após uma chuva atípica de 0,4 mm ocorrida durante o período de estiagem. Foram amostrados 8 fragmentos florestais distintos, sendo que 3 deles foram subdivididos em 2 sítios, em virtude da área extensa dos mesmos. De cada fragmento e sítio foram retiradas três amostras, uma da camada de serrapilheira do solo, outra da profundidade de 0 a 5 cm, e a última da profundidade de 5 a 10 cm, com três repetições para cada amostra.

3.3 Quantificação e isolamento da micobiota

Cinco gramas de solo ou serrapilheira de cada amostra foram diluídas em 45 mL de água peptonada 1% contendo 0,1 mL de uma solução dispersante (Tween). A solubilização total foi feita por meio de um agitador a 150 RPM durante 30 min. Desta suspensão homogênea, foi retirado 1 mL e colocado em um tubo de 9 mL de água peptonada, e após a agitação deste em um agitador de tubos, outra alíquota de 1 mL deste tubo foi retirada e colocada em outro tubo contendo 9mL de água peptonada, e assim sucessivamente, formando as diluições 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} . Foram plaqueadas em meio DRBC 0,1 mL das diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , sendo tal meio seletivo para fungos filamentosos e leveduras. A composição deste meio de cultura está disponível no anexo F.

Cada diluição teve três repetições e cada amostra teve três diluições plaqueadas, dando um total de 9 placas de Petri por amostra de solo. Após os plaqueamentos, foram acondicionadas em câmara de crescimento a uma temperatura de 25 °C durante 4 ou 5 dias, e depois foi efetuada a contagem das UFC e o isolamento dos fungos filamentosos.

Cada UFC considerada morfologicamente distinta foi isolada em tubos contendo 5 mL do meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar). Feito o isolamento, os tubos foram acondicionados em câmara de crescimento a temperatura de 25 °C durante um intervalo de 3 a 15 dias, até que um crescimento significativo se visualizasse. Uma vez constatado tal crescimento, os tubos contendo as colônias isoladas foram acondicionados em geladeira a uma temperatura de 4 °C, até a identificação das mesmas (MURO & LUCHI, 1989).

3.4 Identificação e preservação de fungos

Para identificação dos gêneros foram utilizadas as metodologias de Barnett & Hunter (1998), Davet & Rouxel (2001), Seifert *et al.* (2011) e Guarro *et al.* (2012).

Para preservar as espécies de interesse, foram utilizados dois métodos: Inoculação de esporos em tubos de ensaio contendo aproximadamente 5 mL de BDA, e após constatado crescimento significativo da colônia fúngica, refrigeração à 4 °C. Paralelamente, inoculação de esporos em tubos contendo 5 g de solo estéril, autoclavados três vezes em intervalos de 24h (MURO & LUCHI, 1989).

3.5 Teste de solubilização de fósforo

De cada tubo contendo tais isolados fúngicos, foi retirado um fragmento e semeado em placas de Petri contendo meio de cultura Pikovskaya, e após isto, as placas foram acondicionadas em câmara de crescimento a 25 °C de temperatura por um período de até 10 dias. As colônias que cresceram formando halos em seus entornos no respectivo meio de cultura, foram consideradas produtoras de fitase, e posteriormente armazenadas para identificação (PIKOVSKAYA, 1948; GOMES *et al.*, 2010). A composição do meio de cultura se encontra no anexo G.

3.6 Análises químicas e de perfil do solo

A fertilidade do solo foi avaliada através dos seguintes parâmetros: pH em água (método do potenciômetro), teor de Al (troçável), H + Al, P, K, Ca e Mg (troçáveis) para profundidades de 0-10 cm para solo e a camada de serrapilheira. Os métodos de análise de solos foram os adotados pela Embrapa (Embrapa, 1997). Enquanto para a classificação, foi usada a metodologia do Sistema Brasileiro de Classificação dos Solos.

3.7 Análises estatísticas

A análise de componentes principais (ACP) foi realizada por meio do XLSTAT, cujas variáveis apresentaram correlação de Pearson maiores que 0,7 entre si, relacionadas a composição química do solo. A ACP é utilizada para reduzir as dimensões dos dados e, conseqüentemente, facilitar a análise por meio do gráfico (HERLIHY & MCCARTHY, 2006).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Variações quantitativas da micobiota

4.1.1 Época de coleta chuvosa (C1)

A quantificação da micobiota dos fragmentos florestais estudados pela metodologia de UFC, na época chuvosa, revelou valores médios situados entre um mínimo de $7,8 \times 10^5$ e máximo de $1,6 \times 10^6$ para a serrapilheira; $1,9 \times 10^5$ e 6×10^5 para a profundidade de 0 a 5 cm do solo; e 2×10^5 e $7,3 \times 10^5$ para a profundidade de 5 a 10 cm do solo. A média das médias, da serrapilheira e das duas profundidades anteriormente citadas foram, respectivamente, $1,2 \times 10^6$; 4 e $3,1 \times 10^5$.

Tabela 2. Quantificação da micobiota na época chuvosa (C1) dos fragmentos florestais em UFC (10^5) nas 3 profundidades avaliadas.

F	S	0—5	5—10
1	12,5	4,3	2,6
2	10,1	3,1	3
3	16,5	4,2	2
4	8	5	7,3
5	12,7	4,5	3,1
6	16,3	6	2
7	14,5	3,3	2,7
8	7,8	1,9	2,4

S = Serrapilheira, 0-5 = profundidade de 0 a 5 cm do solo, 5-10 = profundidade de 5 a 10 cm do solo, F = Fragmento florestal

Esta superioridade do número de UFC da serrapilheira em relação ao solo também foi observada por Fraga *et al.* (2012) ao estudar a interação entre micro-organismos, solo e flora na Mata Atlântica, e Osaki e Netto (2013), ao avaliar a distribuição vertical e horizontal da população fúngica numa floresta ombrófila mista.

4.1.2 Época de coleta seca (C2)

A quantificação da micobiota dos fragmentos florestais estudados pela metodologia de UFC, na época seca, revelou valores médios situados entre um mínimo de $3,7 \times 10^5$ e máximo de $6,7 \times 10^5$ para a serrapilheira; $2,2 \times 10^5$ e $4,6 \times 10^5$ para a profundidade de 0 a 5 cm do solo; e $2,0 \times 10^5$ e $2,8 \times 10^5$ para a profundidade de 5 a 10 cm. A média das médias das UFC da

serrapilheira e das duas profundidades anteriormente citadas foram, respectivamente, 6,6; 3 e $2,3 \times 10^5$.

Tabela 3. Quantificação da microbiota na época seca (C2) dos fragmentos florestais em UFC (10^5) nas 3 profundidades avaliadas.

F	S	0—5	5—10
1	6,4	3,4	2,3
2	6,5	2,4	2,2
3	6,7	2,2	2,8
4	3,7	4,6	2,3
5	11,3	2,8	2,4
6	5,8	2,5	2,5
7	6,4	2,8	2,0
8	5,9	3,4	2,1

S = Serrapilheira, 0-5 = profundidade de 0 a 5 cm do solo, 5-10 = profundidade de 5 a 10 cm do solo, F = Fragmento florestal

Assim como na época chuvosa, na época seca a serrapilheira também mostrou ter maior número de UFC que as profundidades de solo avaliadas. Contudo, Osaki e Netto (2013), ao compararem os números de UFC das profundidades denominadas por eles de “zona de transição” e solo, não encontraram diferenças entre o número de UFC destas duas camadas.

4.1.3 Relação entre épocas C1 e C2

Quando comparadas iguais profundidades em diferentes épocas de coleta, todas as profundidades e a serrapilheira avaliadas mostraram ter número de UFC, na época chuvosa, superior à época seca (Tabelas 2 e 3). Entretanto, Fraga *et al.* (2012) e Osaki e Netto (2013) não encontraram diferença entre o número de UFC das amostras coletadas no verão e inverno, o que corrobora para se afirmar que o principal motivo para a diferença entre número de UFC das populações fúngicas coletadas nas épocas chuvosa e seca do presente estudo, seja, de fato, a diferença de umidade no solo entre as duas épocas, pois nos biomas estudados por estes autores citados, não havia uma diferença entre a pluviosidade das épocas de verão e inverno tão grande quanto a do atual estudo. O que caracteriza a estacionalidade climática do bioma do presente estudo pela deficiência hídrica.

Santos e Camargo (1999) afirmam que não só a temperatura como a umidade do solo influem nas relações fisiológicas e características físico-químicas do mesmo, e conseqüentemente no ambiente onde vivem os micro-organismos, e Souto (2006) demonstra claramente que a população fúngica sofre decréscimos consideráveis conforme a umidade do solo diminui.

Este resultado também está de acordo com o observado no estudo feito por Wellbaum (2006) e também foi observado no estudo da micobiota do solo de uma plantação de *Pinus* realizado por Fraga e Pereira (2010), no qual verificaram para a área de *Pinus*, um aumento progressivo das UFCs correlacionado ao aumento da precipitação pluviométrica. Contudo, os resultados de Silva Reis *et al.* (2013) sugerem que a interferência da quantidade de água presente no solo, na composição quantitativa dos fungos, fica restrita até um determinado limite, a partir do qual seu aumento passa a não ter efeitos na micobiota, uma vez que os resultados de Silva Reis *et al.* (2013), concluíram não haver diferença entre a quantidade de fungos presentes no solo obtida nas diferentes lâminas irrigadas. É importante salientar que tal estudo foi realizado em uma região de pluviosidade elevada, e portanto, as baixas lâminas de água não causaram déficit hídrico nos solos. A variação de umidade do solo e o balanço hídrico da região do presente estudo, nas épocas de coleta se encontram presentes, respectivamente, nos anexos C e B.

4.2 Variações qualitativas da micobiota nas diferentes épocas de coleta

Em C1 apenas 2,3 % dos fungos produtores de fitase não pertenciam aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Enquanto em C2 apenas 2,8 %. Os demais gêneros produtores de fitase encontrados foram: *Trichoderma*, *Paecilomyces* Bainier, *Acremonium* Link, *Fusarium*, *Cladosporium* Link. Somente em C2 foram encontrados *Acremonium*, *Fusarium* e *Cladosporium*. A distribuição destes últimos, assim como dos *Aspergillus* sp não produtores de fitase, são apresentados nas tabelas 10 e 11.

Assim como Cavalcanti *et al.* (2006), Coutinho *et al.* (2010), Fraga *et al.* (2010), Fraga *et al.* (2012) e Grishkan e Nevo (2008), e muitos outros autores que realizaram estudos de isolamento e identificação de fungos filamentosos do solo, o presente trabalho observou serem *Aspergillus* e *Penicillium* os gêneros mais frequentes no solo do bioma estudado.

Tabela 4. Distribuição dos diferentes gêneros e espécies de fungos ao longo das profundidades e fragmentos na época chuvosa

Espécie/gênero	Prof	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8,1	F8,2
<i>Aspergillus</i> NPF	S									
	0-5	X	X							X
	5-10	X	X			X				
<i>Aspergillus seção Nigri</i>	S						X	X	X	
	0-5	X	X		X	X			X	X
	5-10	X	X		X	X	X		X	X
<i>Penicillium</i>	S	X	X	X		X	X	X	X	
	0-5	X	X	X		X	X	X	X	X
	5-10	X		X	X	X		X	X	X
<i>Trichoderma</i>	S	X		X		X		X		X
	0-5		X		X		X		X	
	5-10	X		X	X		X	X	X	X
<i>Paecilomyces</i>	S						X			
	0-5							X		
	5-10							X		
<i>Paecilomyces variotii</i>	S						X	X		
	0-5							X		
	5-10							X		
<i>A. versicolor</i>	S						X			
	0-5									
	5-10		X							
<i>A. parasiticus</i>	S					X				
	0-5									
	5-10									
<i>A. flavus</i>	S			X						
	0-5									
	5-10					X				
<i>A. terreus</i>	S			X						
	0-5									
	5-10					X				
<i>A. clavatus</i>	S									
	0-5									X
	5-10									

Prof = profundidade em cm, S = Serrapilheira, 0-5 = 0 a 5 cm do solo, 5-10 = 5 a 10 cm do solo, F = Fragmento florestal

Tabela 5. Distribuição dos diferentes gêneros e espécies de fungos ao longo das profundidades e fragmentos na época seca

Espécie/gênero	Prof	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8,1	F8,2
	SE									
	0—5	X	X							X
<i>Aspergillus</i> NPF	5—10	X	X			X				
	SE						X	X	X	
	0—5	X	X		X	X			X	X
<i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i>	5—10	X	X		X	X	X		X	X
	SE	X	X	X		X	X	X	X	
	0—5	X	X	X		X	X	X	X	X
<i>Penicillium</i>	5—10	X		X	X	X		X	X	X
	SE	X		X		X		X		X
	0—5		X		X		X		X	
<i>Trichoderma</i>	5—10	X		X	X		X	X	X	X
	SE						X			
	0—5							X		
<i>Paecilomyces</i> sp	5—10							X		
	SE									
<i>Paecilomyces variotii</i>	0—5									
	5--10					X				
	SE									
<i>Acremonium</i>	0—5								X	
	5--10									X
	SE									
<i>Fusarium</i>	0—5	X						X		
	5--10									
	SE									
<i>Cladosporium</i>		X								
	SE									
	0—5						X			
<i>A. versicolor</i>	5—10		X							
	SE					X				
	0—5									
<i>A. parasiticus</i>	5—10									
	SE			X						
	0—5									
<i>A. flavus</i>	5—10					X				
	SE			X						
<i>A. terreus</i>	0—5									

	5-10	X
S = Serrapilheira, 0-5 = 0 a 5 cm do solo, 5-10 = 5 a 10 cm do solo, F = Fragmento florestal		

Na coleta C1, foram isolados 907 fungos, destas, 103 (11,35%) apresentaram capacidade de solubilizar P, 121 (13,34%) pertenciam ao gênero *Trichoderma*, 10 (1,1%) pertenciam ao gênero *Aspergillus* sem, contudo, solubilizar P (AspNPF), 48 pertenciam ao gênero *Penicillium* e apresentavam capacidade de solubilizar fósforo e 40 pertenciam à seção *Nigri* do gênero *Aspergillus* e apresentavam capacidade de solubilizar fósforo (AspFnig) (Tabela 6).

Tabela 6. Distribuição numérica dos principais grupos fúngicos avaliados ao longo dos fragmentos florestais na época chuvosa

F	Profund	<i>Penicillium</i>	<i>Trichoderma</i>	Fitase	AspNPF	AspFnig
1	S	2	5	4	1	0
	0-5	3	3	5	0	2
	5--10	2	5	3	0	3
2	S	0	0	1	0	1
	0-5	2	3	4	1	2
	5--10	1	2	3		2
3	S	1	1	0	0	0
	0-5	2	3	2	0	0
	5--10	1	2	2	0	0
4	S	1	0	1	0	1
	0-5	1	2	3	0	1
	5--10	0	3	2	0	1
5	S	2	1	3	1	2
	0-5	5	3	6	0	2
	5--10	4	3	7	0	0
6	S	2	1	2	0	0
	0-5	2	2	4	0	1
	5--10	2	0	4	0	1
7	S	1	2	0	0	0
	0-5	0	3	4	0	2
	5--10	0	0	1	0	0
8	S	1	7	5	0	4
	0-5	1	18	7	1	7
	5--10	1	10	11	0	8

F – fragmentos, AspNPF – *Aspergillus* não produtores de fitase, AspFnig – *Aspergillus* produtores de fitase da seção *Nigri*.

Os números de fungos pertencentes ao gênero *Penicillium* produtores de fitase e o número de isolados pertencentes ao gênero *Trichoderma* foram semelhantes, mas foram superiores ao número de *Aspergillus* não produtores de fitase e *Aspergillus* produtores de fitase pertencentes à seção *Nigri*, e inferiores ao número total de fungos produtores de fitase. Fraga *et al.* (2012) e Santos *et al.* (2007) também encontraram distribuições numéricas distintas entre os grupos fúngicos isolados.

Na coleta C2, foram isolados 947 fungos, 152 (16,76%) apresentando a capacidade de solubilizar P, 131 (13,83%) de *Trichoderma*, 17 (1,8%) de *Aspergillus* sem, contudo solubilizar P (AspNPF), 93 de *Penicillium* e apenas 3 de *Aspergillus* seção *Nigri* (AspFnig) (Tabela 7).

Tabela 7. Distribuição numérica dos diferentes grupos fúngicos avaliados ao longo dos fragmentos florestais na época seca

F	Profund	<i>Penicillium</i>	<i>Trichoderma</i>	Fitase	AspNPF	AspFnig
1	S	2	4	6	1	0
	0-5	10	8	5	1	0
	5--10	6	6	11	0	0
2	S	2	2	1	0	0
	0-5	4	1	4	1	1
	5--10	3	2	4	1	0
3	S	2	5	2	1	0
	0-5	3	2	5	0	0
	5--10	2	2	2	0	0
4	S	2	2	2	0	0
	0-5	7	4	8	0	0
	5--10	3	3	5	0	1
5	S	4	8	3	1	0
	0-5	5	12	13	0	0
	5--10	5	10	5	0	0
6	S	1	3	2	0	0
	0-5	4	5	5	0	0
	5--10	4	3	5	0	0
7	S	1	2	3	0	1
	0-5	3	5	6	0	0
	5--10	4	3	2	0	0
8	S	8	2	4	0	0
	0-5	5	7	9	1	0
	5--10	3	7	11	1	0

F – fragmentos, AspNPF – *Aspergillus* não produtores de fitase, AspFnig – *Aspergillus* produtores de fitase da seção *Nigri*.

Foi observado que das amostras de C2, aproximadamente 19,5% dos fungos solubilizadores de fósforo foram isolados da serrapilheira, enquanto as profundidades de 0 a 5cm e 5 a 10 cm responderam por 46,6% e 33,9% respectivamente. Enquanto na época chuvosa do ano, a serrapilheira forneceu 19% do total de fungos produtores de fitase, e as demais profundidades forneceram 80,95%, havendo pouca diferença no percentual destas. Foi observado que, do total de fungos solubilizadores de fósforo que pertenciam à seção *Nigri* do gênero *Aspergillus*, 20,9% foram provenientes da camada de serrapilheira, 41,9% da profundidade de 0 a 5cm, e 37,20% de 5 a 10 cm do solo. Em contrapartida, Ramos *et al.* (2012), concluíram que na camada de 5-20 cm do solo o número de MSP é superior tanto no período seco como no chuvoso, e também em todos os tratamentos avaliados (sistema de plantio direto e outras técnicas de manejo).

O número total de isolados com capacidade de solubilizar P, os pertencentes ao gênero *Trichoderma*, e os pertencentes ao gênero *Penicillium* com capacidade de solubilização de P, foram semelhantes, mas foram bem superiores ao número de *Aspergillus* não produtores de fitase, e produtores de fitase pertencentes à seção *Nigri* do gênero *Aspergillus*.

4.3 Relação entre épocas C1 e C2

O número de isolados produtores de fitase pertencentes ao gênero *Penicillium* na época de seca foi maior que os da época chuvosa, o que pode ser explicado por 2 motivos, não mutuamente excludentes: O primeiro seria que a biosíntese de enzimas solubilizadoras de fitato, na maioria dos micro-organismos, é induzida por carência de fosforo no solo, e nesta época, devido a maior restrição hídrica, este elemento está menos disponível. Isto consiste em um indicativo no papel da fitase em prover P para as células (IRELAND *et al.*, 2002). O segundo motivo seria que nos solos da Mata Atlântica, existe uma maior riqueza de espécies de *Penicillium* no período de seca do ano, indicando que as espécies deste gênero são bem adaptadas a solos com baixa disponibilidade de água (DA SILVA, 2013).

Na época de coleta chuvosa, entre os fungos de interesse isolados, 19,4 % pertenciam à seção *Nigri* do gênero *Aspergillus*, enquanto que na época de seca esta razão foi de apenas 1,4 %, o que corrobora com Pitt & Hocking (2009), o qual afirma que os *Aspergillus* negros se desenvolvem melhor em temperaturas elevadas.

O número de fungos do gênero *Trichoderma* isolados na época seca foi superior aos isolados na época chuvosa, o que está de acordo com Santos *et al.* (2007) os quais afirmam

que o excesso de umidade no solo não favorece o desenvolvimento dos fungos deste gênero, e que os aspectos climáticos provocam mais variações nas populações fúngicas (em um estudo feito em um solo de Petrolina-CE) que os aspectos edáficos ou florísticos do solo.

4.4 Aspectos químicos do solo

Foi realizada uma Análise de Componentes Principais (PCA) a partir da matriz de correlação para os valores médios de atributos de solo: pH em H₂O, P, K, Ca, Mg, Al, H + Al e matéria orgânica em cada uma das áreas amostrais (de F1 a F8, sendo a última subdividida em F8.1 e F8.2). A variância global dos dados explicada pelos 2 primeiros componentes foi de 78%, sendo 60% e 18% no primeiro e segundo eixos, respectivamente.

Pode-se afirmar que o pH do solo e os teores de Al estão negativamente correlacionados. O mesmo pode ser afirmado em relação aos teores de P e Al e K e Al. Já os teores de Ca e Mg estão positivamente correlacionados. Não foi possível observar nenhuma tendência de agrupamento entre os perfis químicos dos diferentes fragmentos florestais analisados (Figura 2).

A composição química e as características pedológicas dos fragmentos florestais se encontram disponíveis, respectivamente, nos anexos H e I.

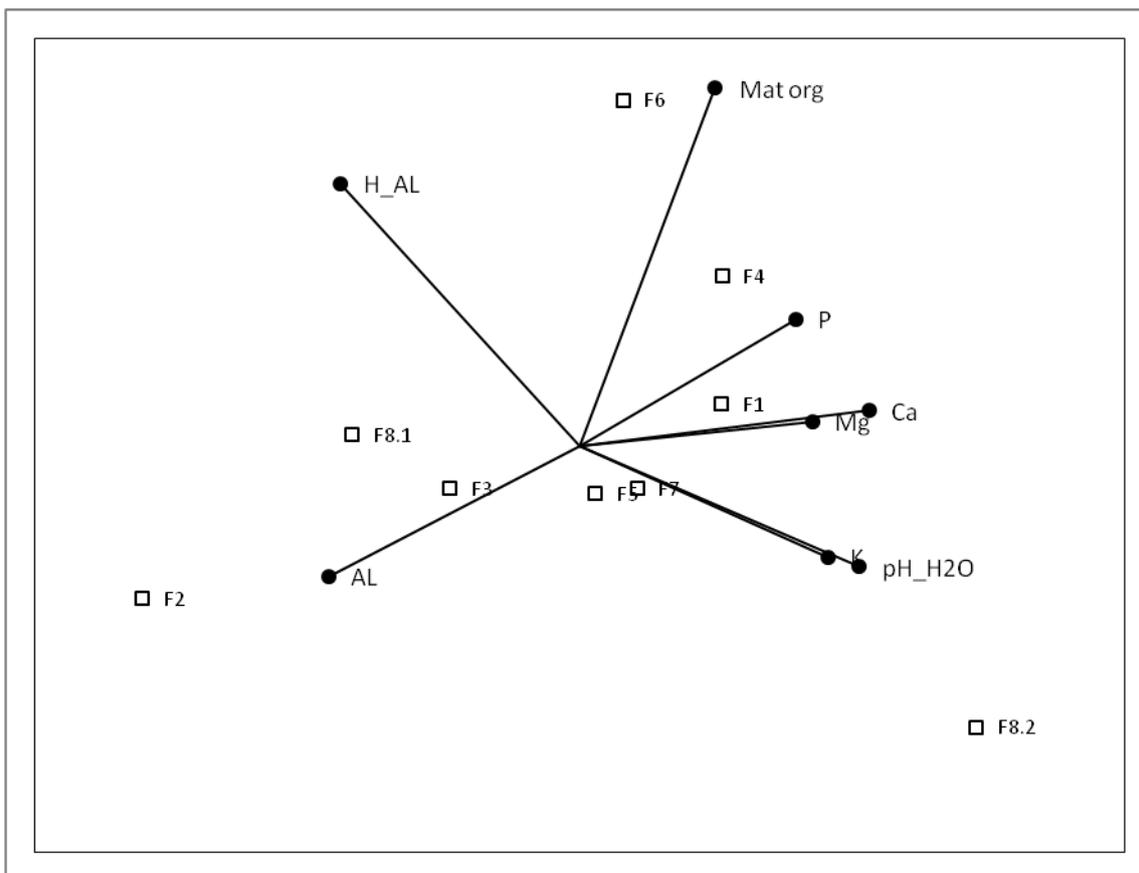


Figura 2. Análise multivariada por componentes principais da composição química dos solos dos fragmentos florestais F1 a F8.

Não foi possível observar qualquer relação nítida entre os níveis de fertilidade do solo dos fragmentos florestais com seus respectivos números médios de UFC. A título de exemplo, os 5 fragmentos mais férteis foram, em ordem decrescente: F8, F1, F4, F5 e F7, enquanto que os 5 fragmentos com os maiores números de UFC foram: F5, F6, F3, F7 e F1. Outras comparações foram realizadas com a obtenção de resultados análogos. Entretanto, Bordignon *et al.* (2012) em um trabalho cujo objetivo foi avaliar o efeito do uso da vinhaça sobre as comunidades microbianas do solo, concluiu que o uso da vinhaça na fertirrigação contribuiu para o aumento das comunidades microbianas do solo. Tal diferença pode ter ocorrido em função do fato de Bordignon *et al.* (2012) ter realizado seu estudo em um solo com cobertura vegetal implantada, enquanto o presente estudo se deu em cobertura vegetal nativa. Santos *et al.* (2008) e Silva *et al.* (2007) também estudaram o efeito da fertirrigação sobre comunidades microbianas, e seus resultados corroboraram com os de Bordignon *et al.* (2012).

Uma correlação entre a quantidade de fósforo presente nos solos e seu respectivo número de UFC seria esperada, pois de acordo com Sylvia *et al.* (1999), N e P são os principais nutrientes exigidos no metabolismo devido às demandas estruturais e funcionais

das células, e Ferreira *et al.* (2008) concluíram que a adição de P ao solo afeta o metabolismo de sua microbiota, fato este indicado pelo aumento expressivo da liberação de CO₂. Contudo, os fragmentos que apresentaram os maiores teores de P foram: F4, F1, F8, F7 e F6, enquanto os que apresentaram maiores números de UFC foram F5, F6, F3, F7 e F1, não sendo possível, portanto, afirmar que foi observada uma nítida correlação positiva entre teores de P e quantidade de UFC do solo.

Nenhum dos parâmetros químicos e de fertilidade do solo, tiveram correlação observada com qualquer grupo fúngico em qualquer profundidade avaliada. Esta ausência de correlação entre fatores químicos e pedológicos com quantidade de fungos solubilizadores de fósforo também foi observada por Neves *et al.* (2010). Contudo, foi observado que dos fragmentos florestais com os maiores valores de pH e matéria orgânica do solo, foram isoladas as maiores quantidades de fungos produtores de fitase, pois os fragmentos com os maiores números de fungos produtores de fitase foram: F5, F1, F8 e F6, enquanto que os fragmentos que apresentaram os maiores valores de pH foram F8, F1, F5 e F4, e os que apresentaram os maiores valores de matéria orgânica foram: F6, F4, F1 e F5. Excetuando estas ligeiras tendências de correlação positiva, nenhuma outra tendência foi observada.

Entretanto, Nahas (2002) em um estudo cujo objetivo foi quantificar a comunidade de micro-organismos mineralizadores de fósforo orgânico, produtores de fosfatases ácida e alcalina, bem como o efeito do tipo de espécie vegetal plantada e o tipo de calagem efetuada sobre tal comunidade, concluiu que a realização da calagem diminuiu o número de fungos produtores de fosfatase, enquanto aumenta o de bactérias, o que pode ser considerado um indício de que, não apenas a fitase fúngica, como as demais enzimas fúngicas que atuam sobre o fósforo, não tem sua produção estimulada por ambientes ricos em fósforo. Em contrapartida, tal estudo não encontrou relação entre adubação e o número destes micro-organismos estudados, o que corrobora com o presente estudo.

Pereira *et al.* (2012), em um trabalho que objetivou testar o impacto das mudanças no uso dos solos do bioma Pampa brasileiro, sob a diversidade microbiana, concluiu que a quantidade de fosfato presente no solo estava negativamente correlacionada com o número de micro-organismos com capacidade de solubilização de P. Em um estudo realizado há mais de 2 décadas, Pang e Kolenko (1986), já haviam encontrado correlação negativa entre a quantidade de fósforo presente no solo, e o número de fungos com capacidade de solubilização de fósforo. O presente estudo não observou esta correlação negativa.

Estirpes de organismos solubilizadores de fosfato exibem variação e instabilidade no que diz respeito a esta atividade, para que estudos posteriores avaliem a eficiência enzimática dos isolados do presente estudo, quanto a solubilização de fosfato, estes devem ser repetidamente subcultivados, para que a persistência desta capacidade de solubilização seja avaliada (GOMES et al., 2010).

4.5 Aspectos florísticos

Não foi observada relação entre a frequência de famílias de espécies arbóreas nos fragmentos florestais estudados, e o número de UFC dos mesmos. Em contrapartida, Santos *et al.* (2008) afirmam que a cultura plantada afeta a densidade de micro-organismo no solo. As diferenças entre tais resultados provavelmente são devidas ao fato deste autor ter estudado os efeitos de plantios monoculturais sobre o número de UFC dos micro-organismos, enquanto o presente estudo avaliou áreas com cobertura vegetal nativa.

Não foi observada relação entre os índices de diversidade vegetal e o número de UFC do solo, entretanto, Fraga *et al.* (2012), observou que uma menor diversidade vegetal, favorece o crescimento de determinadas espécies de micro-organismos que tem preferência por aquele tipo de vegetação, reduzindo a competição intra-específica e levando ao aumento do número de UFC da serrapilheira.

O número de famílias botânicas das espécies arbóreas encontradas foi elevado, sendo superior à 20 famílias. A predominância das famílias dentro de cada fragmento florestal foi bastante diversa, mas pôde ser observado que as famílias *Fabaceae* e *Anacardiaceae* estiveram dentre as 5 mais numerosas na maioria dos fragmentos estudados (Anexo E)

Foi observado que nos fragmentos onde foram isoladas as maiores quantidades de fungos solubilizadores de P, havia um predomínio de espécies da família *Fabaceae* (tabela 8). Fora esta família botânica, não foi observada nenhuma outra relação entre estas e número de fungos produtores de fitase, ou outros grupos fúngicos avaliados, dos fragmentos. A ausência de relação entre a diversidade de espécies arbóreas e o número de fungos solubilizadores de P isolados, corrobora com Da Silva *et al.* (2011).

Tabela 8. Distribuição das frequências da família *Fabaceae*, de outras famílias e de árvores mortas nos fragmentos florestais

F	1	2	3	4	5	6	7	8
---	---	---	---	---	---	---	---	---

Fab	52	11,18	4,2	13,3	9,1	21	13	17,6
outras	37,6	77,42	91,8	79,3	86,7	73	76,7	76,7
Mortas	10,4	11,4	4	7,4	4,2	6	10,3	5,7

Fab = *Fabaceae*. Em vermelho estão os fragmentos de onde foram isolados os maiores números de fungos produtores de fitase, e uma das famílias botânicas que predominou em todos eles.

Esta ausência de relação entre frequência de grupos fúngicos com características florísticas, pode ser, de certa forma, prevista, uma vez que, analogamente, Pfenning (1997), em um estudo efetuado na região leste da floresta Amazônica brasileira, encontrou uma baixa especificidade de fungos que colonizam a rizosfera vegetal em relação à planta hospedeira, enquanto Dutra *et al.* (2005), estudando a diversidade da microbiota fúngica de solo em matas de galeria da reserva biológica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, *Campus* Campo Grande, concluiu que efeito do tipo de mata não foi significativo sobre a composição de espécies de fungos.

CONCLUSÕES

O número de UFC da serrapilheira é superior ao das camadas de 0-5 cm e 5-10 cm do solo, em ambas as épocas de coleta; chuvosa e seca.

Quando comparada as coletas das duas épocas, a serrapilheira da época chuvosa teve número de UFC superior.

O número de fungos produtores de fitase do gênero *Penicillium* da época seca, foi superior à época chuvosa.

O número de fungos produtores de fitase do gênero *Aspergillus* da seção *Nigri* da época chuvosa, foi superior à época seca.

O número de fungos do gênero *Trichoderma* foi superior na época seca em relação à época chuvosa.

O número total de fungos produtores de fitase, independente do gênero, foi maior na época seca de coleta.

Os grupos fúngicos presentes em maiores quantidades, na época chuvosa e na seca, foram: os produtores de fitase, seguidos por fungos do gênero *Trichoderma* e do gênero *Penicillium* produtores de fitase, e por último, fungos do gênero *Aspergillus* não produtores de fitase, juntamente com produtores de fitase da seção *Nigri* do gênero *Aspergillus*.

Os solos situados na região Central de Minas Gerais possuem uma elevada diversidade de microbiota, e são potencialmente exploráveis no tocante à obtenção de fungos solubilizadores de fósforo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, L. M.; PFENNING, L. H. Diversidade de microfungos em solos tropicais. In: MOREIRA, M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras, MG: Ed.UFLA, 2008, 444-481p.
- ABURJAILE, S. B.; DA SILVA, M. P.; BATISTA, E. A. F. S.; BARBOSA, L. P. J. D. L.; BARBOSA, F. H. F. Pesquisa e caracterização da diversidade microbológica do solo, na região de São José do Buriti–MG, em decorrência da substituição de cobertura florestal nativa (Cerrado) por plantações de eucalipto. **Ciência Equatorial**, v. 1, n. 2, p. 70-77, 2012.
- ACHAL, V.; SAVANT, V. V.; REDDY, M. S. Phosphate solubilization by a wild type strain and UV-induced mutants of *Aspergillus thuringiensis*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 695-699, 2007.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**, New York, John Willey, 1996.
- ANGEL, R.; TAMIM, N. M.; APPLGATE, T. J. Phytic acid chemistry: influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 11, p. 471-480, 2002.
- ARAÚJO, A. P.; MACHADO, C. T. T. Fósforo. In: FERNANDES, M.S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: UFV, 2006, p. 253-280.
- ASCHERI, J. L. R.; DE SOUZA, V. F.; REBELLO, F. D. F. P. Fitase: Aspectos gerais e suas principais aplicações. **Acta Tecnológica**, v. 6, n. 2, p. 69-76, 2012.
- ASERI, G. K.; NEELAM, J.; TARAFDAR, J. C. Hydrolysis of organic phosphate forms by phosphatases and phytase producing fungi of Arid and Semi Arid soils of India. **American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.**, v. 5, n. 4, p. 564-570, 2009.
- BALIGAR, V. C.; FAGERIA, N. K. Nutrient use efficiency in plants. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 32, p. 921-950, 2001.
- BANERJEE, R. R.; RANGWALA, S. M.; SHAPIRO, J. S.; RICH, A. S.; RHOADES, B.; QI, Y.; LAZAR, M. A. Regulation of fasted blood glucose by resistin. **Science Signaling**, v. 303, n. 5661, p. 1195, 2004.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. **The American Phytopathological Society**, n. 4, p. 217, 1998.
- BAREA, J. M.; POZO, M. J.; AZCÓN, R.; AGUILAR, C. A. Microbial cooperation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 56, n. 417, p. 1761-1778, 2005.
- BOHEKOUT, T.; GUEIDAN, C.; DE HOOG, S.; SAMSON, R.; VARGA, J.; WALTHER, G. Fungal taxonomy: New developments in medically important fungi. **Current Fungal Infection Reports**, v. 3, p. 170-180, 2009.

BONATO, E. L.; ZANELLA, I.; ROSA, A. P. Efeito da adição de enzimas em dietas com níveis crescentes de farelo de arroz integral sobre o desempenho de frangos de corte. In: **CONFERÊNCIA APINCO**. 2001. p. 32.

BORDIGNON, A. J.; DELFINO, E. R.; MARTINS, N. M.; SILVA, R. F. D.; BATISTOTE, M. Quantificação da microbiota de solos fertirrigados com vinhaça. **Cadernos de Agroecologia**, v. 7, n. 2, p. 1-3, 2012.

BRANDÃO, P. A.; COSTA, F. G. P.; BRANDÃO, J. S.; SILVA, J. H. V. Efeito da adição de fitases em rações de frango de corte, durante as fases de crescimento e final. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 492-498, 2007.

CARNEIRO, M. A. C.; SOUZA, E. D.; REIS, E. D.; PEREIRA, H. S.; AZEVEDO, W. D. Atributos físicos, químicos e biológicos de solo de cerrado sob diferentes sistemas de uso e manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 1, p. 147-157, 2009.

CAVALCANTI, M. A. Q.; OLIVEIRA, L. G.; FERNANDES, M. A.; LIMA, D. M. Fungos filamentosos isolados do solo em municípios da região Xingó, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v. 20, n. 4, p. 831-837, 2006.

CLASSEN, H. L.; CAMPBELL, G. L.; ROSSNAGEL, B. G. Studies on the hull barley in chick diets: deleterious effects and methods of evaluation. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 65, n. 3, p. 725-733, 1985.

Comitê Técnico Científico da Rede de Manejo Florestal da Caatinga. **Rede de manejo floresta da Caatinga: protocolo de medições de parcelas permanentes**. Associação Plantas do Nordeste, 2005.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A.; MACÍAS-RODRIGUEZ, L.; CORTÉS-PENAGOS, C.; LOPEZ-BUCIO, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 149, n. 3, p. 1579–1592, 2009.

COUTINHO, L. M. O conceito de bioma. **Acta Botânica Brasílica**, v. 1, n. 20, p. 13-23, 2006.

COUTINHO, F. P.; CAVALCANTI, M. A. Q.; YANO-MELO, A. M. Filamentous fungi isolated from rhizospheres of melon plants (*Cucumis melo* cv. Geld) cultivated in soil with organic amendments. **Acta Botânica Brasílica**, v. 24, n. 1, p. 292-298, 2010.

DAVET, P. ROUXEL, F. Detection and Isolation of Soil Fungi. **National Brain Research Centre**, v. 81, n. 2, p. 1-161, 2001.

DA SILVA, A. C. S.; JUNIOR, A. F. C.; OLIVEIRA, L. A.; CHAGAS, L. F. B. Ocorrência de bactérias solubilizadoras de fosfato nas raízes de plantas de importância econômica em Manaus e Rio Preto da Eva, Amazonas. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. 1, p. 37-42, 2011.

DA SILVA, L. R. C. **Espécies de *Penicillium* em solos de Caatinga e Mata Atlântica, produção de tanase e potencial micotoxigênico**. 2013. 202f. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) Faculdade de Biologia, UFPE, Recife.

DE DONATO, A.; FRAGA, M. E.; MAIA, T. F. Bioprospecção de fungos produtores de fitase. **RAPP**, v. 21, p. 207-221, 2013.

DIAS, M. C.; VIEIRA, A. O. S.; NAKAJIMA, J. N.; PIMENTA, J. A.; LOBO, P. C. Composição florística e fitossociologia do componente arbóreo das florestas ciliares do rio Iapó, na bacia do rio Tibagi, Tibagi, PR. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 21, n. 2, p. 183-195, 1998.

DUTRA, P. F. F.; ARRUDA, A. L.; ZUCCO, C. A.; MARQUES, M. R.; BOSCO, C. D.. Levantamento da diversidade da microbiota fúngica de solo em matas de galeria da reserva biológica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, campus Campo Grande. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 20, n. 4, p. 299-301, 2005.

EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**. Rio de Janeiro, Embrapa Solos, 1997. 212p.

EMBRAPA. **Embrapa Cerrados: conhecimento, tecnologia e compromisso ambiental**. 2. Ed. Planaltina, 2005, p. 43.

FARROW, W. M. Tropical soil fungi. **Mycologia**, v. 46, p. 632-646, 1954.

FASI, W. U.; DONG, M.; LIU, Y.; MA, X.; AN, L.; YOUNG, J. P. W.; FENG, H. Effects of long-term fertilization on AM fungal community structure and Glomalin-related soil protein in the Loess Plateau of China. **Plant and Soil**, v. 342, n. 1, p. 233-247, 2011.

FERREIRA, A.; OLIVEIRA, R.; SANTOS, M.; BORGES, E. Atividade respiratória da microbiota e conteúdo de glicose em resposta à adição de fósforo em solo de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1891-1897, 2008.

FIACADORI, A. M.; POLIZELI, M. L. T. M.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; GUIMARAES, L. H. S. Produção de Fitases por diferentes linhagens de fungos filamentosos. In: XV SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2007, Ribeirão Preto. **CD de Resumo**, Ribeirão Preto: Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2007.

FIGUEIRÓ, A. S. **Mudanças ambientais na interface floresta-cidade e propagação de efeito de borda no Maço da Tijuca – Rio de Janeiro**. 2005. 400f. Tese (Doutorado em Geografia) - PPGG/IGEO/UFRJ, Rio de Janeiro. 2005.

FIGUEIRA, E. L. Z. Milho: riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisinas. **Ciências Agrárias**, v. 24, n. 2, p. 359-378, 2003.

FRAGA, M. E.; PEREIRA, M. G. Micobiota de solo de uma área de Duna na Restinga da Marambaia. **Floresta e Ambiente**, v. 17, n.1, p. 30-36, 2010.

FRAGA, M. E.; PEREIRA, M. G.; BARBOSA, D. J.; MELO, M. P. Diversidade de *Trichocomaceae* isoladas de solo em dois ecossistemas florestais. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 20, n. 1, p. 169-177, jan.-mar, 2010.

FRAGA, M. E.; BRAZ, D. M.; ROCHA, J. F.; PEREIRA, M. G.; FIGUEIREDO, D. V. Interação micro-organismos, solo e flora como condutores da diversidade na Mata Atlântica. **Acta Botânica Brasilica**, v. 26, n.4, p. 857-86, 2012.

FORTES, F. O.; SILVA, A. C. F.; ALMANÇA, M. A. K.; TEDESCO, S. B. Promoção de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* spp. **Revista Árvore**, v.31, n. 2, p 221-228, 2007.

GAMA-RODRIGUEZ, E. F. **Carbono e nitrogênio da biomassa microbiana do solo e da serapilheira de povoamentos de eucalipto**. 1997. 108p. Tese (Doutorado em Ciências dos Solos) Programa de pós-graduação em Ciências dos Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica. 1997.

GEORGE, T. S.; SIMPSON, R. J.; HADOBAS, P. A.; RICHARDSON, A. E.; Expression of a Fungal Phytase Gene in *Nicotiana tabacum* Improves Phosphorus Nutrition of Plant Growth in Amended Soils. **Plant Biotechnology Journal**, v. 3, p. 129–140, 2005.

GEORGE, T. S.; RICHARDSON, A. E.; LI, S. S.; GREGORY, P. J.; DANIELLI, T. J.; Extracellular Release of a Heterologous Phytase from Roots of Transgenic Plants: Does Manipulation of Rhizosphere Biochemistry Impact Microbial Community Structure. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 70, p. 433–445, 2009.

GOBERNA, M.; GARCIA, C.; INSAM, H.; HERNANDEZ, M. T.; VERDÚ, M. Burning Fire-Prone Mediterranean Shrublands: Immediate Changes in Soil Microbial Community Structure and Ecosystem Functions. **Microbial Ecology**, v. 64, n. 1, p. 1-14, 2012.

GOLDSTEIN, A. H.; ROGERS, R. D.; MEAD, G. Mining by microbe. **Bio-Technology**, Frankfurt, v. 11, n. 11, p. 1250-1254, 1993.

GOLOVAN, S.; WANG, G.; ZHANG, J.; FORSBERG, C. W. Characterization and Overproduction of the *Escherichia coli appA* Encoded Bifunctional Enzyme that Exhibits Both Phytase and Acid Phosphatase Activities. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 59–71, 2000.

GOMES, E. A.; SOUZA, F. A.; SOUSA, S. M.; VASCONCELOS, M. J. V.; MARRIEL, I. E.; SILVA, U. C. Prospecção de Comunidades Microbianas do Solo Ativas no Aproveitamento Agrícola de Fontes de Fósforo de Baixa Solubilidade. Embrapa Milho e Sorgo. **Documentos**, v. 107, 2010.

GONÇALVES, J. L. M. Cinética de transformação de fósforo lábil em não lábil em amostras de solos de cerrado. 1988. 62p. Tese (Doutorado), Instituto de Agronomia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1988.

GRIJGSHELD, P.; BLEICHRODT, R.; VAN VELUW, G. J.; WANG, F.; MULLER, W. H.; DIJKSTERHUIS, H. A. B.; WOSTEN, H. A. B. Development in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 74, p. 1-29, 2013.

GRISHKAN, I.; NEVO, E. Soil microfungual communities of “Evolution Canyons” in Israel extreme differences on a regional scale. **Biological Journal of the Limnean Society**, v. 93, n. 1, p. 157-163, 2008.

GUARRO, J.; GENE, J.; STCHIGEL, A. M.; FIGUEIRAS, M. J. Atlas of Soil Ascomycetes. **CBS Biodiversity Series**, v. 10, n. 1, p. 1-451, 2012.

GUIMARÃES, L. H. S.; PEIXOTO, S. C.; MICHELIN, M.; RIZZATTI, A. C. S.; SANDRIN, V. C.; ZANOELO, F. F.; AQUINO, A. C.; JUNIOR, A. B.; POLIZELI, M. Screening of Filamentous Fungi for Production of Enzymes of Biotechnological Interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 474–480, 2006.

GYANESHWAR, P.; NARESHKUMAR, G.; PAREKH; L. J.; POOLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 245, n. 1, p. 83-93, 2002.

HARMAN, G. E.; PETZOLDT, R.; COMIS, A.; CHEN, J. Interactions between *Trichoderma harzianum* Strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. **Plant Physiology**, v. 94, n. 2, p. 146 - 153, 2004.

HATTENSCHWILER, S. H.; TIUNOV, A. V.; SCHEU, S. Biodiversity and litter and decomposition terrestrial ecosystems. **Annual Review of Ecology Evolution System**, v. 36, p. 191–218, 2005.

HAWSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycology Research**, v. 105, n. 12, p.1422–1432, 2001.

HERLIHY, M.; McCARTHY, J. Association of soil-test phosphorus with phosphorus fractions and adsorption characteristics. **Nutr. Cycl. Agroecosyst**, v. 75, p. 79-90, 2006.

IRELAND, M. M. E.; QUARDOKUS, E. M.; KARTY, J. A.; REILLY, J. P.; BRUN, Y. V. Proteomic analysis of the *Caulobacter crescentus* stalk indicates competence for nutrient uptake. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1029-1041, 2002.

JUMPPONEN, A.; JONES, K. L. Massively parallel 454 sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate *Quercus macrocarpa* phyllosphere. **New Phytologist**, v. 184, n. 2, p. 438-448, 2009.

JUNIOR, N. L. S. **Desafios da Bioprospecção no Brasil**. No 1569. 2012.

KATZ, B. Preliminary results of leaf litter decomposing microfungi survey. **Acta Amazônica**, v. 11, n.10, p. 410-411, 1981.

KINDEL, A. A. **Fragmentação real: heterogeneidade de remanescentes florestais e valor indicador das formas de húmus**. 2001. 188f. Tese (Doutorado em Geografia) – Programa de Pós-Graduação em Geografia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2001.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS, J. A. (Eds). **Dictionary of the fungi**, 10th edition. CABI Publishing, UK. 2008. 5-770p.

KLICH, M. A. Identification of Common *Aspergillus* species. **Centraalbureau voor Schimmelcultures**, Netherlands, v. 45, n. 3, p. 174-179, 2008.

KUCEY, R. M. N. Phosphate solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 63, n. 4, p. 671-678, 1983.

LEONG, S. L.; HIEN, L. T.; AN, T. V.; TRANG, N. T.; HOCKING, A. D.; SCOTT, E. S.. Ochratoxin A producing Aspergilli in Vietnamese green coffee beans. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 301–306, 2007.

LOURD, M.; ALVES, M. L. B.; BOUHOT, D. Análise qualitativa e quantitativa de espécies de *Pythium* patogênicas dos solos do município de Manaus. **Fitopatologia Brasileira**, v. 11, n.1, p. 479-485, 1986.

LYONS, T. P. **Goal 2000: a truly global science-based company that responds rapidly to emerging issues**. In: NORTH AMERICA UNIVERSITY TOUR, Nicholasville: Alltech, p. 1-32, 1996.

MAENZ, D. D. Enzymatic characteristics of phytases as they relate to their use in animal feeds. In: **Enzymes in Farm Animal Nutrition**. eds. M.R. Bedford and G.G. Partridge, CAB International, p. 61, 2001.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: Ceres, 2006. 638p.

MARSCHNER, P.; SOLAIMAN, Z.; RENGEL, Z. Rhizosphere properties of Poacea genotypes under P-limiting conditions. **Plant and Soil**, v. 283, p. 11-24, 2006.

MAZZETTO SILVA, C. E. Ordenamento Territorial no Cerrado brasileiro: da fronteira monocultora a modelos baseados na sociobiodiversidade. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, v. 19, n.1, p. 89-109, jan/jun. 2009.

MENDES, I. C.; REIS JÚNIOR, F. B. Micro-organismos e disponibilidade de fósforo (P) nos solos: uma análise crítica. Embrapa Cerrados. **Documentos**, v. 85, p. 13-14, 2003.

MENDONÇA, J. F. B. **Solo: substrato da vida**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 156 p.

MEYER, V.; WU, B.; RAM, A. F. J. *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 469–476, 2011.

MIYAOKA, M. F. **Avaliação do potencial dos fungos do gênero *Rhizopus* spp na produção de substâncias bioativas com ação antioxidante utilizando diferentes substratos**. 2013. 156 f. Tese (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2013.

MILLER, S. S.; LIU, J.; ALLAN, D. L.; MENZHUBER, C. J.; FEDOROVA, M.; VANCE, C.P. Molecular control of acid phosphatase secretion into the rhizosphere of proteoid roots from phosphorus stressed white lupin. **Plant Physiology**, v. 127, n. 2, p. 594–606, 2001.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. (editores). Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. p. 07-14, 2009.

MOREIRA, M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: Ed. UFLA, 2008, 768 p.

MUDGE, S. R.; SMITH, F. W.; RICHARDSON, A. E. Root-specific and phosphate-regulated expression of phytase under the control of a phosphate transporter promoter enables *Arabidopsis* to grow on phytate as a sole P source. **Plant Science**, v. 165, p. 871–878, 2006.

MURO, M. A.; LUCHI, M. R. **Preservação de Micro-organismos**. Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”. Campinas, 1989. 92 p.

MUELLER-DOMBOIS, E.; ELLENBERG, F. **Aims and methods of vegetation ecology**. New York: Wiley & Sons, 1974. 168 p.

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

NEVES, C. M. N. N.; SILVA, M. L. N.; CURTI, N.; CARDOSO, E. L.; MACEDO, R. L. G.; FERREIRA, M. M.; SOUZA, F. S. **Atributos indicadores da qualidade do solo em sistema agrossilvopastoril no noroeste do Estado de Minas Gerais**. 2002. 87f. Instituto de Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2002.

NEVES, A. A. O.; MARRIEL, I. E. SCHAFFERT, R. E. **Diversidade funcional e atividade de micro-organismos solubilizadores de P na rizosfera de linhagens recombinantes de sorgo**. In: XVIII CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, Goiânia - MG, 2010.

NIE, M.; MENG, H.; LI, K.; WAN, J. R.; QUAN, Z. X.; FANG, C. M.; LI, B. Comparison of bacterial and fungal communities between natural and planted pine forests in subtropical China. **Current microbiology**, v. 64, n. 1, p. 34-42, 2012.

NOVAIS, R. F.; MELLO, J. W. V. Relação solo-planta. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V. V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 276-374.

OGBO, F. C. Conversion of cassava wastes for biofertilizer production using phosphate solubilizing fungi. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, p. 4120-4124, 2010.

OLIVEIRA, J. J. F.; ALIXANDRE, T. F. Parâmetros biométricos de mudas de sabiá micorrizadas sob níveis de fósforo em Latossolo Amarelo. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 74, p. 10-17, 2013.

ONIONS, A. H. S.; BRADY, B. L. Taxonomy of *Penicillium* and *Acremonium*. In: PEBERDY, J. F. (Ed.) **Biotechnology Handbooks of *Penicillium* and *Acremonium***. New York and London, Plenum Press, 1987. p. 1-36.

OSAKI, F. NETTO, P. S. Flutuação da população de fungos sob floresta ombrófila mista e em povoamento de *Pinus taeda*. **FLORESTA**, v. 42, n. 4, p. 795-808, 2013.

PANDEY, A.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ, L. J. A.; SOCCOL, V. T. Production, purification and properties of microbial phytases. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 3, p. 203-214, 2001.

PANG, P. C. K.; KOLENKO, H. Phosphomonoesterase activity in forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 18, n. 1, p. 35-40, 1986.

PEIXOTO, A. L. Vegetação da Costa Atlântica. In: Monteiro S.; KAZ, L. **Floresta Atlântica**. Rio de Janeiro: Alumbramento, 1991/92, p. 33-41.

PENA, S. M.; BARBOSA, F. F.; LOPES, D. C.; ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; SILVA, F. C. O. The effects of nutritional strategies to reduce nutrient pollution in manure on the performance and carcass traits of pigs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 1, p. 231-240, 2013.

PEREIRA, T. P.; LEMOS, L. N.; BARBOZA, A. D.; SARAIVA, M. A.; ROESH, L. F. W. Reestruturação e perda de diversidade bacteriana no bioma Pampa brasileiro. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 4, n. 2, p. 15-18, 2012.

PFENNING, L. H. Soil and rhizosphere microfungi from Brazilian tropical forest ecosystems. In: HYDE, K. D. **Biodiversity of Tropical Microfungi**. Hong Kong, Hong Kong University Press, 1997, p. 341-365.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; DA SILVA BOLZANI, V.; LOPES, N. P. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em Estado Sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais. **Comunicado Técnico**, ISSN 1679 – 6535, Fortaleza, CE. Agosto, 2005.

PITT, J. I. E.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. Springer, 2009. 221 p.

PIKOVSKAYA, R. I. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. **Microbiology**, v. 17, p. 362-370, 1948.

POLLI, A.; FLORINDO DAS NEVES, A. N. R. E. A.; GALLO, F.; GAZARINI, J.; RHODEN, S. A.; ALENCAR PAMPHILE, J. O. O. Aspectos da interação dos micro-organismos endofíticos com plantas hospedeiras e sua aplicação no controle biológico de pragas na agricultura. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 2, p. 1-9, 2012.

RAMOS, M. L. G.; SCIAN, M. M. F.; PEDROSO, C.; GUIMARÃES, C. M.; FREITAS, K. M. L. Effect of management systems and planting on functional microorganisms density, at cerrado soil. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 58-68, 2012.

RAPER, K. B.; THOM, C. **A manual of the *Penicillia***. Baltimore, William and Wilkins, 1949.

RAVINDRAN, V.; BRYDEN, W. L.; KORNEGAY, E. T. Phytates: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. **Poultry and Avian Biology Reviews**, v. 6, p. 125-143, 1995.

REIS, M. R.; LEÃO, E. U.; SANTOS, G. R.; SARMENTO-BRUM, R. B. C.; GONÇALVES, C. G.; CARDON, C. H.; SILVA, D. B. Impact of herbicides on strains of *Trichoderma* spp. **Planta Daninha**, v. 31, n. 2, p. 419-426, 2013.

RIBAS JUNIOR, J. S. **Solubilização microbiana de fosfato natural e sua interação com fertilizantes orgânicos na cultura do milho (*Zea mays*)**. 2012. 195 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 2012.

RIBEIRO, J. M. M.; CAVAGLIERI, L. R.; VITAL, H. C.; KRUGER, C. D.; ROSA, C. A. R. Radiação gama sobre a micobiota de ração avícola e *Aspergillus* spp. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.5, p.1452-1458, 2009.

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

RICHARDSON, A. E.; GEORGE, T. S.; HENS, M.; SIMPSON, R. J. Utilization of soil organic phosphorus by higher plants. In: TURNER, B. L.; FROSSARD, E.; BALDWIN, D. S. (Ed.). **Organic phosphorus in the environment**. Wallingford: CABI Publishing, 2005. p. 165-184.

RICHARDSON, A. E.; BAREA, J.; McNEILL, A. M.; PRIGENT-COMBARET, C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and Soil**, The Hague, v. 322, p. 17-24, 2009.

ROCHA, C. P.; ARAÚJO, T. C. M.; MENDONÇA, F. J. B. Aplicação de técnicas de posicionamento GPS tridimensional para localizar linhas de costa: estudo de caso na praia de Boa Viagem, Recife/PE, Brasil. **Revista da Gestão Costeira Integrada**, v. 8, n. 2, p. 127-137, 2008.

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

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J.; YILMAZ, N.; SPIERENBURG, H.; SEIFERT, K. A.; PETERSON, S. W.; FRISVAD, J. C. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. **Studies in Mycology**, v. 70, n. 1, p. 159-183, 2011.

SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre: Genesis, 1999. 245 p.

SANTOS, R. P.; MACEDO, M. A.; DELGADO, G. V.; MARTINS, I.; MELLO, S. C. M. **Enriquecimento da coleção de agentes de controle biológico de fitopatógenos: Novos isolados de *Trichoderma* procedentes de Petrolina (PE)**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 750 p.

SANTOS, T. M. C.; DOS SANTOS, M. A. L.; DOS SANTOS, C. G.; DOS SANTOS, V. R.; DOS SANTOS PACHECO, D. Efeito da fertirrigação com vinhaça nos micro-organismos do solo. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 1, p. 155-160, 2008.

SANTOS, D. B. M. **Distribuição do fósforo no perfil do solo sob sistema de plantio direto**. 2009. 81p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília. 2009.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 787-799, 2010.

SEIFERT, K.; MORGAN-JONES, G.; GAMS, W.; KENDRICK, B. The Genera of Hyphomycetes. **Fungal Biodiversity Centre**, v. 9, p. 1-997, 2011.

SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Phytate-degrading enzymes in pig nutrition. **Livestock Science**, v. 113, p. 99–122, 2008.

SILVA, M. A.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 108-114, 2007.

SILVA, R. R.; SILVA, M. L. N.; CARDOSO, E. L.; MOREIRA, F. M. S.; CURI, N.; ALOVISI, A. M. T. Biomassa e atividade microbiana em solo sob diferentes sistemas de manejo na região fisiográfica Campos das Vertentes – MG. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 34, p. 1585-1592, 2010.

SILVA REIS, J. B. R.; JESUS, A. M.; DIAS, M. S. C.; LEAL, D. P. V. Efeito de lâminas de irrigação e doses de PBZ na microfauna do solo cultivado com mangueira cv. Haden no norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada-RBAI**, v. 5, n. 5, p. 1-12, 2013.

SIMÕES, M. F.; PEREIRA, L.; SANTOS, C.; LIMA, N. Polyphasic identification and preservation of fungal diversity: concepts and applications, Chapter 5. In: MALIK, A.; GROHMANN, E.; ALVES, M. **Management of Microbial Resources in the Environment**. (Eds.). ISBN 978-94-007-5930-5, Springer, The Netherlands, 2013a. 410 p.

SIMÕES, M. F.; SANTOS, C.; LIMA, N. Structural Diversity of *Aspergillus* Section *Nigri* Spores. **Microscopy Microanalysis**, v. 19, p. 1-8, 2013b.

SOARES, M. R.; ALLEONI, L. R. F. Contribution of soil organic carbon to the ion exchange capacity of tropical soils. **Journal of Sustainable Agriculture**, v. 32, p. 439-462, 2008.

SOUTO, P. C. **Acumulação e decomposição da serapilheira e distribuição de organismos edáficos em área de caatinga na paraíba, Brasil**. 2006. 110f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2006.

SOUZA VIEIRA, P. D.; SILVA, F. G.; SILVA, W. M. T.; CAVALCANTI, P. A.; LIMA, D. Primeiro registro de fungos endofíticos em folhas de *Ixora coccinea* L. em Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, n. 1, p. 1, 2012.

STAMFORD, N. P.; MOURA, A. M. M. F.; SANTOS, K. S.; SANTOS, P. R. Atuação de *Acidithio bacillus* na solubilização de fosfato natural em solo de tabuleiro cultivado com jacatupé (*Pachyrhizus erosus*). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 28, p. 75-83, 2004.

SYLVIA, D. M.; FUHRMANN, J. J.; HARTEL, P. G.; ZUBERER, D. A. **Principles and applications of soil microbiology**. New Jersey, Prentice Hall, 1999. 550p.

TAUK, S. M. Biodegradação de resíduos orgânicos no solo. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 20, n. 4, p. 299-301, 1990.

TEIXEIRA, E. N. M. DA SILVA, J. H. V.; DE CASTRO C.; GOULART, C.; JORDÃO FILHO, J.; RIBEIRO, M. L. G. Suplementação da fitase em rações com diferentes níveis de fósforo disponível para frangos de corte. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 2, p. 390-397, 2013.

THROCKMORTON, H. DANE, L.; BIRD, J. A.; FIRESTONE, M. K.; HORWATH, W. R. Mechanisms Controlling Carbon Turnover from Diverse Microbial Groups in Temperate and Tropical Forest Soils. **AGU Fall Meeting Abstracts**, v. 1, p. 05, 2010.

VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 57-80, 2011.

VAZQUEZ, P.; HOLGUIN, G.; PUENTE, Y.; LOPEZ CORTES, A.; BASHAN, Y. Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semi arid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils**, Berlim, v. 30, p. 460-468, 2000.

WALTER, B. M. T. **Fitofisionomia do Bioma Cerrado: síntese terminológica e relações florísticas**. 2006. 389f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília. 2006.

WAKELIN, S.; ANSTIS, S.; WARREN, R.; RYDER, M. The role of pathogen suppression on the growth promotion of wheat by *Penicillium radicum*. **Australasian Plant Pathology**, v. 35, p. 253-258, 2006.

WELLBAUM, C. **Produção de ácidos graxos por linhagens de *Mucor* sp isoladas de solo de Cerrado, Município de Corumbataí, Estado de São Paulo**. 2006. 204f. Tese (Doutorado

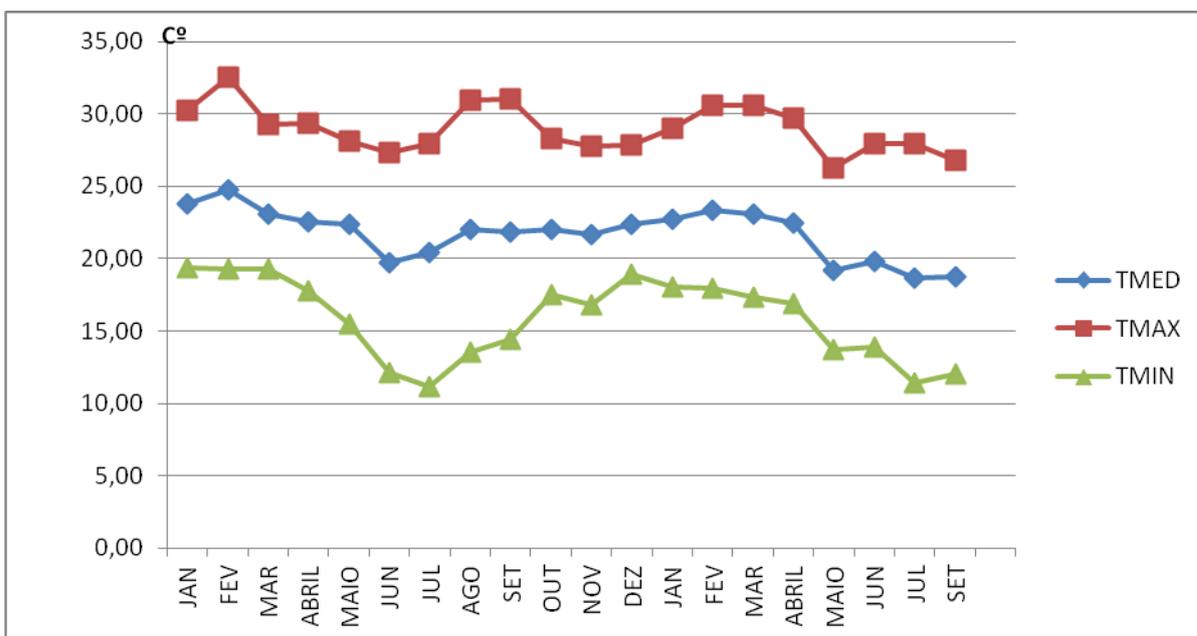
em Microbiologia Aplicada). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Rio Claro, Rio Claro. 2006.

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

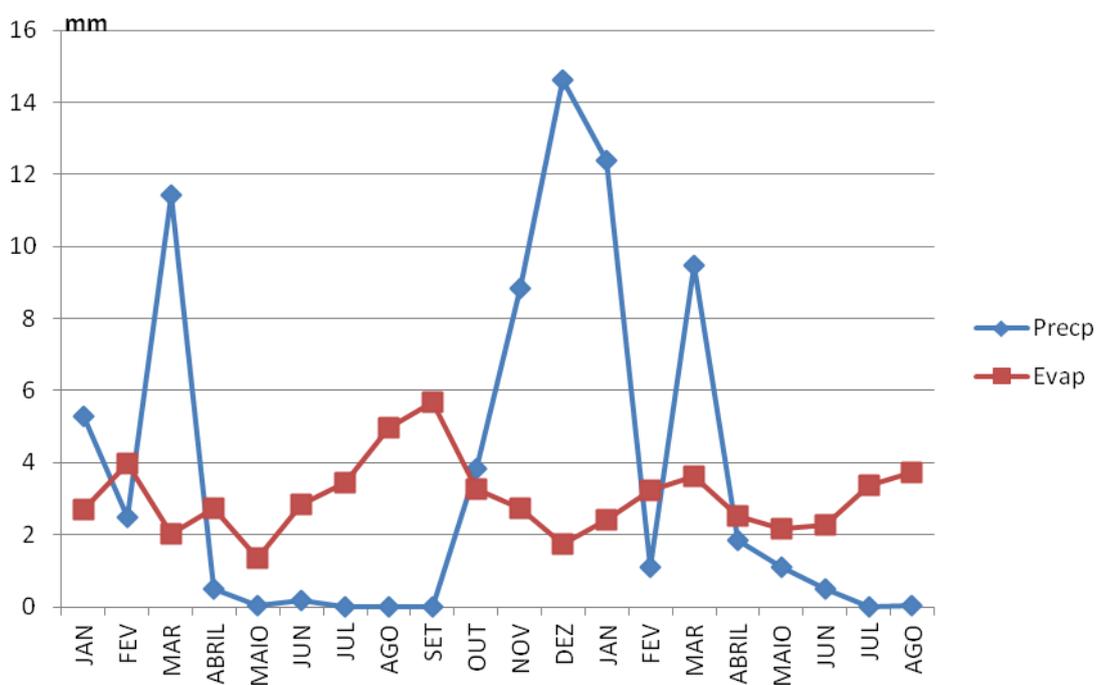
XIAO, C. Q.; CHI, R. A.; HUANG, X. H.; ZHANG, W. X.; QIU, G. Z.; WANG, D. Z. Optimization for rock phosphate solubilization by phosphate-solubilizing fungi isolated from phosphate mines. **Ecological Engineering**, Oxford, v. 33, p. 187-193, 2008.

ANEXOS

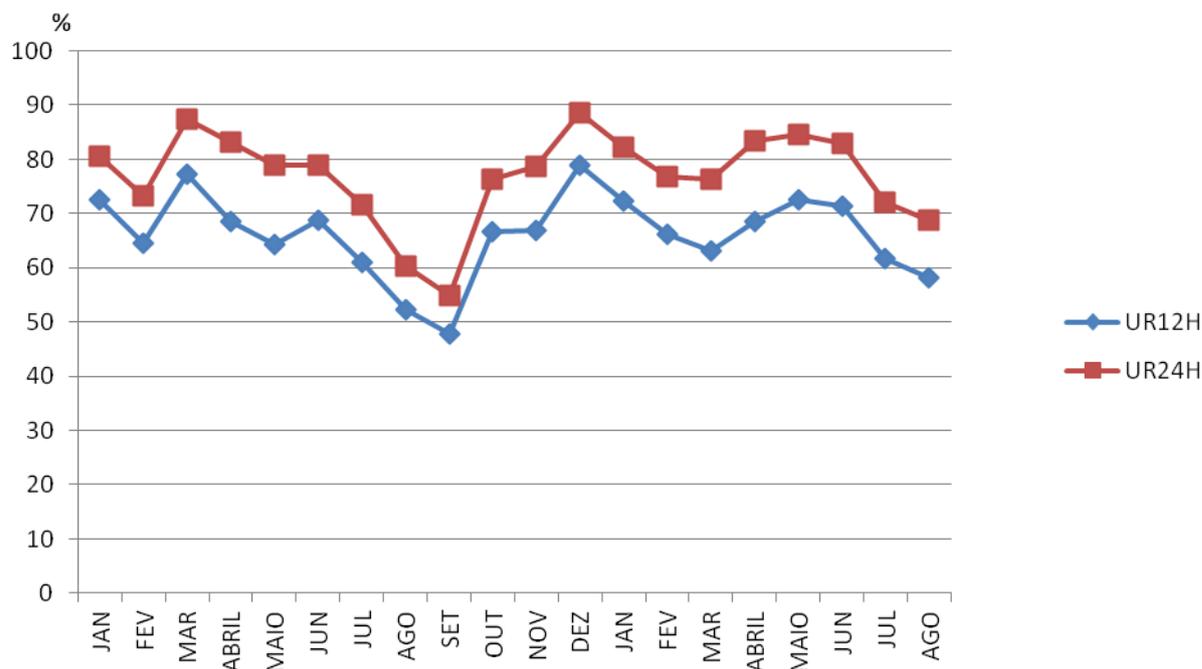
Anexo A. Médias mensais das temperaturas diárias - média, máxima e mínima dos 21 meses anteriores à última coleta.



Anexo B. Precipitações e evapotranspirações mensais médias dos 21 meses anteriores à última coleta



Anexo C. Umidades relativas mensais médias dos 21 meses anteriores à última coleta



Anexo D. Área basal (B), altura média das árvores (H), densidade de indivíduos (ind/m²), índice de Shannon (H'), Altitude geométrica (Z), declividade em graus (Decl), e aspecto dos sítios onde foram coletadas as amostras.

Sítio	B(m ² /ha)	H(m)	ind/m ²	H'	Z	Decl	Asp
11/13	17,15	8,62	0,10	2,31	889	6,7	N
12	13,34	9,50	0,08	2,23	881	7,6	S
21	25,43	9,82	0,14	2,61	847	8,2	C
31	26,00	9,68	0,12	2,60	827	5,0	C
41	23,03	9,52	0,15	2,56	851	12,7	O
51	25,64	11,10	0,09	2,64	779	7,6	SE
52	26,37	10,39	0,12	2,41	821	11,5	E
61	19,98	10,79	0,08	2,47	787	8,8	SE
71	17,34	10,69	0,06	2,19	813	26,5	SO
81	31,53	9,20	0,18	2,87	769	5,7	C
82	29,26	12,07	0,13	2,92	757	2,7	C

Altitude geométrica: Distância contada entre a Superfície terrestre e a superfície elipsoidal (ROCHA et al., 2008). **Superfície elipsoidal:** É a equipotencial limitante do Elipsóide adotado. As observações geodésicas são reduzidas a esta superfície (ROCHA et al., 2008) **Índice de Shannon:** É a quantificação da diversidade vegetal de uma determinada área, com base no número de espécies encontradas, número total de indivíduos amostrados, e proporção relativa do número de indivíduos pertencentes a cada espécie. Tal índice é maximizado quando todas as espécies encontradas estão em números iguais (DIAS et al., 1998).

ANEXO E. Composição florística dos fragmentos amostrados

Famílias	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
<i>Anacardiaceae</i>	2,30%	2,50%	0,00%	6,70%	6,70%	10,00%	8,70%	5,70%
<i>Annonaceae</i>	12,00%	3,70%	6,30%	0,00%	3,00%	3,00%	2,90%	1,20%
<i>Apocynaceae</i>	0,40%	3,10%	0,00%	0,60%	1,80%	2,00%	0,00%	0,80%
<i>Burseraceae</i>	0,40%	0,60%	22,90%	12,20%	8,50%	11,00%	0,00%	1,20%
<i>Celastraceae</i>	0,00%	0,60%	0,00%	1,10%	10,30%	2,00%	0,00%	0,00%
<i>Ebenaceae</i>	0,00%	12,40%	0,00%	0,00%	3,60%	8,00%	0,00%	0,00%
<i>Fabaceae</i>	52,30%	11,20%	4,20%	13,30%	9,10%	21,00%	13,00%	17,60%
<i>Lauraceae</i>	4,30%	1,20%	2,10%	1,70%	0,00%	1,00%	4,30%	0,00%
<i>Malvaceae</i>	0,80%	1,20%	0,00%	6,10%	1,20%	1,00%	0,00%	0,00%
<i>Meliaceae</i>	0,80%	1,90%	20,80%	2,20%	6,10%	2,00%	1,40%	11,00%
<i>Myrtaceae</i>	2,30%	18,00%	18,80%	3,90%	3,00%	3,00%	5,80%	13,50%
<i>Phyllanthaceae</i>	0,00%	0,00%	8,30%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Rubiaceae</i>	0,80%	1,20%	0,00%	22,80%	5,50%	3,00%	1,40%	13,10%
<i>Rutaceae</i>	0,00%	0,00%	2,10%	0,00%	0,00%	0,00%	31,90%	11,40%
<i>Salicaceae</i>	0,00%	0,60%	0,00%	0,60%	5,50%	3,00%	8,70%	6,10%
<i>Sapindaceae</i>	0,00%	0,60%	0,00%	6,70%	16,40%	12,00%	1,40%	0,40%
<i>Urticaceae</i>	0,00%	0,00%	0,00%	5,00%	0,00%	0,00%	7,20%	0,00%
Mortas	10,70%	11,10%	4,10%	7,10%	4,20%	6,00%	10,40%	5,80%
Outras	13,20%	29,80%	10,40%	10,00%	15,20%	12,00%	2,90%	12,20%

ANEXO F. Composição do meio de cultura DRBC em g/L

Peptona	5.00
Dextrose	10.00
Fosfat monopotássico	1.00
Cloranfenicol	0,1
Sulfato de Magnésio	0.50
Rosa Bengala	0.02
Dicloran	0.002
Agar	15.00

ANEXO G. Composição do meio de cultura Pikovskaya em g/L

Extrato de levedura	0.50
Dextrose	10.00
Fosfato de Cálcio	5.00
Sulfato de Amônio	0.50
Cloreto de Potássio	0.20
Sulfato de Magnésio	0.10
Sulfato de Manganês	0.0001
Sulfato Ferroso	0.0001
Agar	15.00

Anexo H. Dados químicos do solo dos F1 a F8

F	pH_H ₂ O	P	K	Ca	Mg	AL	H_AL	Mat org
1	6,2	11,6	166,3	8	1,6	0	5,4	10,1
2	5,2	3,9	91,7	1,6	0,4	0,8	9,1	5,5
3	5,6	8,6	44,3	5,9	0,4	0	6	6,5
4	5,9	13,3	255	6,6	1,7	0	6,9	12,4
5	6	4,1	133	6,3	1,8	0	5,4	9,5
6	5,8	9,7	182,3	8,1	1	0	9	16,5
7	5,7	10,7	203,5	8,2	1,3	0,1	5,5	7,6
8.1	5	8,4	149,7	2,8	1,1	0,4	8,2	7,8
8.2	7,1	11,3	452,7	10	1,6	0	0,8	8,5

** P, K, Ca, Mg, Al, H + Al e Mat org = mg/dm³

** F = Fragmento florestal

Anexo I. Dados edáficos dos F1 a F8

F	Textura	Cor	Estrutura	Classificação
1	Muito argilosa	7,5YR	Poliédrc	Argissolo Verm Amaro
2	Muito argilosa	5YR	Grumos	Latossolo Vermelho
3	Muito argilosa	2YR	Grumos	Cambissolo Háplico
4	Muito argilosa	7,5YR	Poliédric	Argissolo Verm Amaro
5	Argilossiltosa	7,5YR	Poliédric	Argissolo Amarelo

6	Muito argilosa	5YR	Grumos	Cambissolo Húmico
7	Argilossiltosa	7,5YR	Grumos	Cambissolo Háptico
8.1	Francoargilosa	7,5YR	Poliédric	Cambissolo Húmico
8.2	Argilossiltosa	7,5YR	Grumos	Argissolo Verm Amar

F = Fragmento florestal