

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**AGRONOMIA CIÊNCIA DO SOLO**

**TESE**

**Combinação de Bactérias Solubilizadoras de Fosfato  
e Biochars Aumentam a Disponibilidade de Fósforo  
no Solo**

**Rafaela Félix da França**

**2022**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA -  
CIÊNCIA DO SOLO**

**COMBINAÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE  
FOSFATO E BIOCHARS AUMENTAM A DISPONIBILIDADE DE  
FÓSFORO NO SOLO**

**RAFAELA FÉLIX DA FRANÇA**

*Sob a Orientação do Professor  
Adelson Paulo de Araújo*

*e Coorientação da Professora  
Érika Valente de Medeiros*

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutora**, no  
Programa de Pós-Graduação em  
Agronomia, Área de Concentração em  
Biologia do Solo.

Seropédica, RJ  
Agosto de 2022

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central/Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
Com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F814c	França, Rafaela Félix, 1990-
	Combinação de bactérias solubilizadoras de fosfato e biochars aumentam a disponibilidade de fósforo no solo / Rafaela Félix França.
	- Seropédica, 2022.
	93 f. : il.
	Orientador: Adelson Paulo de Araujo.
	Tese (Doutorado). – – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Ciência do Solo, 2022.
	1. Biocarvão. 2. <i>Klebsiella</i> sp. 3. Fósforo orgânico. I. Araujo, Adelson Paulo de, 1963-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo III. Título.

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.**

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que seja citada a fonte.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA (CIÊNCIAS DO SOLO)**



**HOMOLOGAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO Nº 17 / 2022 - CPGACS (12.28.01.00.00.00.27)**

**Nº do Protocolo: 23083.054077/2022-46**

**Seropédica-RJ, 01 de setembro de 2022.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**

INSTITUTO DE AGRONOMIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO**

**RAFAELA FELIX DA FRANÇA**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora**, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo, Área de Concentração em Biologia do Solo.

TESE APROVADA EM 29/08/2022.

Adelson Paulo de Araújo. Dr. UFRRJ

(Orientador)

Irene da Silva Coelho. Dra. UFRRJ

Aroldo Ferreira Lopes Machado. Dr. UFRRJ

Diogo Paes da Costa. Dr. UFRPE

Claude Hammecker. Dr. IRD

**(Assinado digitalmente em 02/09/2022 10:18 )**

ADELSON PAULO DE ARAUJO  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DATS (11.39.00.35)  
Matrícula: 1104775

**(Assinado digitalmente em 01/09/2022 15:34 )**

AROLDO FERREIRA LOPES MACHADO  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DeptFITO (12.28.01.00.00.00.32)  
Matrícula: 1905333

**(Assinado digitalmente em 01/09/2022 13:08 )**

IRENE DA SILVA COELHO  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DMIV (12.28.01.00.00.00.54)  
Matrícula: 1815763

**(Assinado digitalmente em 01/09/2022 09:53 )**

DIOGO PAES DA COSTA  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 073.627.984-90

**(Assinado digitalmente em 06/09/2022 06:33 )**

CLAUDE HAMMECKER  
ASSINANTE EXTERNO  
Passaporte: 19FF88157

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **17**, ano: **2022**, tipo: **HOMOLOGAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO**, data de emissão: **01/09/2022** e o código de verificação: **b370108088**

*A minha mãe, Celma Felix,*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós Graduação em Agronomia Ciência do Solo pela oportunidade de fazer parte de sua história.

À UFRRJ e a CAPES pelo incentivo e apoio à pesquisa, ao ensino de qualidade e à extensão, desenvolvidos com tanta dedicação e prestígio por ambas instituições.

À UFAPE por ter me acolhido durante a realização do trabalho prático, em especial a Professora Érika Valente pela coorientação e aprendizado durante todo percurso.

Ao meu orientador Adelson Paulo de Araújo pela condução na caminhada do doutorado, pelo exemplo de profissional, pela presteza e disponibilidade sempre.

Aos que foram a campo comigo e aos que se arriscaram no laboratório para me ajudar nas avaliações dos experimentos em meio a pandemia, em especial a Renata Oliveira, Thallyta Espíndola, Wisraiane Borges e Diogo Paes.

Aos colegas do laboratório LSP da UFRRJ e do LEMA da UFAPE pela convivência e conhecimentos compartilhados. Aos amigos Juliana Alves e Gean Teles pelo companheirismo e amizade durante o doutorado.

Agradeço aos que contribuíram na construção da tese, afinal de contas uma tese não é feita por apenas uma pessoa.

À minha mãe, base de tudo e sem a qual faltariam forças para continuar a luta com toda a distância e concluir esse trabalho em meio a uma pandemia e algumas perdas familiares.

Sem a educação, nada seríamos!

Muito obrigada!

## **BIOGRAFIA**

Rafaela Felix da França nasceu na cidade de Eunápolis, Bahia, em 1º de novembro de 1990. Ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 2009. Foi representante dos alunos do curso de Agronomia, presidente da semana acadêmica de Engenharia Agronômica e também bolsista de iniciação científica pela FAPUR. Diplomou-se em 2016. Em 2016, ingressou no curso de Pós Graduação em Produção Agrícola da Universidade Federal Rural de Pernambuco, obtendo o título de mestre em 2018. No mesmo ano, ingressou no curso de Pós Graduação em Agronomia - Ciência do Solo a nível de doutorado. Durante o curso, realizou estágio na Universidade Federal do Agreste de Pernambuco no Laboratório de Química Agrícola e Biotecnologia e Enzimologia Agrícola. Em agosto de 2022, defendeu sua tese de doutorado.

## RESUMO GERAL

FRANÇA, Rafaela Felix da. **Combinação de bactérias solubilizadoras de fosfato e biochars aumentam a disponibilidade de fósforo no solo.** 2022. 93f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – RJ, 2022.

Na agricultura moderna, a busca por tecnologias sustentáveis tem inserido a utilização de bactérias do solo capazes de solubilizar fosfato e aumentar a eficiência de uso de fósforo (P) pelas plantas. Outra tecnologia é o uso do biochar, que provém da pirólise de material orgânico sólido, e pode agir como biofertilizante e como veículo de inoculação de microrganismos. Esse estudo teve como objetivos: (i) apresentar uma revisão sobre a viabilidade do biochar como veículo de inoculação para bactérias solubilizadoras de fosfato; (ii) avaliar o efeito da inoculação de bactérias do gênero *Klebsiella aerogenes* associadas a diferentes fontes de biochar, aplicadas em sementes de milho em condições controladas e de campo, nas variáveis fitotécnicas da planta, e características bioquímicas e químicas do solo. No experimento em casa de vegetação, em vasos de 16 kg de solo, foram aplicadas diferentes combinações de inóculos e fontes de biochars em sementes de milho da variedade Batité. Foi adotado um delineamento fatorial 3x4 com 4 repetições, combinando 3 fontes de biochar: controle sem biochar, biochar de palha de arroz (PA) e biochar de uva branca (UB), e 4 cepas bacterianas: *Klebsiella aerogenes* UAGC17, *Klebsiella aerogenes* UAGC19, a mistura das duas cepas, e controle sem inoculação. Foram avaliadas características fitotécnicas da planta com 45 dias, e efetuadas análises químicas e de atividades enzimáticas no solo e nas frações de P. O biochar PA associado à bactéria UAGC17 aumentou as variáveis P orgânico lável, P orgânico solúvel em meio básico, respiração basal do solo e as atividades das enzimas fosfatase alcalina e a  $\beta$ -glucosidase. Os biochars PA e UB se mostraram promissores como veículos de inoculação. Em condições de campo em Jupi, Pernambuco, foram avaliados os mesmos tratamentos citados anteriormente. Em geral, para as variáveis fitotécnicas, os tratamentos que receberam inoculação foram superiores aos que não foram inoculados, com destaque para o tratamento UAGC17+ UAGC19 associado a UB, que proporcionou maiores diâmetro do colmo e altura da primeira espiga. O tratamento UAGC17 associado a PA aumentou todas as frações de P do solo avaliadas, além de aumentar a atividade das enzimas fosfatases e a respiração basal do solo. Não foram observados ganhos com relação às variáveis de produção do milho verde (número de espigas comerciais, número total de espigas e peso de espiga).

**Palavras-chave:** Biocarvão. *Klebsiella* sp. Fósforo orgânico.

## GENERAL ABSTRACT

FRANÇA, Rafaela Felix da. **Combination of phosphate-solubilizing bacteria and biochars increases phosphorus availability in the soil.** 2022. 93p. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – RJ, 2022.

In the modern agriculture, the search for sustainable strategies has been including the use of soil bacteria capable of solubilizing phosphate and increasing efficiency of phosphorus (P) use by crops. Another technology is the use of biochar, which comes from the pyrolysis of solid organic material, and can act as a biofertilizer and a vehicle for inoculation of microorganisms. This study aimed to: (i) present a review on the viability of biochar as an inoculation vehicle for phosphate-solubilizing bacteria; (ii) evaluate bacteria of the genus *Klebsiella aerogenes* associated with different sources of biochar at controlled and field conditions, applied to maize seeds, and to evaluate the phytotechnical changes of the plant, and soil chemical and biochemical analysis. Two experiments were carried out. In experiment 1, in 16-kg pots with soil in a greenhouse, different combinations of inoculum and sources of biochars were applied to maize seeds of the Batité variety. A 3x4 factorial design with 4 replications was employed, combining 3 sources of biochar: without biochar, rice straw biochar and white grape biochar, and 4 bacterial strains: *Klebsiella aerogenes* UAGC17, *Klebsiella aerogenes* UAGC19, the mixture of the two strains, and control without inoculation. Phytotechnical traits of the plant were evaluated after 45 days, and chemical and enzymatic activity and fractions of P were analyzed in the soil. PA biochar, associated or not with UAGC17 bacteria, increased the soil labile organic P, soluble organic P in basic medium, soil basal respiration, activities of alkaline phosphatase and  $\beta$ -glucosidase enzymes. PA and UB biochars showed promise as inoculation vehicles. Under field conditions in Jupi, Pernambuco, the same treatments mentioned above were evaluated. In general, for the phytotechnical traits, the treatments that received inoculation were superior to those not inoculated, highlighting the treatment UAGC17+UAGC19 associated with UB, which provided greater stem diameter and height of the first ear. The UAGC17 treatment associated with PA increased all soil P fractions evaluated, the activity of phosphatase enzymes and basal soil respiration. No gains were observed regarding corn yield variables (number of commercial ears, total number of ears and ear weight).

**Key words:** Biochar. *Klebsiella* sp. Organic phosphorus.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismos de solubilização orgânica e inorgânica utilizados por bactérias (adaptado segundo PRABHU et al. 2019).....	16
<b>Figura 2.</b> Mapa de localização da mesorregião do Agreste de Pernambuco e do município de São João-PE, Brasil. Foto: Carlos Fragoso.....	26
<b>Figura 3.</b> Crescimento dos isolados UAGC17 e UAGC19 em meio NBRIP e verificação da solubilização. Foto: Rafaela França.....	28
<b>Figura 4.</b> Isolados crescidos em meio BD (meio turvo) e meio sem isolados (meio translúcido). Foto: Rafaela F. da França.....	28
<b>Figura 5.</b> Forno caseiro utilizado para produção dos biochars do Laboratório de Estudos em Microbiologia e Biotecnologia (LEMA) da UFAPE. Foto: Rafaela F. da França. ....	29
<b>Figura 6.</b> Resíduo de palha de arroz (A), biochar de palha de arroz (B), resíduo de uva branca (C) e biochar de uva branca (D). Foto: Rafaela F. da França. ....	29
<b>Figura 7.</b> Plantas de milho com 25 dias após a germinação. Foto: Rafaela França. ....	30
<b>Figura 8.</b> Casca da semente de milho inoculada com isolado bacteriano associado a biochar. Foto: Rafaela França.....	31
<b>Figura 9.</b> Plantas de milho com 45 dias após a germinação do tratamento B2, PA(A) e tratamento controle (B). Foto: Rafaela F. da França. ....	31
<b>Figura 10.</b> Peso fresco de raiz de plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. O tratamento controle representa as ausências de inóculo ou de biochar para os fatores 1 e 2, respectivamente. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+UACG19, PA – biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e C – controle. ....	34
<b>Figura 11.</b> Concentrações de fósforo orgânico lábil em solo cultivado com plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. O tratamento controle representa as ausências de inóculo ou de biochar para os fatores 1 e 2, respectivamente. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+UACG19, PA – biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e C – controle. ....	35
<b>Figura 12.</b> Concentrações de fósforo orgânico total solúvel em meio básico em solo cultivado com plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. O tratamento controle representa as ausências de inóculo ou de biochar para os fatores 1 e 2, respectivamente. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+UACG19, PA – biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e C – controle. ....	36

**Figura 13.** Respiração basal do solo (RBS) de solo cultivado com plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. O tratamento controle representa as ausências de inóculo ou de biochar para os fatores 1 e 2, respectivamente. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+UACG19, PA – biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e C – controle ..... 37

**Figura 14.** Atividade da Enzima  $\beta$ -glucosidase de solo cultivado com plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. O tratamento controle representa as ausências de inóculo ou de biochar para os fatores 1 e 2, respectivamente. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+UACG19, PA – biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e C – controle ..... 38

**Figura 15.** Atividade da enzima fosfatase alcalina de solo cultivado com plantas de milho tratadas com isolados bacterianos, independentemente do biochar (efeito simples). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes bactérias, considerando as médias globais dos tratamentos com todos os níveis de biochars (não significativo), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. O tratamento controle representa as ausências de inóculo bacteriano (controle negativo). Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+UACG19, PA – biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e C – controle ..... 38

**Figura 16.** Contribuições relativas das componentes principais e das variáveis sobre a variância total dos dados de plantas cultivadas em casa de vegetação. (A) Percentual de explicação da variância de cada componente principal. (B) Contribuição relativa das variáveis para as duas componentes principais. A linha tracejada vermelha no gráfico acima indica a contribuição média esperada. (C) Correlação das variáveis com as cinco principais componentes. O diâmetro dos círculos é proporcional a correlação entre a variável e as respectivas componentes principais (Dim) e a escala de cor indica o valor da correlação. Dia. C é o diâmetro do colmo da planta de milho; HT é a altura total da planta; PFR é o peso fresco de raiz; PFPA é o peso fresco da parte aérea; PSR é o peso seco de raiz; PSPA é o peso seco da parte aérea; PoL é o fósforo orgânico lável; PoH é o fósforo orgânico total solúvel em meio ácido; PoOH é fósforo orgânico total solúvel em meio básico; Pmic é o fósforo da biomassa microbiana; RBS é a respiração basal do solo; Beta é a enzima  $\beta$ -glucosidase do solo; aci.P é a enzima fosfatase ácida do solo; alc.P é a enzima fosfatase alcalina do solo. ..... 39

**Figura 17.** Biplot da análise de componentes principais das variáveis de milho cultivado em casa de vegetação. Os rótulos em vermelho são as variáveis mensuradas e os polígonos coloridos representam todas as médias de todas as repetições de cada tratamento. As duas componentes principais explicaram cerca de 48% da variância total estimada. Dia. C é o diâmetro do colmo da planta de milho; HT é a altura total da planta; PFR é o peso fresco de raiz; PFPA é o peso fresco da parte aérea; PSR é o peso seco de raiz; PSPA é o peso seco da parte aérea; PoL é o fósforo orgânico lável; PoH é o fósforo orgânico total solúvel em meio ácido; PoOH é fósforo orgânico total solúvel em meio básico; Pmic é o fósforo da biomassa microbiana; RBS é a respiração basal do solo; Beta é a enzima glucosidase do

solo; aci.P é a enzima fosfatase ácida do solo; alc.P é a enzima fosfatase alcalina do solo.	40
<b>Figura 18.</b> Mapa da localização da mesorregião do Agreste de Pernambuco e do município de Jupi-PE, Brasil. Foto: Rafaela F. da França.....	49
<b>Figura 19.</b> Valores de precipitação pluviométrica acumulada e temperatura média do ar referente aos meses de realização do experimento, de Abril a Agosto de 2021.....	49
<b>Figura 20.</b> Montagem do experimento de campo em um Neossolo Regolítico Distrófico localizado no Sítio Rio da Chata no município de Jupi, PE. Foto: Rafaela F. da França..	50
<b>Figura 21.</b> Espigas de milho empalhada e sem palha de tamanho comercial e não comercial. Foto: Rafaela F. da França.....	51
<b>Figura 22.</b> Diâmetro médio de colmos de plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. O tratamento controle representa as ausências de inóculo ou de biochar para os fatores 1 e 2, respectivamente. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+ UAGC19, PA– biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e controle – C .....	54
<b>Figura 23.</b> Altura média até a primeira espiga de plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. O tratamento controle representa as ausências de inóculo ou de biochar para os fatores 1 e 2, respectivamente. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+ UAGC19, PA– biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e controle – C .....	55
<b>Figura 24.</b> Altura média total das plantas de milho tratadas com isolados bacterianos, independentemente do biochar (efeito simples). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes bactérias, considerando as médias globais dos tratamentos com todos os níveis de biochars (não significativo), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+ UAGC19 e controle – Ctrl .....	55
<b>Figura 25.</b> Concentrações de P-Mehlich em solos cultivados com plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+ UAGC19, PA– biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e controle – C .....	56
<b>Figura 26.</b> Concentrações de P microbiano (Pmic) em solo cultivado com plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3	

– UAGC17+ UAGC19, PA– biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e controle – C ..... 57

**Figura 27.** Concentrações de fósforo orgânico lável em solo cultivado com plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+ UAGC19, PA– biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e controle – C ..... 57

**Figura 28.** Concentrações de fósforo orgânico total solúvel em meio ácido (PoH) em solo cultivado com plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+ UAGC19, PA– biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e controle – C ..... 58

**Figura 29.** Concentrações de fósforo orgânico total solúvel em meio básico em solo cultivado com plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+ UAGC19, PA– biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e controle – C ..... 58

**Figura 30.** Atividade da enzima fosfatase ácida do solo cultivado com plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+ UAGC19, PA– biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e controle – C ..... 59

**Figura 31.** Atividade da enzima fosfatase alcalina do solo cultivado com plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+ UAGC19, PA– biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e controle – C ..... 60

**Figura 32.** Respiração basal do solo (RBS) de solo cultivado com plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+

UAGC19, PA – biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e controle – C..... 60

**Figura 33.** Contribuições relativas das componentes principais e das variáveis sobre a variância total dos dados de plantas cultivadas em campo. (A) Percentual de explicação da variância de cada componente principal. (B) Contribuição relativa das variáveis para as duas componentes principais. A linha tracejada vermelha no gráfico acima indica a contribuição média esperada. (C) Correlação das variáveis com as cinco principais componentes. O diâmetro dos círculos é proporcional a correlação entre a variável e as respectivas componentes principais (Dim) e a escala de cor indica o valor da correlação. Dia.C é diâmetro do colmo da planta de milho; HT é altura total; H.Espg.1 é altura de inserção da primeira espiga; N.Esp.C é o número de espigas comerciais; N.esp.total é o número de espigas total; P.esp é o peso de espigas; PF.Plant é o peso fresco total da planta; PoL é o fósforo orgânico lável; PoH é o fósforo orgânico total solúvel em meio ácido; PoOH é fósforo orgânico total solúvel em meio básico; Pmic é o fósforo da biomassa microbiana; RBS é a respiração basal do solo; Beta é a enzima B-glucosidase do solo; aci.P é a enzima fosfatase ácida do solo; alc.P é a enzima fosfatase alcalina do solo..... 62

**Figura 34.** Biplot da análise de componentes principais das variáveis de milho cultivado em campo. Os rótulos em vermelho são as variáveis mensuradas e os polígonos coloridos representam as médias dos tratamentos para os dois blocos experimentais. As duas componentes principais explicaram cerca de 54% da variância total estimada. Dia.C é diâmetro do colmo da planta de milho; HT é altura total; H.Espg.1 é altura de inserção da primeira espiga; NEC é o número de espigas comerciais; N.esp.total é o número de espigas total; P.esp é o peso de espigas; PF.Plant é o peso fresco total da planta; PoL é o fósforo orgânico lável; PoH é o fósforo orgânico total solúvel em meio ácido; PoOH é fósforo orgânico total solúvel em meio básico; Pmic é o fósforo da biomassa microbiana; RBS é a respiração basal do solo; Beta é a enzima  $\beta$ -glucosidase do solo; aci.P é a enzima fosfatase ácida do solo; alc.P é a enzima fosfatase alcalina do solo..... 63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Espécies de bactérias solubilizadoras de fosfato .....	14
<b>Tabela 2.</b> Atributos químicos do solo coletado na profundidade de 0-20 cm no município de São João-PE .....	26
<b>Tabela 3.</b> Caracterização dos biochars de palha de arroz (PA) e uva branca (UB).....	30
<b>Tabela 4.</b> Médias gerais, desvio padrão, coeficiente de variação do modelo estatístico e significância dos fatores, de acordo com análise de variância para variáveis de solo e planta. ....	33
<b>Tabela 5.</b> Atributos químicos de um Neossolo Regolítico Distrófico situado no município de Jupi, PE .....	50
<b>Tabela 6.</b> Médias gerais, desvio padrão, coeficiente de variação do modelo estatístico e significância dos fatores, de acordo com análise de variância para 17 variáveis de solo e planta.....	53

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA GERAL .....	3
2.1 Fósforo no Solo.....	3
2.2 Biochar na Agricultura.....	3
2.3 Microrganismos e seu Papel na Mineralização e Solubilização de Fósforo.....	4
2.4 Características Gerais e Importância Econômica do Milho.....	5
3. CAPÍTULO I PERSPECTIVAS DO BIOCHAR COMO UM VEÍCULO DE INOCULAÇÃO PARA BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO: UMA REVISÃO .....	7
3.1 RESUMO.....	8
3.2 ABSTRACT.....	9
3.3 INTRODUÇÃO .....	10
3.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	12
3.4.1 História dos inoculantes bacterianos.....	12
3.4.2 Bactérias solubilizadoras de P.....	14
3.4.3 Mecanismos de solubilização de P.....	15
3.4.4 O que um inoculante biológico deve ter .....	17
3.4.5 Formulação de inoculantes.....	18
3.4.6 Viabilidade do biochar como componente de inoculantes microbianos .....	19
3.5 CONCLUSÕES .....	21
4. CAPÍTULO II INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO ASSOCIADAS A BIOCHAR EM SEMENTES DE MILHO .....	22
4.1 RESUMO.....	23
4.2 ABSTRACT.....	24
4.3 INTRODUÇÃO .....	25
4.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	26
4.4.1 Área de implantação do experimento e coleta do solo.....	26
4.4.2 Obtenção das cepas bacterianas .....	27
4.4.3 Classificação taxonômica baseada no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA .....	27
4.4.4 Preparo dos inoculantes.....	27
4.4.5 Produção e caracterização dos biochars .....	28
4.4.6 Delineamento e unidade experimental .....	30
4.4.7 Variáveis da planta .....	31
4.4.8 Variáveis do solo .....	32
4.4.9 Análises estatísticas.....	32
4.5 RESULTADOS .....	33
4.5.1 Análise de variância do modelo fatorial.....	33
4.5.2 Resposta da planta.....	33
4.5.3 Efeitos nas propriedades químicas do solo .....	34
4.5.4 Atividades enzimáticas e respiração basal do solo .....	36
4.5.5 Análise multivariada .....	39
4.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.7 CONCLUSÕES .....	44

5. CAPÍTULO III EFEITO DE INOCULANTES MICROBIANOS E FONTES DE BIOCARVÃO NAS PROPRIEDADES QUÍMICAS E BIOQUÍMICAS DO SOLO .....	45
5.1 RESUMO .....	46
5.2 ABSTRACT .....	47
5.3 INTRODUÇÃO .....	48
5.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	49
5.4.1 Área de implantação do experimento e caracterização do solo .....	49
5.4.2 Delineamento e unidade experimental .....	50
5.4.3 Instalação e condução do experimento .....	50
5.4.4 Variáveis agronômicas do milho verde .....	51
5.4.5 Variáveis do solo .....	51
5.4.6 Análises estatísticas .....	52
5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
5.5.1 Análise de variância do modelo fatorial .....	53
5.5.2 Variáveis fitotécnicas da planta .....	53
5.5.3 Propriedades químicas do solo .....	56
5.5.4 Atividades enzimáticas e respiração basal do solo .....	59
5.5.5 Análise multivariada .....	61
5.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	64
5.7 CONCLUSÕES .....	68
6. CONCLUSÕES GERAIS .....	69
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	70

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Na agricultura moderna, se busca cada vez mais eficácia no uso dos recursos naturais. O fornecimento de nutrientes com eficiência, em especial o fósforo (P), é fundamental para garantir uma boa produtividade das culturas (BARROSO; NAHAS, 2005). A maior parte do P utilizado na agricultura vem de reservatórios naturais de rochas fosfáticas, que são uma fonte não renovável (PANTANO et al., 2016). Há estimativas que essas reservas podem acabar nos próximos 50-100 anos (CORDELL et al., 2009). Nesse sentido, são essenciais o manejo adequado e o estímulo a boas práticas no uso de fertilizantes, com aplicação na dose, época e locais corretos (CASARIN; STIPP, 2013).

O P é um macronutriente que se encontra em baixa disponibilidade em solos tropicais, cuja mineralogia é predominantemente caracterizada por elevados conteúdos de óxidos e hidróxidos de Fe e Al ávidos por adsorver, de forma quase irreversível, íons fosfatos do solo (SOUCHE et al., 2005). No entanto, considerando áreas agricultáveis, que já possuem histórico de produção convencional, com aplicações sazonais ou regulares de pré-plantio e manutenção de fertilizantes minerais a base de fosfato, bolsões de P no solo podem ser formados a partir do acúmulo de P adsorvido, por coloides de Fe e Al e pela biomassa microbiana (NOBILE et al., 2020). Nesse contexto, microrganismos solubilizadores de P desempenham um papel central na biodisponibilização desse nutriente, otimizando seu uso e propiciando um crescimento vegetal salutar.

O uso de microrganismos solubilizadores de fosfato é uma alternativa para aumentar a eficiência na aplicação de fertilizantes, com vantagens de baixo custo e menores danos ambientais, podendo ser aplicados de maneira suplementar aos fertilizantes minerais (KALAYU, 2019). Dessa forma, é possível aumentar a produtividade das áreas de produção sem necessariamente utilizar uma maior quantidade de nutrientes (REETZ, 2017). Através de mecanismos como a solubilização e a mineralização, os microrganismos podem aumentar a disponibilidade de formas pouco solúveis de P e converter o P inorgânico em orgânico, facilitando a absorção pelas raízes (KHAN et al., 2009). Diversos estudos comprovam que o uso de inoculantes com microrganismos solubilizadores promovem o aumento da disponibilidade de P e absorção pelas culturas em vários países (RICHARDSON et al., 2009; OWEN et al., 2015).

Outra alternativa que vem sendo bastante estudada atualmente para diversos fins é o biochar, material carbonáceo obtido através da pirólise lenta de materiais diversos, que pode apresentar bons teores de nutrientes em sua composição (a depender do material) e liberação lenta, melhorando o aproveitamento para as plantas (NIGUSSIE et al., 2012). Essa melhoria se deve a área superficial, a porosidade do biochar e por agir como meio para o desenvolvimento de microrganismos que possam ser favoráveis (MEDEIROS et al., 2020).

A turfa é o veículo de inoculação mais utilizado atualmente, porém, ela é proveniente de fontes finitas (DEAKER et al., 2011). Muitos candidatos a substitutos da turfa foram testados e biochars de diversas fontes estão entre eles. Medeiros et al. (2020), testando a associação de biochar e *Trichoderma aureoviride* na cultura do melão, obtiveram respostas positivas quanto ao uso do biochar como veículo de inoculação.

Na literatura há relatos de diversos efeitos benéficos da aplicação do biochar ao solo, como sequestro de carbono (NÓBREGA, 2011), fertilizante e condicionante do solo, retenção de água (CARVALHO et al., 2014), aumento da CTC (LIANG et al., 2006), aumento do pH (SANI et al., 2020), fonte de nutrientes como fósforo, cálcio, manganês (DAI et al., 2013) e melhora no desempenho de culturas (ABIVEN et al., 2014). O biochar também é uma alternativa para a destinação de subprodutos sólidos da indústria em geral, uma vez que após a

queima, o biocarvão possui um menor volume, facilitando o armazenamento e transporte (BROWN, 2010). A conversão dos subprodutos orgânicos pode gerar três produtos de interesse comercial: o biochar, o bio óleo e o gás de síntese (*syngas*) (CHEN et al., 2012). As características do biochar variam de acordo com o material utilizado em sua fabricação, e cada biochar vai causar respostas diferentes nos sistemas envolvendo solo, microrganismos e plantas, dependendo do manejo e condições a que esse sistema está sendo submetido (ABIVEN et al., 2014).

O milho é um dos cereais mais cultivados no mundo e o Brasil está entre os três maiores produtores desse grão (FAO, 2019). Na região do Agreste de Pernambuco, o plantio do milho é realizado no período das águas, que compreende a maior precipitação na região, ou seja, nos meses de abril a julho. Porém, com as mudanças climáticas que vêm ocorrendo no mundo, o plantio não tem data certa para iniciar, sendo dependente das chuvas, e nem sempre a colheita atende o período de maior demanda do grão, nos meses de junho e julho, devido aos festejos culturais da região onde a procura é pelo milho verde para consumo na forma de bolos, pamonhas, curau e biscoitos (PEREIRA FILHO, 2002). Essa região também é uma importante bacia leiteira, onde o milho também é destinado para a alimentação animal na forma de ração (EMBRAPA, 2015).

A tese se divide em três capítulos: I - Perspectivas do biochar como um veículo de inoculação para bactérias solubilizadoras de fosfato: uma revisão; II - Inoculação de bactérias promotoras de crescimento associadas a biochar em sementes de milho; iii - efeito do revestimento biodegradável á base de biochar e bactérias solubilizadoras de fosfato em sementes de milho.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos: (i) apresentar uma breve revisão de literatura sobre a viabilidade do biochar como veículo de inoculação para bactérias solubilizadoras de fosfato; (ii) avaliar bactérias do gênero *Klebsiella aerogenes* associadas a biochars de diferentes origens aplicadas em sementes de milho, em condições de casa de vegetação e no campo, e verificar seus efeitos nas características da planta, na bioquímica e química do solo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA GERAL

### 2.1 Fósforo no Solo

O fósforo (P), o potássio (K) e o nitrogênio (N) são macronutrientes primários, sendo absorvidos em grandes quantidades pelas plantas e, por conseguinte, considerados como essenciais ao desenvolvimento das culturas, sejam elas perenes ou anuais (MALAVOLTA, 2006).

A dinâmica do P está diretamente associada às propriedades físico-químicas e mineralógicas dos solos (RHEINHEIMER et al., 2008), assim como às condições ambientais que regem as atividades dos microrganismos, os quais imobilizam ou liberam os íons ortofosfatos (RHEINHEIMER et al., 2008). O P, por estar em baixas concentrações na solução do solo, e por ser facilmente adsorvido pelas superfícies dos coloides, formam precipitados como fosfatos de cálcio (Ca), magnésio (Mg), ferro (Fe) e alumínio (Al) e apresenta baixa mobilidade no solo. O P é absorvido pelas raízes através do processo de difusão, processo que por sua vez é restrito, e quanto maior a área ocupada pelo sistema radicular, maior será a absorção de P pela planta (GRANT et al., 2001).

O P do solo pode ser dividido em P inorgânico e P orgânico, dependendo da natureza do composto ao qual está ligado. O P inorgânico é separado em duas partes, o P dos minerais primários e o P adsorvido. O P inorgânico (Pi) corresponde a cerca de 15 a 80% do P disponível no solo para as plantas e deve ser considerado em termos da sua biodisponibilidade e dinâmica. O P orgânico (Po) é proveniente dos restos da biomassa vegetal que permanecem no solo, do tecido microbiano e da decomposição. Os processos biológicos são os responsáveis pela dinâmica e disponibilidade dessa forma de P no solo (OLIVEIRA et al., 2014). Segundo Gatiboni et al. (2007), a contribuição do Po para a nutrição de plantas é de 6% para solos que receberam adubação fosfatada e cerca de 43% para regiões nativas sem influência da ação antrópica. A disponibilidade de Po no solo está condicionada não apenas às características físico-químicas do solo, mas também à ação dos microrganismos e às condições climáticas que interferem na atividade microbiana.

Os estudos abordando a disponibilidade de P, tanto nas formas orgânica quanto inorgânica, são desenvolvidos predominantemente em regiões úmidas e/ou de clima temperado, restringindo a possibilidade de extrapolar os dados para as regiões tropicais secas. No semiárido nordestino, com destaque o Bioma Caatinga, os estudos sobre a disponibilidade de P em suas formas são raros ou são realizados em áreas de pouca abrangência (ARAÚJO et al., 2004; SILVA et al., 2008).

O bioma da Caatinga apresenta uma sazonalidade climática que está diretamente ligada à sobrevivência dos organismos do solo. A exploração predatória da região, com o mau uso do solo devido a práticas agrícolas inadequadas, tem afetado a biota do solo (ARAÚJO NETO et al., 2013). Além disso, a ausência de biomassa vegetal tem intensificado a erosão, promovendo a degradação da estrutura do solo e o carreamento de suas partículas, bem como lixiviação de nutrientes, matéria orgânica e microrganismos, empobrecendo cada vez mais os solos da Caatinga (SILVA et al., 2008).

No semiárido nordestino, os tipos dos solos são bastante diversificados e possuem diversos níveis de intemperização, quando comparados às regiões úmidas do país. Consequentemente, é esperado que os teores de P do solo sejam dos mais variados.

### 2.2 Biochar na Agricultura

Na busca por uma agricultura sustentável, o biochar tem despertado muito interesse devido à sua utilidade agrícola e ambiental. O biochar é um produto da transformação pirolítica

de resíduos orgânicos em temperaturas altas e condições de oxigênio limitadas. É considerado um material ecológico, eficiente e versátil, empregado principalmente como condicionante de solo, pois dispõe de uma série de propriedades físico-químicas adequadas (AAMER et al., 2020; SANI et al., 2020).

A aplicabilidade do biochar e suas influências na qualidade do solo e nas propriedades agronômicas das plantas cultivadas, têm sido averiguadas de diversas formas em condições controladas (LIMA et al., 2018) e em campo (YANG et al., 2020). Também tem sido empregado em culturas de ciclo curto (SANI et al., 2020), perenes (GIAGNONI et al., 2019) e em sucessivos ciclos de rotações de culturas (RIBEIRO et al., 2020), afora sua aptidão como veículo de inoculação de microrganismos (MEDEIROS et al., 2020).

A diversidade de suas propriedades confere sua empregabilidade na agricultura, destacando-se a sua atuação no sequestro de carbono no solo (YANG et al., 2020) e no incremento da capacidade de retenção de água no solo (GLAB et al., 2020). Colabora também na melhoria da fertilidade solo e no aumento do seu pH (SANI et al., 2020), agregando qualidade nos sistemas de produção agrícola, na estrutura do solo, na abundância microbiana e na eficiência no uso de nutrientes (AAMER et al., 2020).

De forma crescente, o biochar vem sendo explorado e estudado visando aprimorar seu uso para a sustentabilidade ambiental, como no caso do gerenciamento de resíduos sólidos e redução da emissão de gases do efeito estufa (LYU, et al., 2022). Ainda, por sua estrutura altamente porosa e por conter diversos grupos funcionais (hidroxilas, carboxilas e compostos fenólicos), o biochar possui afinidade para a adsorção de metais pesados do solo e da água (como  $Al^{3+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  e  $Zn^{2+}$ ), sendo considerado um adsorvente potencial (REGKOUZAS; DIAMADOPoulos, 2019; XIAO et al., 2020).

No tocante à produção agrícola, os efeitos de interação do biochar com o sistema solo-água-planta-biota podem ser muito variáveis. As produtividades podem aumentar (ARIF et al., 2017), diminuir (LIU et al., 2019) ou até mesmo não serem influenciadas (AKOTO-DANSO et al., 2019). Estas respostas são resultantes da forma com a qual o biochar influí no sistema de interação sob estudo. Porém há uma imprevisibilidade, dada a multiplicidade dos diferentes atributos dos componentes da interação.

### **2.3 Microrganismos e seu Papel na Mineralização e Solubilização de Fósforo**

Alguns microrganismos como bactérias, fungos e actinomicetos presentes nos solos possuem um papel importante no ciclo natural do P, sendo responsáveis pela hidrólise do P para a forma inorgânica, tornando-o disponível para as plantas e sendo estes processos mediados por enzimas (OLIVEIRA et al., 2013). Devido à alta reatividade do P com outros componentes do solo, vem crescendo o desenvolvimento de tecnologias visando o melhor aproveitamento dos insumos aplicados no campo, e também a melhoria da disponibilidade de nutrientes (RICHARDSON, 2001).

Estudos vêm demonstrando que a inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato (BSF), seja em sementes ou no solo, resultam em maiores rendimentos de culturas (CHABOT et al., 1996; WAKELIN et al., 2004; AHMED; EL-ARABY, 2012), pois promovem o aumento da disponibilidade de P e absorção pelas culturas, com resultados positivos em vários países (RICHARDSON et al., 2009; OWEN et al., 2015). Segundo Herath et al. (2015), a aplicação de BSF no solo usando um biofilme microbiano aumentou em 15 vezes a disponibilidade de P, o que indica que esses organismos podem ser usados como alternativa para o uso de menos insumos fosfatados na agricultura. As BSF têm a capacidade de transformar formas insolúveis de P em solúveis por diversos processos como: quelação, acidificação, reações de troca e formação de substâncias poliméricas que podem estar ligadas à produção de ácidos orgânicos (DELVASTO et al., 2006).

De modo geral, a ação de solubilizar P está muito interligada a modificação do pH, através de: i) utilização de ácidos orgânicos como glucônico, isovalérico, oxálico, tartárico, succínico, cítrico, fumárico e butírico, que diminuem o pH do meio ou processos de quelação; ii) mecanismo de extrusão de prótons H<sup>+</sup>, resultantes da assimilação de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; iii) produção de exopolissacarídeos por microrganismos do solo e IV) produção de sideróforos por microrganismos com alta afinidade por ferro (POSSO; DE PRAGER, 2017).

O processo de solubilização de fosfato no solo pelas bactérias é complexo e pouco compreendido e é afetado por diversos fatores como temperatura, pH, oxigênio, umidade, entre outros. Além disso, não há estudos específicos a respeito da interação da comunidade microbiana e das BSF na solubilização de fosfato.

## 2.4 Características Gerais e Importância Econômica do Milho

O milho (*Zea mays*), pertence à família *Poaceae (Gramineae)* e é considerado um cereal de alta qualidade nutritiva e grande potencial produtivo (GOMES et al., 2010). É uma planta com enorme variabilidade genética e grande adaptabilidade, sendo um dos cereais mais cultivados do mundo (MELO; CASIMIRO, 2017). A produtividade do milho é influenciada pelas condições climáticas durante as épocas de plantio e características do solo do local (LANDAU et al., 2015), de modo que a umidade do solo, a radiação solar, a variação de temperaturas e a precipitação pluviométrica podem influenciar significativamente na produção do milho.

O milho é cultivado em todas as regiões do Brasil, sob diferentes sistemas de plantio (LANDAU et al., 2015). De acordo com dados divulgados pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, em 2018, o Brasil se configurava como o terceiro maior produtor mundial do milho, apresentando autossuficiência para o consumo interno (FAO, 2019). A produção do milho é destinada para indústrias de rações para animais de criação e para o consumo humano (EMBRAPA, 2015).

O milho é o principal cereal utilizado para a produção de ração animal e o aumento na demanda por esse cereal está relacionado à necessidade de suprir um dos principais segmentos do comércio interno do Brasil, que é a avicultura e a suinocultura (SOUZA et al., 2018). Segundo dados do Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal – Sindirações, a produção de ração animal e sal mineral atingiu 81,5 milhões de toneladas em 2020, representando crescimento de cerca de 5% em comparação com o ano anterior. O sindicato, por sua vez constatou aumento na produção de ração de 4,5 % para o ano de 2021, com aumento na demanda pelo milho e estimando que em 2022 essa demanda continue a crescer devido às condições climáticas mais favoráveis (SINDIRACÕES, 2021).

Dos anos de 2021 para 2022, a área plantada destinada à produção de milho no Brasil cresceu 8,5%, sendo 7,3% na primeira safra e 8,9% na segunda (IBGE, 2022). A estimativa de produção para 2022 é de 112,0 milhões de toneladas, cerca de 27% a mais que no ano de 2021, totalizando 24,3 milhões a mais de toneladas de milho grão, com incremento tanto em área plantada quanto em produtividade. Comparando a produção de milho no Brasil em 2016/2017, que foi de 97,0 milhões de toneladas, em 2018/2019 de 100,0 milhões de toneladas, a cada ano o aumento é superior a 20% com relação à safra anterior (IBGE, 2019).

Além do milho grão, o milho verde possui boa aceitação no mercado interno e se destina principalmente para consumo in natura, cozido ou assado, e ainda usado em pratos típicos como pamonha, sorvetes, bolos e biscoitos (PEREIRA FILHO, 2002). Segundo a Embrapa (2021), o milho verde pode ser considerado uma hortaliça, pois seu período no campo varia de 90 dias no verão e 120 dias no inverno, permanecendo pouco tempo no campo. Não existe um censo atualizado de produção de milho verde no Brasil, mas sabe-se que a demanda interna do país tem aumentado, principalmente movida pela indústria de alimentos conservados.

Com a demanda crescente de produção do milho verde, o mercado torna-se mais exigente no que diz respeito a produtividade da cultura, padrão de tamanho e cor de grãos, de espiga e também com relação a sabor, se mais ou menos doce, e com isso já existem no mercado variedades capaz de atender essa exigência. No caso do consumo de milho verde, as seguintes características são necessárias: grãos com tamanhos padronizados e de cor amarela, espigas grandes e cilíndricas, sabugo C e longo período de colheita (EMBRAPA, 2021).

A Região Nordeste, apesar de não se destacar como grande produtora de milho verde, se destaca pelo alto consumo, principalmente nos meses de junho e julho quando se comemoram os festejos de São João e São Pedro, e aumenta a demanda e consumo de alimentos derivados do milho. No estado de Pernambuco, na região do Agreste Meridional, boa parte dos agricultores familiares que se dedica à cultura, utilizam sementes crioulas, também chamadas de sementes nativas. A escolha por essas sementes tradicionais se deve ao baixo custo de produção, uma vez que as sementes vêm da própria produção ou através de trocas entre associações de agricultores, e ao fácil manejo, pois as sementes são adaptadas as condições da região e porque possuem as características desejáveis de sabor e aparência, tendo boa aceitação no mercado regional.

Sementes crioulas são sementes que não sofreram modificações genéticas induzidas pela indústria, ou seja, são sementes antigas que possuem um alto nível de diversidade, com características muito variáveis, e constituem um recurso genético valioso (SANTOS; CURADO; TAVARES, 2019). No banco de sementes crioulas localizado na zona rural de Garanhuns, existem cerca de 150 variedades de espécies armazenadas das mais variadas plantas, entre feijão, fava e milho, e a variedade de milho Batité se destaca pela adaptabilidade na região (IPA, 2020). Não existe literatura abundante a respeito da variedade Batité, mas estima-se que a produtividade seja em torno de 10 sacas por  $ha^{-1}$  na região do Agreste Meridional do estado de Pernambuco.

### **3. CAPÍTULO I**

## **PERSPECTIVAS DO BIOCHAR COMO UM VEÍCULO DE INOCULAÇÃO PARA BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO: UMA REVISÃO<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Artigo publicado na revista Research, Society and Development em fevereiro de 2022

### 3.1 RESUMO

O fósforo (P) desempenha um papel vital em muitos aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas. A baixa quantidade de P disponível em solos agrícolas reduz a produtividade da cultura e fertilizantes fosfatados são frequentemente aplicados. Porém, devido à alta afinidade do P pelos constituintes do solo, a disponibilidade desse elemento torna-se limitada às plantas. Assim, técnicas alternativas, ecológicas e de baixo custo tem sido estudadas para melhorar a aquisição de P pelas culturas. Microrganismos capazes de solubilizar P, principalmente bactérias solubilizadoras de fosfato, têm se destacado por oferecer uma abordagem para superar a escassez de P por meio de sua introdução em sistemas agrícolas via inoculantes. Neste trabalho, mostramos o potencial de microrganismos solubilizadores de P e seus mecanismos de ação, o potencial de diferentes veículos de inoculação, destacando também o biochar como um produto biológico viável para produção de inoculantes. Os efeitos combinados desses fatores (bactérias solubilizadoras de fosfato e biochar) agregam vários benefícios ao sistema solo-planta. Os resultados desta revisão demonstram que os aditivos do biochar têm grande potencial como um veículo para inoculação de BSF. No entanto, estudos de biochar combinado com bactérias solubilizadoras de fosfato ainda são incipientes. Pesquisas futuras devem concentrar esforços na exploração de cepas altamente eficientes, otimizando as condições e avaliando várias fontes de resíduos para a produção de biochar e sua eficiência em experimentos de campo.

**Palavras-chave:** Fósforo disponível. Microrganismos solubilizantes. Inoculantes.

### 3.2 ABSTRACT

Phosphorus (P) plays a vital role in many aspects of plant growth and development. The low amount of available P in agricultural soils reduces crop productivity and phosphate fertilizers are often applied. However, due to the high affinity of P for the soil constituents, the availability of this element becomes limited to plants. Thus, alternative, ecological and low-cost techniques have been studied to improve P acquisition by crops. Microorganisms able to solubilize P, mainly phosphate-solubilizing bacteria have stood out, since they offer an approach to overcome P scarcity by their introduction in agricultural systems via inoculants. In this paper, we showed the potential of P-solubilizing microorganisms and their mechanisms of action, the potential of different inoculation vehicles, also highlighting the biochar as a viable biological product for production of inoculants. The combined effects of these factors (PSB and biochar) add several benefits to the soil-plant system. Results from this review demonstrate that biochar amendments have great potential as a vehicle for inoculation of phosphate-solubilizing bacteria. However, studies of biochar combined with phosphate-solubilizing bacteria are still incipient. Future research should focus efforts on exploring highly efficient strains, optimizing conditions, and assessing several sources of waste for production of biochar and their efficiency in field experiments.

**Keywords:** Available phosphorus. Solubilizing microorganisms. Inoculants.

### 3.3 INTRODUÇÃO

O fósforo (P) constitui moléculas como DNA, ATP, NADPH e fosfolipídios das membranas celulares, além de participar de processos como fotossíntese, respiração, metabolismo de carboidratos, fixação de N<sub>2</sub> e ativação de proteínas (VANCE et al., 2003). No entanto, a interação do P com os constituintes do solo, sua ocorrência em formas orgânicas e sua lenta taxa de difusão na solução do solo, torna o P um nutriente pouco disponível na rizosfera, reduzindo a produtividade das culturas em solos agrícolas em diferentes áreas do mundo (ZHU et al., 2018).

Localizados nas zonas Neotropicais, os solos brasileiros possuem quantidades desprezíveis de P devido ao seu material de origem e às interações deste elemento com o solo, que direcionam a agricultura nacional para o uso de quantidades substanciais de fertilizantes fosfatados (EMBRAPA, 2017). O Brasil importou cerca de 80% da matéria-prima para a fabricação de fertilizantes NPK em 2019, quando se estima que serão comercializadas cerca de 36,2 milhões de toneladas. O uso de fertilizantes por agricultores brasileiros cresceu cerca de 450% nos últimos 20 a 30 anos (MARTINS; PATAH, 2020; MAPA, 2022;).

Com mobilidade lenta, a maior parte do P é adsorvida aos coloides do solo, o que diminui as perdas por percolação. Portanto, a erosão é a principal causa das perdas de P contidas na matéria orgânica do solo e nas partículas coloidais (CHINTALA et al., 2014). O risco de perdas consideráveis de P e o aumento das taxas de eutrofização, devido ao alto acúmulo de fertilizantes fosfatados nos solos, tem sido observado em estudos de curto, médio e longo prazo (OLIVEIRA FILHO et al., 2020).

O P orgânico na matéria orgânica do solo é uma fonte relevante para a nutrição das plantas (LIANG et al., 2017). A dinâmica do P orgânico no solo está associada às condições ambientais que influenciam a atividade microbiana, que imobilizam ou liberam os íons ortofosfato (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>), e também às propriedades físico-químicas e mineralógicas dos solos (SANTOS et al., 2008). De acordo com Gatiboni et al. (2007), a contribuição do P orgânico na nutrição vegetal é de 6% para solos que receberam fertilização fosfatada e cerca de 43% para regiões nativas sem influência antrópica.

Em áreas aráveis com aplicações sazonais ou regulares de fertilizantes fosfatados, ocorrem bolsões de P no solo devido à sua adsorção em coloides ou imobilização na biomassa microbiana (NOBILE et al., 2020; OLIVEIRA FILHO et al., 2020). Tais reservatórios dificilmente estão disponíveis para as usinas, representando um investimento financeiro considerável, principalmente em um possível cenário de escassez de P no mercado. Portanto, fontes alternativas de fertilizantes são necessárias para reduzir a dependência de fertilizantes minerais (MEDEIROS et al., 2019).

A quantidade de fertilizantes minerais aplicados ao solo está aumentando a cada ano a fim de melhorar a produtividade das culturas (LEE et al., 2019). Aumentar a eficiência dos fertilizantes na produção agrícola requer uma abordagem multidisciplinar, que incluem a otimização da interação fertilizante-solo-planta. O Brasil enfrenta um grande desafio para o manejo de P em solos cultivados, para atender a demanda de aumento de produtividade, mas preservando os recursos naturais. No entanto, a alta dependência brasileira de fertilizantes P pode representar um uso insustentável de um recurso finito (WITHERS et al., 2018).

Ao contrário dos fertilizantes minerais, que requerem revolvimento do solo para incorporação, a aplicação de microrganismos fixadores ou solubilizadores é menos invasiva ao meio ambiente, pois são inoculados no solo com as sementes no momento da semeadura. Isso pode reduzir o risco de poluição de nascentes, efluentes e lençóis freáticos por meio da eutrofização. A utilização de microrganismos solubilizadores de fosfato é adaptável a sistemas de produção mais conservacionistas e orgânicos, dada a sua natureza biológica.

Uma grande variedade de organismos está envolvida no ciclo natural do P. Particularmente, os microrganismos desempenham um papel importante, sendo responsáveis por transformar o P insolúvel em formas solúveis acessíveis às plantas (ZHU et al., 2018). Os microrganismos solubilizadores de fosfato são objeto de estudo há décadas (KALAYU, 2019). Diversas espécies de grupos taxonômicos distintos são relatadas como solubilizantes (Actinomicetos, Cianobactérias, Bactérias e Fungos) e, entre esses, cepas de bactérias têm recebido atenção considerável.

Assim, devido à alta demanda e baixa eficiência dos fertilizantes fosfatados, além da importância de um manejo eficiente do P, surge a busca por novas tecnologias renováveis e sustentáveis para a agricultura e o meio ambiente (WITHERS et al., 2018). Existem diversos artigos científicos sobre a seleção de cepas microbianas eficazes para solubilização de P em diferentes agrossistemas e tipos de solo. No entanto, ainda há um déficit de trabalhos que associem a eficácia de fórmulas de inoculantes de baixo custo e acessíveis para produção.

Diante disso, o objetivo da presente revisão é (i) fornecer conhecimento sobre estudos de bactérias solubilizadoras de fosfato, (ii) mostrar qual é a natureza de um inoculante e quais são os diferentes materiais comumente usados para sua produção e (iii) destacar as vantagens e desvantagens do biochar como veículo de inoculação BSF.

### 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo é uma revisão narrativa sobre as perspectivas do biochar como veículo para inoculação de BSF. As revisões narrativas caracterizam-se por análises críticas da literatura, do ponto de vista teórico ou contextual (GRANT; BOOTH, 2009). As literaturas selecionadas foram extraídas das plataformas: SciELO, ScienceDirect, Elsevier, PubMed, SpringerLink e Journal CAPES. Onde foram aplicadas as seguintes palavras-chave, vinculadas por operadores booleanos (AND, OR): “fósforo disponível; “microrganismos solubilizantes”; “inoculantes”; “carvão negro” e “biochar”.

#### 3.4.1 História dos inoculantes bacterianos

A indústria de inoculantes microbianos entrega mais de 25 milhões de doses anuais ao mercado brasileiro (FRANCHINI et al., 2007), principalmente com foco na inoculação de leguminosas e apenas 10% para o cultivo de gramíneas. Esses produtos são o principal material de base biológica produzido e vendido no país, e estima-se que o uso de inoculantes bacterianos na agricultura cresça a uma taxa de 12,5% ao ano (OWEN et al., 2015; HOWIESON; DILWORTH, 2016).

O uso de inoculantes bacterianos na agricultura foi rastreado há séculos. Em tempos remotos, os agricultores perceberam que a produção de leguminosas poderia aumentar o rendimento da colheita subsequente em comparação com áreas sem cultivo anterior de leguminosas. No final do século XIX, o conhecimento adquirido com essa prática foi utilizado para desenvolver um método recomendado para a inoculação de leguminosas nos Estados Unidos (SMITH, 1992). Posteriormente, a descoberta da fixação de N<sub>2</sub> pelas leguminosas e o isolamento dos rizóbios dos nódulos radiculares dessas plantas permitiram a prática da inoculação bacteriana (CARDOSO; ESTRADA-BONILLA, 2019).

Em 1895, Nobbe e Hiltner desenvolveram técnicas para reproduzir *Rhizobium* spp. em laboratório, registrando a primeira patente com esses microrganismos, iniciando a produção desses inoculantes para uso em larga escala (HUNGRIA et al., 2005). Assim, a comercialização de inoculantes bacterianos teve início em 1898 (CARDOSO; ESTRADA-BONILLA, 2019), e a prática da inoculação de rizóbio tornou-se comum a partir de então.

No final da década de 1970, Döbereiner e Day (1976) descreveram o potencial do gênero *Azospirillum* para promover o desenvolvimento de plantas não leguminosas. Bashan; Levanony (1990) reuniu dados que demonstraram efeitos positivos da inoculação de *Azospirillum* para a produtividade do milho no campo, concluindo que as respostas foram bastante substanciais devido à fixação biológica de nitrogênio. Após observações de que a promoção do crescimento das plantas causada pela inoculação com *Azospirillum* sp. foi principalmente devido à promoção do crescimento da raiz e não à fixação de nitrogênio (OKON; LABANDERA-GONZALEZ, 1994), os objetivos experimentais e projetos foram alterados.

Döbereiner e equipe isolaram a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* em plantas de cana-de-açúcar na década de 1990 (CAVALCANTI; DÖBEREINER, 1988). A partir de então, foi possível isolar e identificar bactérias endofíticas em amostras de caules, folhas e raízes, capazes de colonizar plantas de cana-de-açúcar como *G. diazotrophicus* (REIS et al., 1994), *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* (OLIVARES et al., 1996), *Azospirillum* spp. e novas espécies do gênero *Burkholderia* (PERIN et al., 2006).

Além disso, a co-inoculação de bactérias já é utilizada em países como África do Sul e Argentina, mas os estudos ainda são incipientes no Brasil. A co-inoculação proporciona maior crescimento radicular, além de maior potencial de nodulação e resposta eficiente na interação de bactérias diazotróficas, principalmente com as espécies *Azospirillum* brasiliense e *Bradyrhizobium japonicum* (ZUFFO et al., 2016). Outros benefícios dessas bactérias são a

capacidade de penetrar nas raízes das plantas, o antagonismo a fitopatógenos, a associação com diversas gramíneas como o milho, a produção de fitohormônios e a tolerância às variações de temperatura (ARAÚJO, 2008).

Além das misturas de cepas bacterianas utilizadas na formulação dos inoculantes, outros grupos foram investigados isoladamente ou por co-inoculação, como *Bacillus* (SZILAGYI-ZECCHIN et al., 2015) e sua associação com fungos do gênero *Trichoderma* (CHAGAS et al., 2017) e bactérias pertencentes a *Pseudomonas* (LIFFOURRENA et al., 2018; MANZOOR et al., 2017), *Acetobacter* (FLORENTINO et al., 2017) e vários tipos de co-inoculação com *Azospirillum* e rizóbio (GALINDO et al., 2018).

Os primeiros inoculantes bacterianos específicos para solubilizar P datam de 1950, quando um produto conhecido como “Fosfobacterina”, derivado da mistura de caulim e *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum*, foi lançado no mercado na ex-União Soviética e no Leste Europeu, aumentando a mineralização do P no solo em 20% (KUCEY et al., 1989). No entanto, esses resultados não foram confirmados por estudos desenvolvidos nos anos seguintes, em outros países como os EUA (KUCEY et al., 1989). Em vários países (Austrália, Canadá, Brasil, EUA, Rússia), desde a década de 1950, há registros de produtos à base de bactérias como *Acidithiobacillus* sp., *Bacillus* spp. e fungos como *Penicillium bilaji* e *P. radicum*, visando a solubilização do P, porém, na maioria dos casos os resultados são inconclusivos e contraditórios (MENDES; DOS REIS JUNIOR, 2003).

Estudos que explicam as interações entre P e microrganismos têm recebido atenção especial, uma vez que microrganismos solubilizadores de fosfato são alternativas para melhorar a eficiência das fontes de P no solo (MASSENSSINI et al., 2015). Estudos têm explorado a melhoria do uso de nutrientes no solo, por meio de microrganismos capazes de solubilizar P (CISNEROS-ROJAS et al., 2017) e potássio (K) (BAGYALAKSHMI et al., 2017). Dworzanski et al. (2006) registraram a primeira patente utilizando *Bacillus megaterium*, *B. cereus* e *B. pectobacterium* para solubilização de P e K, fixar nitrogênio e promover o crescimento da planta, visando o desenvolvimento de um biofertilizante multifuncional. Os efeitos da dissolução de P e K foram comprovados em um experimento em casa de vegetação; no entanto, o produto não foi testado em campo (DWORZANSKI et al., 2006).

Em 2016, foi lançado o primeiro inoculante que obteve sucesso na solubilização do P (BiomaPhos ®) com tecnologia brasileira. O produto é o resultado da mistura de duas cepas bacterianas (*Bacillus megaterium* e *B. subtilis*). A inoculação com esses microrganismos pode acelerar a liberação na rizosfera de P inorgânico ou orgânico não disponível e enriquecer o solo biologicamente, aumentando a produtividade das lavouras (PAIVA et al., 2020). No cultivo do milho nos municípios de Santa Maria-RS e Palotina-PR, a mistura do BiomaPhos ® com a fertilização fosfatada a 50% da dose recomendada, resultou em ganhos de 28% na produtividade, comparados aos efeitos isolados dos tratamentos apenas com fertilizante fosfatado ou as cepas isoladas (PAIVA et al., 2020). Além disso, produtos contendo cepas de *Bacillus* são mais estáveis no solo devido à capacidade do *Bacillus* em formar endósporos, o que permite que a bactéria resista a condições abióticas extremas, como mudanças de pH, temperatura e presença de pesticidas (BAHADIR et al., 2018).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011) disponibiliza uma lista de microrganismos autorizados para a produção de inoculantes. Os inoculantes biológicos são avaliados de acordo com os pré-requisitos estabelecidos pelo MAPA, seguindo as instruções estabelecidas pela portaria nº. 13/2011. O MAPA estima que aproximadamente 150 cepas de microrganismos apresentam características que se enquadram nos parâmetros pré-estabelecidos, sendo utilizadas no desenvolvimento de inoculantes para diferentes culturas.

### 3.4.2 Bactérias solubilizadoras de P

Em 1948 Pikovskaya descobriu o papel desempenhado pelas bactérias no ciclo biogeoquímico do P, mineralizando P orgânico e solubilizando fosfato inorgânico insolúvel. Este estudo abriu caminho para pesquisas mais amplas sobre gêneros bacterianos que possuem essa capacidade (ZHU et al., 2018), os processos bioquímicos envolvidos (KUMAR 2016; AMEEN et al., 2019), localização geográfica (ZHU et al., 2018) e condições ambientais no qual cada cepa apresenta melhor desempenho e é capaz de sobreviver (PRABHU; BORKAR; GARG, 2019).

Dentre as espécies relatadas como solubilizadoras de P, destacam-se pela representatividade nos estudos aquelas classificadas nos gêneros *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* (Tabela 1). Bactérias do gênero *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* estão entre as mais abundantes na rizosfera (CHENG et al., 2017).

**Tabela 1.** Espécies de bactérias solubilizadoras de fosfato.

Espécies	Referências
<i>Azospirillum brasiliense</i>	Rodriguez et al., 2004; Moraes et al., 2019
<i>A. lipoferum</i>	Rodriguez et al., 2004
<i>Bacillus circulans</i>	Sharma et al., 2013; Satyaprakash et al., 2017
<i>B. megaterium</i>	Chen et al., 2006; Sharma et al., 2013; Satyaprakash et al., 2017; Hajjam; Cherkaoui, 2017
<i>B. polymyxa</i> ; <i>B. subtilis</i>	Khan et al., 2009; Sharma et al., 2013; Thakur et al., 2014; Hajjam; Cherkaoui, 2017
<i>B. pulvifaciens</i>	Gaur; Arora; Prakash, 1979
<i>B. coagulans</i> ; <i>B. fusiformis</i> ; <i>B. pumilus</i> ;	Sharma et al., 2013
<i>B. Chitinolyticus</i>	
<i>B. sircalmous</i>	Khan et al., 2009; Kumar; Kumar; Patel, 2018
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Liu et al., 2019; You et al., 2020
<i>B. cepacia</i>	Pande et al., 2020
<i>B. multivorans</i>	Zeng et al., 2017
<i>B. stabilis</i>	Park; Yeom; Yoon, 2018
<i>B. tropica</i>	Anillo et al., 2016; Bernabeu et al., 2016
<i>Enterobacter asburiae</i>	Kumar et al., 2016
<i>E. cloacae</i>	Borham; Belal; Metwaly, 2017
<i>E. ludwigii</i>	Lee et al., 2019
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	Sharma et al., 2013
<i>Pseudomonas canescens</i>	Alam et al., 2002
<i>P. putida</i>	Alam et al., 2002; Ghaderi et al., 2008; Khan et al., 2009; Thakur; Kaushal; Shyam, 2014
<i>P. calcis</i>	Sharma et al., 2013
<i>P. fluorescens</i>	Ghaderi et al., 2008; Khan et al., 2009; Sharma et al., 2013; Thakur et al., 2014; Hajjam; Cherkaoui, 2017
<i>P. striata</i>	Khan et al., 2009; Sharma et al., 2013; Thakur et al., 2014; Hajjam; Cherkaoui, 2017
<i>Pantoea agglomerans</i>	Son et al., 2006
<i>Rhizobium meliloti</i>	Sharma et al., 2013
<i>R. leguminosarum</i>	Afzal; Bano, 2008; Walpola; Yoon, 2012; Hajjam; Cherkaoui, 2017
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	Peix et al., 2001

Além de melhorar a disponibilidade de P para as plantas, as BSF também são capazes de mobilizar metais pesados tóxicos para plantas e humanos (MOHAMED; ALMAROAI, 2017; TENG et al., 2019), gerando benefícios para a biodiversidade da micro e macrofauna do solo, permitindo assim o cultivo em solos previamente contaminados. Nessas circunstâncias, Ahemad (2015) avalia o uso das BSF como uma alternativa economicamente viável, causando menor impacto ao meio ambiente, sem comprometer a estrutura do solo, nem sua microfauna, em comparação aos insumos minerais tradicionalmente utilizados.

Irfan et al. (2019), aplicando uma mistura de diferentes linhagens de BSF e carreadores de inóculo em solo salino na cultura do milho, observaram um aumento significativo no crescimento das plantas e na produção de milho, para todos os tratamentos em relação ao controle independentemente do nível de salinidade. Shahzad et al. (2017) observaram resultados semelhantes com o trigo, devido à produção de ACC desaminase pelas BSF, que catalisam as enzimas ACC sintase liberadas pelas plantas sob condições de estresse, reduzindo os efeitos da alta concentração de sais. De acordo com Nadeem et al. (2013), esse processo também favorece o crescimento da comunidade microbiana introduzida, uma vez que a degradação da ACC sintase produz  $\alpha$ -cetobutirato e como subproduto a amônia, que é absorvida pelos microrganismos promovendo uma relação simbiótica positiva.

Diversas espécies de grupos taxonômicos distintos são relatadas como solubilizadores de P (Actinomycetos, Cianobacterias, Bacteria e Fungos) e dentre elas as linhagens de bactérias têm recebido considerável atenção. Com aproximadamente 10<sup>1</sup> a 10<sup>10</sup> indivíduos por grama de solo dentro das comunidades microbianas do solo, as populações bacterianas podem ultrapassar 2.000 kg ha<sup>-1</sup> do peso vivo nesses habitats, enquanto as BSF podem representar entre 1 e 50% do total das comunidades desses microrganismos (KHAN et al., 2009).

As características fisiológicas e as propriedades bioquímicas dos espécimes de bactérias tornam esses microrganismos colonizadores de uma grande variedade de habitats. Com distribuição cosmopolita, espécies de BSF são isoladas principalmente de amostras de solo rizosférico. No entanto, evidências demonstram uma relação simbiótica com vários grupos de plantas, podendo ocorrer também como endófitas (DONATO et al., 2019).

Vassilev et al. (2012) relataram a ocorrência de solubilização de P por bactérias em condições adversas. Estresses abióticos como escassez de água, mudanças de pH (alto ou baixo), salinidade e temperaturas, aparentemente, não exerceram influências negativas no fenômeno de solubilização. Prabhu; Borkar; Garg, (2019) destacam essas características e classificam bactérias tolerantes e solubilizadoras de fosfato extremófilas como potenciais bioinoculantes, principalmente em áreas agrícolas antropizadas. A eficácia das espécies de BSF é relatada em várias condições, como altos níveis de salinidade (NAKBANPOTE et al., 2014) e variações de pH (PRABHU; BORKAR; GARG, 2018).

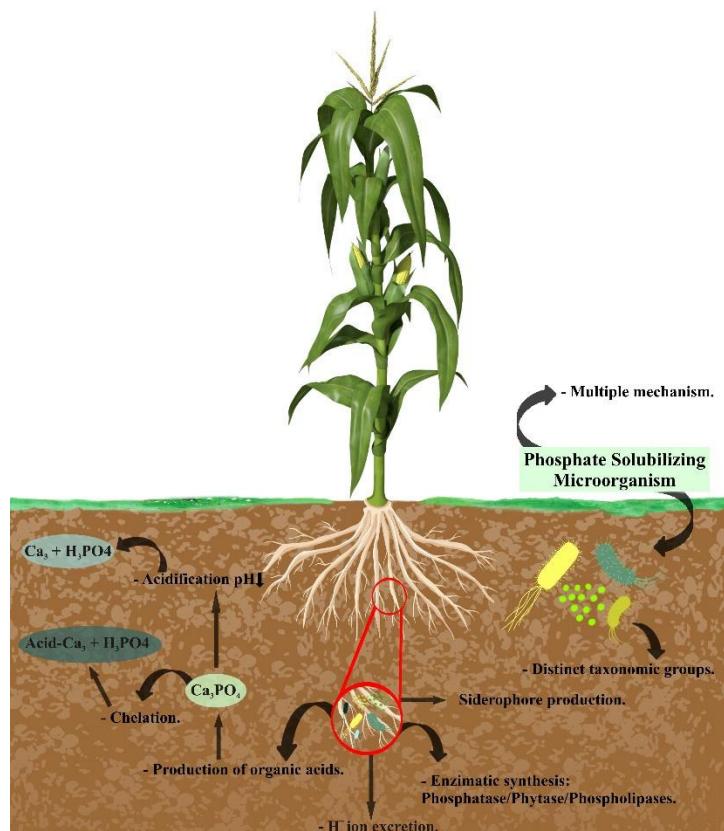
Os benefícios da inoculação de espécies de BSF são relatados em diversas culturas, promovendo o crescimento e desenvolvimento de eucalipto (FOLTRAN et al., 2019), algodão (AKHTAR et al., 2010), feijão (BELHARDI et al., 2018), tomate (ANILLO et al., 2016), soja (BELHARDI et al., 2018).

### 3.4.3 Mecanismos de solubilização de P

Variações na capacidade de solubilizar P no solo, por táxons de BSF, foram discutidas nos últimos anos (GUPTA et al., 2012; MASSENSSINI et al., 2015; ZHU et al., 2018). O aumento da disponibilidade de P foi documentado, principalmente, por espécies dos gêneros *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* e *Rhizobium* (ANILLO et al., 2016; HAJJAM; CHERKAOUI, 2017; BELHARDI et al., 2018). De acordo com Zhu et al. (2018), a capacidade de solubilização pode ser atribuída a fatores como espécie, linhagem, propriedades

do solo (inerentes e sazonais) e espécies vegetais presentes na área. No entanto, embora o aumento da produtividade relacionado à promoção da disponibilidade de P pela aplicação desses microrganismos seja amplamente reconhecido (HAJJAM; CHERKAOUI, 2017; BELHARDI et al., 2018), os mecanismos relacionados a esse fenômeno não são totalmente compreendidos.

Diferentes exsudatos de síntese microbiana, incluindo ácidos orgânicos, metabólitos e enzimas, surgiram como fatores essenciais para a solubilização do P (BEHERA et al., 2014). Além disso, a redução do pH do solo, a quelação e a mineralização foram relatadas como mecanismos importantes para esse fenômeno (KALAYU, 2019) (Figura 1).



**Figura 1.** Mecanismos de solubilização orgânica e inorgânica utilizados por bactérias (adaptado segundo PRABHU; BORKAR; GARG, 2019).

Em geral, a ação de solubilização do P por BSF estaria intimamente relacionada a quatro fatores: i) síntese de ácidos orgânicos como glucônico, isovalérico, oxálico, tartárico, succínico, cítrico, fumárico e butírico; ii) mecanismo de extrusão de prótons H<sup>+</sup>, a partir da assimilação de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; iii) produção de exopolissacarídeos e iv) produção de sideróforos com alta afinidade pelo ferro (POSSO; DE PRAGER, 2017).

Produtos do metabolismo bacteriano, os ácidos orgânicos influenciam a dinâmica natural do ciclo do P. A síntese desses ácidos tem uma forte correlação positiva com o índice de solubilização e a diminuição do pH do solo (SATYAPRAKASH et al., 2017). Estudos realizados com bactérias do gênero *Acinetobacter*, mostraram a solubilização de fosfatos dos ácidos glucônico, oxálico e butírico, proporcionando melhor desenvolvimento de culturas como repolho, pepino, margarida, cevada, trigo e grão de bico (KANG et al., 2009; OGUT et al., 2010). Segundo Kalayu (2019), a eficiência da solubilização depende da resistência e da natureza dos ácidos. O ácido glucônico é relatado como o principal ácido orgânico sintetizado

pelas BSF, como *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter agglomerans* (*Erwinia herbicola*) e *Burkholderia cepacia* (ZHU et al., 2018).

Entre os processos e mecanismos de solubilização do P, as substâncias quelantes desempenham um papel importante. Os ácidos sintetizados pelas BSF, como ácido 2-cetoglucônico, ácido húmico e ácido fúlvico, convertem formas insolúveis de fosfato por quelação de cátions (KHAN et al., 2009; PRABHU; BORKAR; GARG, 2019). Esses ácidos são fortes quelantes de fosfatos insolúveis tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), fosfato de alumínio ( $\text{AlPO}_4$ ) e fosfato de ferro ( $\text{FePO}_4$ ) (KHAN et al., 2009).

A solubilização do fosfato orgânico no solo ocorre pela ação de enzimas microbianas (JORQUERA et al., 2008). A produção de enzimas extracelulares como fosfoesterases, fosfodiesterases, fitases e fosfolipases por espécies de *Bacillus*, *Streptomyces* e *Pseudomonas*, por exemplo, mineralizam fosfatos orgânicos complexos convertendo-os em íons fosfato acessíveis para assimilação (KHAN et al., 2009; WALPOLA; YOON, 2012). Satyaprakash et al. (2017) também relataram a produção de sideróforos, que hidrolisam P orgânico. No entanto, Prabhu; Borkar; Garg, (2019) alertam que a relação entre a síntese de sideróforos e a solubilização de fosfato ainda não é totalmente compreendida.

### 3.4.4 O que um inoculante biológico deve ter

Devido à expansão da agricultura e a alta demanda por fertilizantes, alternativas que garantam a segurança ambiental e que sejam economicamente viáveis são demandadas pelos agricultores. Dentre algumas dessas alternativas, os biofertilizantes na forma de inoculantes caracterizam-se por serem ecossustentáveis, de baixo custo, porém, necessitam de formulação específica para uso (OWEN et al., 2015). Os inoculantes são produtos baratos, de fácil aquisição, apresentam resultados positivos quanto ao uso na agricultura, proporcionando grandes ganhos na produção e economia em fertilizantes minerais.

O sucesso do desenvolvimento microbiano após a introdução de inoculantes no solo está ligado a fatores abióticos como pH, temperatura, umidade e fatores bióticos como competição por nutrientes, substratos, predadores e a presença de patógenos que comprometem a sobrevivência bacteriana na rizosfera (SIVAKUMAR et al., 2014; REETHA et al., 2014).

O inoculante microbiano é um produto que contém microrganismos favoráveis ao crescimento das plantas. Classificados como sólidos (pó, sendo a turfa um suporte para bactérias) e fluidos (líquidos, onde as bactérias já têm seus processos metabólicos estabilizados via protetores celulares) (PRABHU; BORKAR; GARG, 2019).

Conforme definição do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no Decreto 4.954 (2004), art. 2º, inciso V, inoculante é todo o insumo biológico com microrganismos capazes de realizar atividades benéficas e necessárias ao desenvolvimento das plantas, produzidos de acordo com protocolos estipulados pela Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE). São produtos baratos, oferecidos em líquido, gel, turfa e até novas formulações. O inoculante em sua fórmula líquida pode ser aplicado via semente e sulco de semeadura; o inoculante à base de turfa só pode ser aplicado via semente (SILVA et al., 2009).

Esse material deve ter três características essenciais: promover um desenvolvimento bacteriano satisfatório, manter as células dos microrganismos viáveis por um determinado período de tempo e garantir a liberação gradual de uma população bacteriana que será benéfica para as plantas (BASHAN et al., 2014; CARDOSO; ESTRADA-BONILLA, 2019).

O biofertilizante é um fertilizante orgânico líquido, que pode ser produzido em meio aeróbico ou anaeróbico a partir de uma mistura de materiais orgânicos (esterco, frutas, leite), minerais (macro e micronutrientes) e água, provenientes da fermentação de resíduos agrícolas

ou de dejetos animais. Esses biofertilizantes podem substituir ou complementar a adubação química e podem ser utilizados em aplicações no solo ou foliares (SOUZA et al., 2013).

O termo biofertilizante também consta na Instrução Normativa (IN) 64 de 2008 do MAPA, que aprova o regulamento técnico de substâncias permitidas para sistemas orgânicos de produção. O biofertilizante é então definido como “produto contendo componentes ativos ou agentes biológicos, capazes de atuar direta ou indiretamente sobre a totalidade ou parte das plantas cultivadas, melhorando o desempenho do sistema de produção e que seja livre de substâncias proibidas pela regulamentação orgânica”. Assim, esta instrução normativa incorpora microrganismos benéficos (fungos e bactérias) que podem ter efeito estimulante e podem ser considerados biofertilizantes na produção orgânica.

### **3.4.5 Formulação de inoculantes**

A heterogeneidade inerente a qualquer solo é o principal obstáculo à inoculação. As bactérias introduzidas podem encontrar nichos na rizosfera da planta colonizados por outros microrganismos. Essas bactérias introduzidas e desprotegidas devem competir com a microflora nativa que muitas vezes está mais bem adaptada e, na maioria dos casos, não consegue resistir à predação da microfauna do solo. Em resposta, um papel importante para qualquer formulação de inoculante é fornecer um microambiente mais adequado, combinado com proteção física por um período prolongado (BASHAN; DE-BASHAN; PRABHU, 2016).

A substância potencial deve apresentar características físico-químicas estáveis, que garantam a integridade de suas propriedades organolépticas, como a conservação de sua forma, composição e estrutura molecular, além de odor e textura, de modo a não afetar o número de células viáveis, garantindo que após a aplicação do produto terá o desempenho esperado (ARORA; MISHRA, 2016).

Mesmo conservando a integridade, candidatos a veículos de inóculo não devem ser um meio desprovido de nutrientes, devendo conter substâncias e elementos químicos específicos que possam atender parte da demanda energética que a comunidade microbiana precisa para se manter viável (CORTÉS-PATIÑO et al., 2015), além de poder apresentar um pH adequado que promova a manutenção e propagação de microrganismos no momento da aplicação. Formulações inadequadas são as principais barreiras para a aprovação e comercialização de novos inoculantes (STEPHENS; RASK, 2000), assim como a dificuldade em ajustar fórmulas com características físicas, químicas e biológicas capazes de manter a população de microrganismos viável ao longo do tempo (SILVA et al., 2012).

Os veículos de inoculação compartilham o mesmo princípio fundamental, que é garantir a sobrevivência dos microrganismos de interesse, apesar de variarem em condições físicas (HUSNA et al., 2019; BOJKOV et al., 2020). Para tanto, alguns critérios devem ser atendidos antes que qualquer substância ou meio possa ser listado como potencial candidato, principalmente no que diz respeito às formulações que serão comercializadas e devem atender a rígidos padrões comerciais e legislativos.

Mesmo sendo elegíveis para um possível meio de inoculação, as matérias-primas devem ser significativamente abundantes, para que seus custos de extração e produção os tornem financeiramente viáveis. Outro ponto chave que deve ser abordado é a não toxicidade (HALE et al., 2015) e o uso de recursos renováveis, que garantem uma exploração contínua e sustentável.

De acordo com Bashan et al. (2014), existem cinco classes de materiais carreadores de inóculo: (1) turfa, carvão, biochar, argila e solo inorgânico; 2) resíduos de plantas de diversas origens industriais e agrícolas; (3) materiais inertes, polímeros e fragmentos de rocha tratados; (4) culturas microbianas liofilizadas, misturadas com óleo e bactérias secas; e (5) inoculação de

líquidos, com adição de produtos químicos que melhoram a viscosidade, estabilidade, tensão superficial, função e dispersão.

As formulações líquidas são suspensões que contêm componentes que melhoram a viscosidade e a estabilidade da solução (BASHAN et al., 2014). A principal vantagem desta formulação é o seu fácil manuseio, sendo a preferida pelos países desenvolvidos.

As formulações poliméricas foram testadas como um substituto industrial para a turfa comercial. Eles exibem várias características vantajosas, incluindo maior vida útil, viabilidade e densidade de cepas, facilidade de fabricação e melhor desempenho em campo. Alguns exemplos de polímeros são quitosana, alginato, ágar, goma de feijão, entre outros (BASHAN et al., 2014).

A turfa é a mais utilizada mundialmente como o veículo de inoculação de rizóbio, em pó ou participando da formulação de compostos orgânicos, exceto na África e Ásia onde esse material é caro. Um dos problemas da turfa é sua estabilidade, devido às suas características em termos de tamanho de partícula, pH, umidade, vida útil (DEAKER et al., 2004, 2011). Outro problema é a fonte finita, uma vez que não estão disponíveis grandes reservas mundiais de turfa com características propícias como veículos de inoculação. Materiais alternativos à turfa foram testados nas décadas de 1980 e 1990 como carvão, lama, pó de coco, filtro de cana-de-açúcar, mas todos obtiveram resultados piores quando comparados à turfa (SINGLETON et al., 2002). Embora outros insumos orgânicos tenham apresentado resultados positivos, o principal entrave é sua disponibilidade em quantidade para suprir a demanda do mercado.

### **3.4.6 Viabilidade do biochar como componente de inoculantes microbianos**

Biochar é um material carbonáceo de grão fino com alto teor de carbono orgânico e amplamente resistente à decomposição microbiana. Este material pode ser obtido por decomposição térmica (pirólise) da biomassa, sob condições limitadas de oxigênio (MEDEIROS et al., 2020b) e temperatura entre 300 a 900 °C (PANDEY et al., 2020). Diversas matérias-primas podem ser empregadas na produção do biochar, como casca de café (MARTINS FILHO et al., 2020), sobras de madeira (toras, cascas, galhos), gramíneas e outros resíduos da agricultura, pecuária e agroindústrias (MEDEIROS et al., 2020a).

Quando aplicado ao solo, o biochar cria uma reserva de carbono, servindo como uma rede que remove o CO<sub>2</sub> da atmosfera e o armazena no solo na forma de carbono recalcitrante (LEHMANN; JOSEPH, 2009), tornando o solo adequado para o sequestro de carbono. O biochar tem sido amplamente estimulado e reconhecido como um veículo de sequestro de carbono, e a reunião das Nações Unidas sobre mudanças climáticas em Copenhague descreve no projeto de texto de negociação: “Devemos prestar atenção especial ao papel dos solos no sequestro de carbono, incluindo o uso de biochar e sumidouros de carbono em terras áridas”.

Além disso, a aplicação do biochar na agricultura traz diversos benefícios, pois ajuda a reduzir a lixiviação de nutrientes, bem como as necessidades de irrigação e fertilizantes das plantas, devido à capacidade de retenção de nutrientes e água (RAZZAGHI et al., 2020); atua como condicionador do solo (AAMER et al., 2020; YE et al., 2020); aumenta a capacidade de troca catiônica, pois apresenta grupos funcionais carregados negativamente em sua superfície (LARA et al., 2013) e atua na agregação do solo (AMOAH-ANTWI et al., 2020). O Biochar também aumenta a estabilidade do carbono, adsorção e/ou complexação de matéria orgânica e componentes tóxicos, e melhora a saúde microbiana do solo (LI et al., 2017). A alta área de superfície específica e a porosidade do biochar criam um ambiente que promove o crescimento microbiano, como bactérias, fungos ectomicorrízicos, fungos micorrízicos e fungos micorrízicos arbusculares (PALANSOORIYA et al., 2019), atividades enzimáticas e ciclagem de nutrientes (WANG et al., 2016), e como alternativa para suprimir doenças de plantas (DEBODE et al., 2020).

Como o P é normalmente liberado em temperaturas superiores a 800 °C, é mais provável que a pirólise não seja suficiente para disponibilizá-lo, portanto, o P pode ser retido do biochar na forma inorgânica ou orgânica (SCHMALENBERGER et al., 2016). Estudos recentes sugerem que a interação do biochar no solo também pode influenciar na disponibilidade de P, devido a mudanças no pH, na eficiência enzimática, na formação de complexos organominerais, que podem aumentar a solubilidade do P através de mudanças induzidas na comunidade microbiana do solo (DU et al., 2019; LI et al., 2020; SHI et al., 2020). Diante dessas vantagens para as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (BUTNAN et al., 2015), o biochar surge como uma alternativa promissora e ecologicamente favorável para aumentar a produtividade das culturas agrícolas (BUTNAN et al., 2015; MARTINS FILHO et al., 2020).

Além disso, o biochar pode ser um eficiente componente de inóculo para alguns microrganismos (MEDEIROS et al., 2020a). Qian et al. (2020), ao avaliar a biotransformação de P no biochar associado a *Pseudomonas putida*, comprovaram que o biochar pode ser um potencial fertilizante de P. No entanto, deve-se levar em consideração o tipo de matéria-prima e a temperatura utilizada para a produção do biochar, o que influencia no seu desempenho. Medeiros et al. (2020a) avaliaram biochars de resíduos de café e descobriram que ele pode ser um veículo de inoculação para *Trichoderma aureoviridae*, um microrganismo multifuncional no solo. Yan et al. (2020) reforçam a afirmação de que o aumento da disponibilidade de P através do biochar varia de acordo com o resíduo utilizado e a temperatura de pirólise, ressaltando que temperaturas mais altas favorecem o fornecimento de P.

A literatura de patentes mostra no documento CN108083908 (A) que o biochar misturado com ácido maleico, nitrato de amônio e um agente microbiano misto composto por sacaromicetos, bactérias fotossintéticas, *Bacillus subtilis*, *Rhizobium*, *Trichoderma viride* e *Bacillus* é usado como fertilizante microbiano, biofertilizante e/ ou modificador de solo. Outro produto contém 95-98% de biochar e 2-4% de agente probiótico, composto por *Paenibacillus polymyxa*, cepas de *Trichoderma*, rizóbios, bactérias fixadoras de nitrogênio, solubilizadores de fosfato, potássio, decompositores de celulose, geradores de antibióticos e fotossintéticos (CN102660291 (A)). O biochar de casca de feijão foi inoculado com *Trichoderma aureoviride* para a formulação de um biofertilizante (BR1020180163680) e também para fixar uma mistura de agentes microbianos como *Shewanella putrefaciens*, *Geobacter metallireducens*, *Trichoderma viride* e *Trichoderma harzianum* e uma bactéria protetora, *Bacillus subtilis* (CN109609417 (A)).

Nesse sentido, o biochar pode ser uma alternativa econômica e ecologicamente correta, pois serve como ferramenta de reaproveitamento de resíduos gerados pelo agronegócio que gera 200 milhões de toneladas de biomassa a partir de resíduos no Brasil (MARTINEZ et al., 2019). Tendo em vista a extensa literatura mostrando resultados positivos do uso do biochar em solos agrícolas, foi considerado um fertilizante ecológico para a agricultura sustentável e moderna (CHEN et al., 2018), e como membro de inoculantes microbianos (MEDEIROS et al., 2020a, b).

### **3.5 CONCLUSÕES**

Como a maioria dos solos brasileiros é deficiente em fósforo e as fontes de fosfato são recursos naturais não renováveis, o uso eficiente de P na agricultura é essencial. A produção de biofertilizantes e bioinoculantes são estratégias para introdução de microrganismos capazes de melhorar a disponibilidade de P. Além disso, a seleção de cepas de bactérias que sejam altamente eficientes na solubilização do P e na adaptação a diferentes agrossistemas são cruciais para alcançar o desempenho bem-sucedido do fornecimento de P às plantas. A utilização do biochar traz diversos benefícios ao solo e às plantas, bem como ao meio ambiente, como ferramenta de reciclagem de resíduos do agronegócio.

Esta revisão mostrou como o biochar pode ser promissor como componente de um possível inoculante e para a formulação de novos produtos. No entanto, estudos visando o uso de biochar combinado com BSF ainda são incipientes. Pesquisas futuras devem focar esforços na exploração de linhagens altamente eficientes, otimizando condições e avaliando diversas fontes de resíduos para produção de biochar e sua eficiência em experimentos de campo.

## **4. CAPÍTULO II**

### **INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO ASSOCIADAS A BIOCHAR EM SEMENTES DE MILHO**

## 4.1 RESUMO

O uso de bactérias solubilizadoras de fosfato vem se constituindo em uma alternativa para acessar o P que está adsorvido aos colóides e aumentar a eficiência no uso dos fertilizantes fosfatados nos sistemas agrícolas. O biochar, produto da pirólise lenta de materiais vegetais, também vem sendo apontado como uma alternativa no fornecimento de P para o solo (a depender das características do material), além de vários benefícios diretos e indiretos ao sistema. Este trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito da aplicação de bactérias solubilizadoras de P associado a biochars em sementes de milho, sobre as variáveis fitotécnicas da cultura e nas propriedades químicas e bioquímicas do solo. Para isso, foram aplicadas diferentes combinações de inóculos e fontes de biochars em sementes de milho, em casa de vegetação. Vasos contendo 16 kg de solo receberam sementes de milho da variedade Batité. Foi utilizado um arranjo fatorial 3 x 4 com 4 repetições, combinando três fontes de biochar como veículo de inoculação: sem biochar, biochar de palha de arroz (PA) e biochar de uva branca (UB), e 4 cepas bacterianas: *Klebsiella aerogenes* UAGC17, *Klebsiella aerogenes* UAGC19, a mistura das duas bactérias na mesma concentração e controle sem inoculação. Foram avaliadas as características fitotécnicas da planta com 45 dias, como altura da planta, diâmetro do colmo, massa seca e fresca de raiz e parte aérea, análises químicas do solo, atividades das enzimas fosfatases ácida e alcalina,  $\beta$ -glucosidase, respiração basal do solo e as frações de P no solo. O biochar PA associado a UAGC17 aumentou as variáveis P orgânico lável, P orgânico solúvel em meio básico, P orgânico solúvel em meio ácido, respiração basal do solo e as enzimas fosfatases ácida e alcalina e a  $\beta$ -glucosidase. Já a bactéria UAGC19 aumentou apenas o peso fresco de raiz, associado ao biochar PA. No geral, tanto o biochar de PA quanto a bactéria UAGC17, apresentaram os melhores efeitos de incremento das variáveis bioquímicas e químicas do solo. Os biochars de PA e UB se mostraram promissores como veículos de inoculação.

**Palavras-chave:** Inoculação bacteriana. Bioinoculante. *Zea mays*.

## 4.2 ABSTRACT

The use of phosphate-solubilizing bacteria has emerged as an alternative for accessing phosphorus that is adsorbed to colloids and increasing the efficiency of phosphate fertilizers in agricultural systems. Biochar, a product of the slow pyrolysis of plant materials, is also being highlighted as an alternative for supplying phosphorus to the soil (depending on the characteristics of the material), in addition to providing various direct and indirect benefits to the system. This study aimed to evaluate the effect of applying phosphate-solubilizing bacteria associated with biochars on corn seeds, focusing on the phytotechnical variables of the crop and the chemical and biochemical properties of the soil. Different combinations of inocula and biochar sources were applied to corn seeds in a greenhouse. Pots containing 16 kg of soil received seeds of the Batité variety. A 3 x 4 factorial arrangement with 4 replications was used, combining three sources of biochar as an inoculation vehicle: no biochar, rice straw biochar (PA), and white grape biochar (UB), with 4 bacterial strains: UAGC17, UAGC19, a mixture of the two bacteria at the same concentration, and a control without inoculation. The phytotechnical characteristics of the plants were evaluated after 45 days, including plant height, stem diameter, and dry and fresh mass of roots and shoots, as well as chemical analyses of the soil and the activities of the enzymes acid and alkaline phosphatases,  $\beta$ -glucosidase, basal soil respiration, and phosphorus fractions. The PA biochar associated with UAGC17 increased the variables of labile organic phosphorus, soluble organic phosphorus in basic medium, soluble organic phosphorus in acidic medium, basal soil respiration, and the activities of acid and alkaline phosphatases and  $\beta$ -glucosidase. Meanwhile, bacteria UAGC19 only increased the fresh root weight when associated with PA biochar. Overall, both PA biochar and bacteria UAGC17 exhibited the best effects on the biochemical and chemical variables of the soil. Both PA and UB biochars showed promise as inoculation vehicles.

**Keywords:** Bacterial inoculants. Bioinoculant. *Zea mays*.

## 4.3 INTRODUÇÃO

O fósforo (P) é o nutriente que mais tem limitado a produção agrícola brasileira (HOU et al., 2020) devido aos solos tropicais serem naturalmente pobres em P, seja pelo material de origem ou pela interação do mesmo com os coloides do solo (PEREIRA et al., 2021).

O P do solo é dividido em duas frações, a fração inorgânica e a orgânica que se divide no P dos minerais primários e o adsorvido aos coloides, correspondendo de 15 a 80% do P disponível. A fração orgânica sofre interferência direta dos microrganismos, pois estes são os responsáveis pela dinâmica e disponibilidade dessa fração no solo, P esse que vem da matéria orgânica vegetal, animal e também da biomassa microbiana (PEREIRA et al., 2021).

Segundo Gatiboni et al. (2007), a contribuição do P orgânico na solução do solo varia de 6% em solos agrícolas e 43% em solos de mata nativa. Os estudos voltados para a dinâmica do P no solo e suas frações são, em sua maioria, de regiões úmidas e tropicais úmidas, onde não se pode comparar os resultados com as regiões tropicais secas (SILVA et al., 2008).

Os microrganismos solubilizadores de fosfato vêm sendo testados e utilizados como estratégia para reduzir a quantidade de fertilizantes fosfatados aplicados na agricultura, melhorar o aproveitamento desse insumo e reduzir os custos de produção, além de serem mais ecológicos e causarem menos impactos no ecossistema (PAIVA et al., 2020).

A Embrapa estuda organismos solubilizadores de fosfato a mais de 20 anos, e em diversas publicações, conclui que os biofertilizantes produzidos a partir de microrganismos solubilizadores de fosfato são capazes de elevar a absorção de P pelas plantas sem a necessidade de aumentar a dose de fertilizante aplicado ao sistema (OLIVEIRA FILHO et al., 2020).

Na busca por alternativas que reutilizem subprodutos vegetais da indústria, o biochar ou biocarvão surge como uma solução para destinação de materiais que não tinham descarte ecológico no ambiente. Os materiais usados na fabricação do biochar são diversos, podendo ir de madeira, parte sólida de polpas de frutas até cama de aviário (PEREIRA et al., 2019).

Na literatura, foram relatados inúmeros benefícios que o biochar proporciona ao solo, seja usado individualmente ou em associação aos microrganismos, sendo caracterizado como um biofertilizante (SANI et al., 2020), sequestrador de carbono (YANG et al., 2020), promotor de melhorias nas características físico-químicas do solo, destacando a textura e o pH (SANI et al., 2020). Além disso, o biochar promove o aumento na retenção de água (GLAB et al., 2020), o controle de patógenos (ARAUJO, 2022), desenvolvimento da comunidade microbiana (AAMER et al., 2020) e também auxilia como veículo de inoculação de microrganismos (MEDEIROS et al., 2020).

Estudos associando bactérias solubilizadoras de fosfato e o biochar como veículo de inoculação são recentes (FRANÇA et al., 2022), o que faz dessa pesquisa uma importante aliada na busca por soluções práticas que possam reduzir custos de produção e reduzir o consumo de fertilizantes minerais.

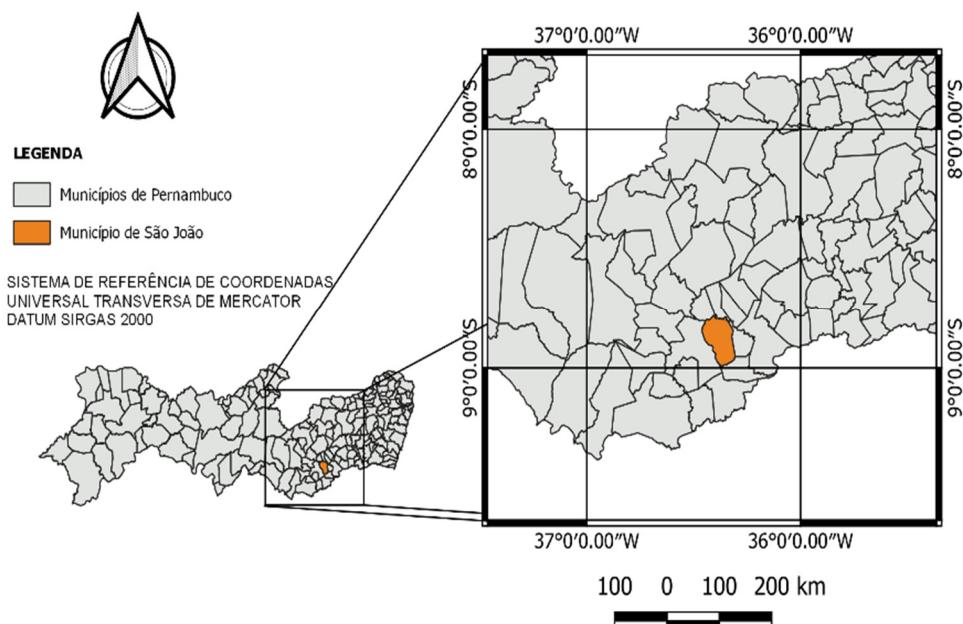
Diante do exposto, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar o efeito da inoculação de bactérias solubilizadoras de P associadas a biochars como veículo de inoculação em sementes de milho, sobre as variáveis fitotécnicas e nas propriedades bioquímicas do solo.

## 4.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.4.1 Área de implantação do experimento e coleta do solo

O experimento foi conduzido em casa de vegetação localizada na área experimental da Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, situada no município de Garanhuns, PE Brasil (08° 53' 25" S e 36° 29' 34" O, com altitude de 896 m). Nesta área o clima predominante é classificado conforme Köppen como Mesotérmico Tropical de Altitude (Cs'a), com temperatura e precipitação média anual de 20 °C e 1.300 mm, respectivamente.

O solo foi coletado em uma área de floresta nativa de Caatinga no município de São João, localizado na mesorregião do Agreste Meridional do Estado de Pernambuco (8° 52' 30" S e 36° 22' 00" O, com altitude de 705 m) (Figura 2) com relevo plano. O clima da área é classificado como Mesotérmico tropical de Altitude (Cs'a), com temperatura média de 23 °C e precipitação de 1.150 mm. O solo da área foi classificado como Neossolo Regolítico Eutrófico típico (SANTOS et al., 2018).



**Figura 2.** Mapa de localização da mesorregião do Agreste de Pernambuco e do município de São João-PE, Brasil. Imagem de Carlos Fragoso.

A coleta do solo para preenchimento dos vasos foi realizada em uma área não antropizada de 0-20 cm de profundidade. A caracterização foi feita pelo LASP (laboratório de análise de solo e planta, Petrolina, PE) segundo metodologia de Teixeira et al. (2017), cujos resultados estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Atributos químicos do solo coletado na profundidade de 0-20 cm no município de São João-PE.

pH	P	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H+Al	SB	V%
H <sub>2</sub> O	mg dm <sup>-3</sup>				-cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>				
4,9	47	0,85	0,25	0,39	0,63	0,15	2,08	2,13	51

#### **4.4.2 Obtenção das cepas bacterianas**

Vinte isolados bacterianos foram avaliados quanto a solubilização de fosfato. Os isolados pertencem à coleção de culturas microbianas do Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana (LGBM) da UFAPE e foram coletados da rizosfera, de folha e raiz de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB92579, cultivada na usina Petribú Ltda, situada no município de Lagoa de Itaengá, PE (LIRA-CADETE, et al., 2012).

Posteriormente, as bactérias foram testadas em meios sólidos contendo fosfato bicálcico, meio NBRIP (NAUTIYAL, 1999). Sete isolados foram selecionados de acordo com o Índice de Solubilização (NAUTIYAL, 1999) e testados nos meios de crescimento, agora líquidos, avaliando-se o pH do meio e o P solúvel na solução (TEIXEIRA et al., 2017). Os isolados UAGC17 (B1) e UAGC19 (B2) foram os que mais solubilizaram fosfato in vitro tanto em meio sólido quanto líquido (SOUSA et al., 2016), e por isso, foram selecionados para testes desse estudo.

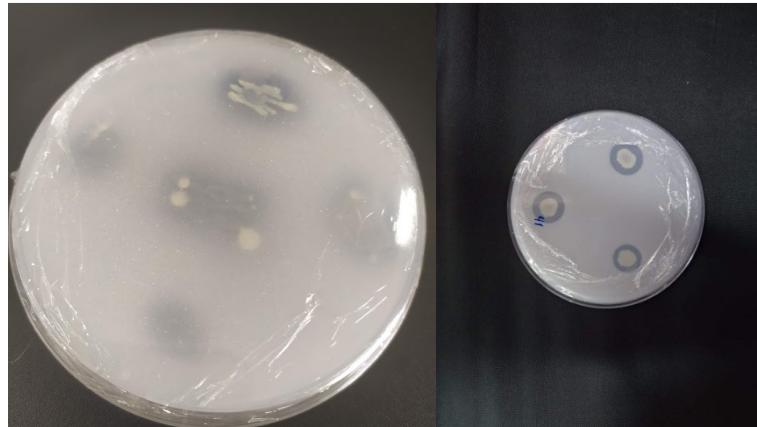
#### **4.4.3 Classificação taxonômica baseada no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA**

A identificação das bactérias foi feita por meio da análise filogenética a partir de colônias puras. Para tanto, o DNA foi extraído dos isolados usando o kit comercial PureLink<sup>TM</sup> Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, USA) seguindo as instruções do fabricante. A região parcial do gene 16S rRNA foi amplificada por PCR usando primers universais 27F (5'-GAGTTGATCATGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'). Para fins de purificação do produto de PCR foi utilizado FirePol Master Mix (12.5 mM MgCl<sub>2</sub>) (Solis Biodyne, Tartu, Estonia) com as concentrações recomendadas pelo fabricante. Os produtos resultantes da reação de PCR foram então purificados com o Kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Cytiva, UK). As sequências amplificadas foram sequenciadas usando um sequenciador automático ABI 3500xL do tipo Sanger (Applied Biosystems 3500 xL Genetic Analyzer). As sequências foram comparadas com o banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information) e analisadas pelo BLASTn (Basic Alignment Search Tool) para identificar os isolados bacterianos a nível de espécie.

Os isolados foram classificados a nível de espécie com candidatos que apresentaram mais de 99% de percentual de identidade. Em seguida, as sequências foram analisadas usando o Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Mega) version 11 (TAMURA et al., 2021), seguindo com as etapas de triagem das extremidades, alinhamento e construção das árvores filogenéticas para análise das relações evolutivas, baseada no algoritmo UPGMA.

#### **4.4.4 Preparo dos inoculantes**

Os isolados foram reativados em meio NBRIP sólido e as placas incubadas a 28 °C por 7 dias até o crescimento das colônias. Após esse período, foi realizada uma suspensão onde 3 mL do isolado foi adicionado a 300 mL de caldo e levados BOD a 28 °C por 24 h sob agitação de 150 rpm onde verificou-se o crescimento pela turbidez do meio. A determinação da densidade ótica (DO) foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 560nm e corrigida para 0,6 ou 10<sup>-6</sup> ufc (BATISTA et al., 2018).



**Figura 3.** Crescimento dos isolados UAGC17 e UAGC19 em meio NBRIP e verificação da solubilização. Foto: Rafaela França.

Após esse período, foram incubadas em meio batata dextrose (BD) líquido onde, 0,3 mL do isolado foi adicionado a 30 mL de caldo, incubadas em BOD a 28 °C por 24 h sob agitação de 150 rpm e verificou-se o crescimento pela turbidez do meio. (Figura 4).



**Figura 4.** Isolados crescidos em meio BD (meio turvo) e meio sem isolados (meio translúcido). Foto: Rafaela F. da França.

As sementes de milho da variedade Batité foram adquiridas diretamente com produtores da região.

Após uma seleção visual com a finalidade de padronização no tamanho do grão, as sementes a serem inoculadas, foram imersas no meio batata dextrose contendo os isolados e os controles imersos no meio estéril. Em seguida, ainda úmidas, foram passadas para outro recipiente contendo os respectivos biochars autoclavados, não necessitando de nenhum aditivo para aderência do biochar a semente. Os tratamentos controle dos isolados não receberam a camada de biochar.

Para os demais tratamentos controle, as sementes foram imersas somente no meio estéril e envolvidas ou não nas fontes de biochar, sendo semeadas logo em seguida.

#### 4.4.5 Produção e caracterização dos biochars

Os biochars foram produzidos por meio de pirólise lenta, num pequeno forno térmico caseiro que atinge temperaturas de até 450 °C (Figura 5), o qual foi baseado num modelo amplamente utilizado pelos agricultores tailandeses (PRAKONGKEP et al., 2015).



**Figura 5.** Forno caseiro utilizado para produção dos biochars do Laboratório de Estudos em Microbiologia e Biotecnologia (LEMA) da UFAPE. Foto: Rafaela F. da França.

Foram utilizados dois diferentes tipos de biomassa: palha de arroz (PA) e resíduo de uva branca (UB) proveniente da produção de vinho (*Muscat petit grain*) (Figura 6) e a escolha desses resíduos se deu pela disponibilidade na região.



**Figura 6.** Resíduo de palha de arroz (A), biochar de palha de arroz (B), resíduo de uva branca (C) e biochar de uva branca (D). Foto: Rafaela F. da França.

Após a retirada do forno, o material foi moído, passado em peneira de 2 mm e acondicionado em sacos plásticos e local apropriado. As análises de CHN foram realizadas pelo Laboratório de Estudos das Relações Solo-Planta (LSP) da UFRRJ pelo CHN-O Elementar, e os demais elementos foram avaliados por Fluorescência de Raio-X no Laboratório de Química Agrícola da UFAPE (Tabela 3).

**Tabela 3.** Caracterização dos biochars de palha de arroz (PA) e uva branca (UB).

Biochar	pH	P	Ca	Mg	K	Na	C	N	Rendimento biochar/material
	H <sub>2</sub> O	%							
PA	9,48	1,21	8,54	0,42	5,99	0	30,79	0,83	34
UB	11,26	1,58	7,59	0,39	37,93	0	57,36	1,7	83

#### 4.4.6 Delineamento e unidade experimental

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições, totalizando 48 vasos. Os 12 tratamentos consistiram em um arranjo fatorial 3x4, combinando três fontes de biochar: sem biochar, biochar de palha de arroz (PA) e biochar de uva branca (UB), e quatro cepas bacterianas: UAGC17 (B1), UAGC19 (B2), a mistura entre as duas bactérias (B3) na mesma concentração e controle sem inoculação (C).

Os vasos foram preenchidos com 16 kg do solo coletado previamente, pesados para homogeneização, adubados com ureia, super simples e cloreto de potássio, em proporções correspondentes a 30-20-20 kg ha<sup>-1</sup> seguindo o Manual de Adubação e Calagem do Estado de Pernambuco (IPA, 2008) para cultivo de milho sequeiro. O adubo foi aplicado aos vasos e manualmente homogeneizado com os primeiros 10 cm de solo. Posteriormente, foram semeadas 4 sementes previamente inoculadas por vaso e 10 dias após a germinação foi realizado o desbaste (Figura 7), restando apenas 1 planta por vaso.



**Figura 7.** Plantas de milho com 25 dias após a germinação. Foto: Rafaela França.

Os tratos culturais consistiram na retirada manual das plantas daninhas e irrigação; não foi necessário aplicação de nenhum produto químico para o controle de pragas e doenças.

Aos 45 dias foi coletada a planta e solo para as avaliações fitotécnicas, bioquímicas e químicas do solo, e também foi observado, que o biochar se encontrava aderido a casca da semente de milho, demonstrando sua viabilidade como carreador de inóculo (Figura 8).



**Figura 8.** Casca da semente de milho inoculada com isolado bacteriano associado a biochar.  
Foto: Rafaela França.

#### 4.4.7 Variáveis da planta

O diâmetro do colmo foi avaliado através do uso de um paquímetro digital e a altura da planta foi considerada a distância do nível do solo ao ponto de inserção da lâmina foliar mais alta com o uso de uma fita métrica (Figura 9).



**Figura 9.** Plantas de milho com 45 dias após a germinação do tratamento B2, PA(A) e tratamento controle (B). Foto: Rafaela F. da França.

Para o peso fresco, após a coleta cuidadosa da planta, a raiz foi separada da parte aérea com o auxílio de uma tesoura, lavada para retirada do solo e ambas foram pesadas em balança de precisão. O peso seco foi determinado por pesagem após secagem em estufa de circulação forçada a 65 °C, até atingir peso constante.

#### 4.4.8 Variáveis do solo

Juntamente com a coleta das plantas, também foi realizada a coleta do solo do vaso na profundidade de 0-20 cm. Uma parte da amostra de solo foi imediatamente acondicionada em sacos plásticos e guardada em cooler contendo gelo, a fim de refrigerá-los a uma temperatura de 4 °C, para a realização das análises bioquímicas.

A outra parte da amostra de solo foi seca, destorroada, passada em peneira de 2 mm e procedeu-se as análises do solo: pH (em água 1:2,5), K e P extraível, seguindo a metodologia descrita por Texeira et al. (2017), com K quantificado por fotometria de chama, e P por colorimetria (BRAGA; DEFELIPO, 1974).

As enzimas fosfatase ácida, alcalina e  $\beta$ -glucosidase foram determinadas conforme metodologias propostas por Eivazi; Tabatabai (1977; 1988), e a respiração basal do solo (RBS) de acordo a metodologia de Da Silva et al. (2007).

O fracionamento do P do solo se deu através da metodologia proposta por Bowman e Cole (1978) e a digestão pelo método 365.3 da USEPA (1978). O P total lável (Ptl) e o P inorgânico lável (Pil) foram determinados por colorimetria (BRAGA; DEFELIPO, 1974) e a quantificação do P orgânico lável (Pol) obtida da diferença entre Ptl e Pil.

O P microbiano foi obtido conforme metodologia de Broockes et al. (1982) e McLaughlin et al. (1986) com modificação na relação solo:solução descrita por Guerra et al. (1995). Para a realização da análise, pesou-se em duplicata 10 g de solo, as quais foram submetidas a irradiação em micro-ondas por um tempo previamente calculado. Em seguida adicionou-se 100 mL de NaHCO<sub>3</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup> com pH corrigido para 8,5, agitadas por 30 min e em repouso por mais 30 min e depois procedeu-se a filtragem do extrato e digestão conforme o método 365.3 da USEPA (1978).

O cálculo de P foi obtido a partir das diferenças nas quantidades dos extratos irradiados e não irradiados, após as correções do teor de água das amostras, sendo o solo previamente seco em estufa a 105 °C.

#### 4.4.9 Análises estatísticas

A análise de variância (ANOVA) e o teste post-hoc LSD (Least Significant Difference) de Fisher foram realizados através da biblioteca R 'agricolae' (v. 1.3.5) adotando o nível de significância de 5%. A correção de Bonferroni foi aplicada para controlar a taxa de erro do tipo I da família de teste em função das comparações múltiplas entre tratamentos. Os gráficos de barras foram construídos utilizando as funções do pacote 'ggplot2' (v. 3.3.5).

As análises estatísticas multivariadas foram feitas no software R versão 4.1.1 (R Core Team, 2021) com a ajuda da interface RStudio 2021.09.0-Build 351 (RStudio Team, 2021). A análise de componentes principais (PCA), cálculos de correlações, e a análise de variância multivariada (MANOVA) foram feitos com funções do pacote 'vegan' (v. 2.5.7) e os gráficos da estatística multivariada foram construídos pelo pacote 'ggplot2' (biplots) e 'graphics' (v. 4.1.1).

## 4.5 RESULTADOS

### 4.5.1 Análise de variância do modelo fatorial

A análise de variância demonstrou interações significativas entre os fatores inoculação com bactérias e aplicação de biochars ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0.05$ ) para a variável peso fresco de raiz (PFR) (Tabela 4). Não foram observados efeitos significativos nas outras variáveis vegetais.

**Tabela 4.** Médias gerais, desvio padrão, coeficiente de variação do modelo estatístico e significância dos fatores, de acordo com análise de variância para variáveis de solo e planta.

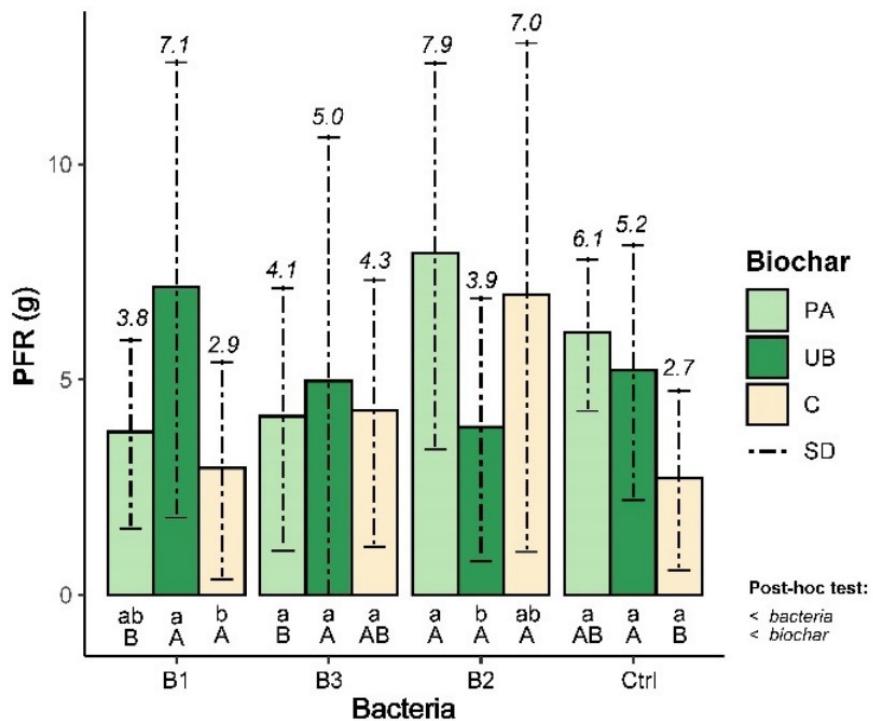
Variável:	Média	DP	CV %	valores-p <sup>a</sup>		
				bactéria	biochar	bac*bio
Dia. C (mm)	7,6	2,1	28,2	0,457	0,304	0,625
HT (cm)	105,5	14,4	12,9	0,321	0,824	0,084
PFR (g)	5,0	2,6	47,4	0,226	0,279	<b>0,036</b>
PFPA (g)	45,6	14,5	29,9	0,118	0,461	0,198
PSR (g)	1,5	1,1	66,8	0,149	0,557	0,103
PSPA (g)	5,7	1,7	28,6	0,119	0,336	0,337
pH	5,1	0,2	4,7	0,414	0,958	0,661
K (mg dm <sup>-3</sup> )	217,6	76,4	25,1	0,380	0,000	0,059
P (mg kg <sup>-1</sup> )	230,6	10,1	4,4	0,430	0,851	0,332
PoL (mg kg <sup>-1</sup> )	43,5	12,0	25,3	0,261	0,448	<b>0,050</b>
PoH (mg kg <sup>-1</sup> )	65,5	23,1	29,9	0,087	0,016	0,064
PoOH (mg kg <sup>-1</sup> )	36,4	23,3	53,6	0,748	0,279	<b>0,002</b>
Pmic (mg kg <sup>-1</sup> )	40,7	84,9	193,9	0,196	0,069	0,294
RBS (mg C-CO <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> solo h <sup>-1</sup> )	3,4	1,2	23,0	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
Beta (μg PNG g <sup>-1</sup> solo h <sup>-1</sup> )	212,6	117,9	34,9	<b>0,000</b>	<b>0,012</b>	<b>0,000</b>
Aci.P (μg PNP g <sup>-1</sup> solo h <sup>-1</sup> )	79,7	41,5	43,5	0,658	0,000	0,317
Alc.P (μg PNP g <sup>-1</sup> solo h <sup>-1</sup> )	75,4	53,1	52,4	<b>0,000</b>	0,044	0,079

<sup>a</sup> de acordo com o teste F, valores de  $p < 0.05$  foram destacados em negrito. Dia. C é o diâmetro do colmo da planta de milho; HT é a altura total da planta; PFR é o peso fresco de raiz; PFPA é o peso fresco da parte aérea; PSR é o peso seco de raiz; PSPA é o peso seco da parte aérea; PoL é o fósforo orgânico lável; PoH é o fósforo orgânico total solúvel em meio ácido; PoOH é fósforo orgânico total solúvel em meio básico; Pmic é o fósforo da biomassa microbiana; RBS é a respiração basal do solo; Beta é a enzima β-glucosidase do solo; aci.P é a enzima fosfatase ácida do solo; alc.P é a enzima fosfatase alcalina do solo.

Quanto às variáveis do solo, os fatores interagiram significativamente as concentrações das frações de P orgânico lável (PoL) e P orgânico total solúvel em meio básico (PoOH). Para as variáveis microbiológicas, a interação foi significativa para respiração basal do solo (RBS) e β-glucosidase (Beta), além da fosfatase alcalina (alc.P) (Tabela 4).

### 4.5.2 Resposta da planta

As diferentes combinações de inóculos bacterianos e tipos de biochars influenciaram no peso fresco de raiz das plantas de milho, variando em média entre 2,7 a 7,9 g (Figura 10). A combinação B2 e PA apresentou a maior média (7,9 g), sendo semelhante ao tratamento controle e diferindo do tratamento com UB, dentro do nível de B2. Dentro do nível de PA, o tratamento com B2 e o controle apresentaram os maiores resultados se comparado ao tratamento com B1 e B3.

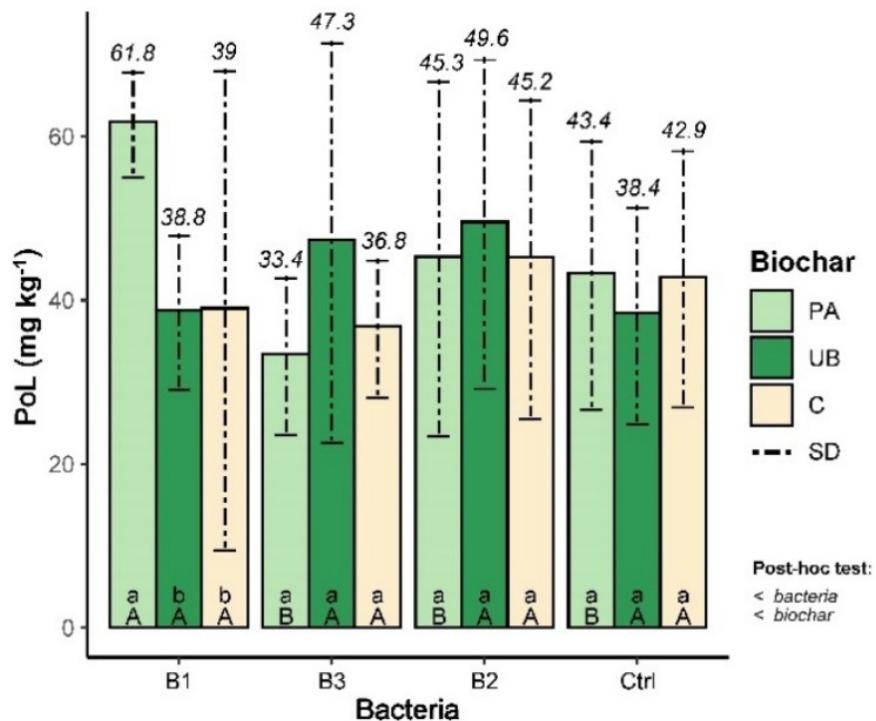


**Figura 10.** Peso fresco de raiz de plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. O tratamento controle representa as ausências de inóculo ou de biochar para os fatores 1 e 2, respectivamente. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+UACG19, PA – biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e C – controle.

#### 4.5.3 Efeitos nas propriedades químicas do solo

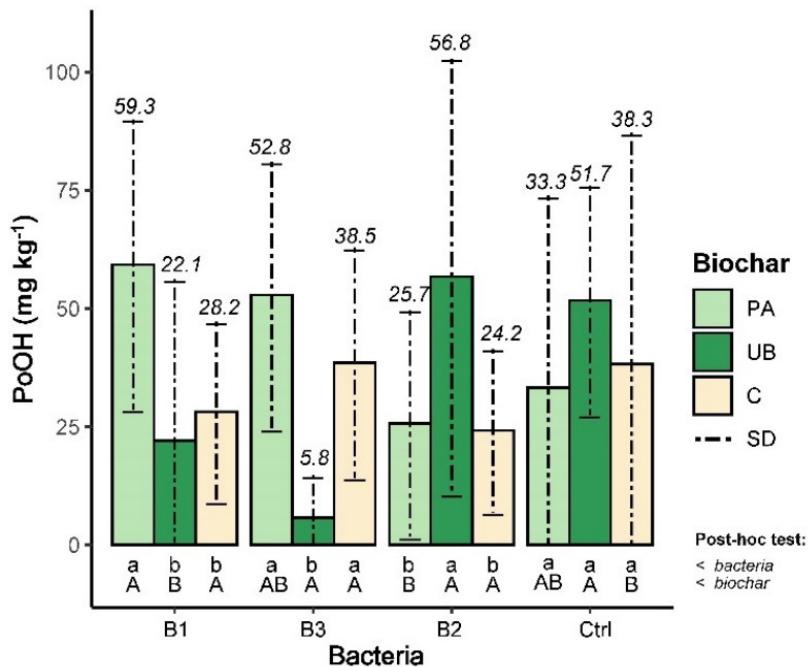
Algumas propriedades químicas do solo foram influenciadas pela associação entre inóculo bacteriano e tipo de biochar (Figura 11). O maior valor de PoL foi observado no tratamento B1 associado a PA ( $61,8 \text{ mg kg}^{-1}$ ), não diferindo do tratamento com UB ( $38,8 \text{ mg kg}^{-1}$ ) nem do controle ( $39,0 \text{ mg kg}^{-1}$ ), todos dentro do nível de inoculante B1.

Dentro do nível de biochar PA, as concentrações de P orgânico lável em solos com plantas inoculadas com B1 também foi maior do que em todos os outros níveis de inoculantes:  $33,4 \text{ mg kg}^{-1}$  (PA com B3),  $45,3 \text{ mg kg}^{-1}$  (PA com B2)  $43,4 \text{ mg kg}^{-1}$  (PA controle).



**Figura 11.** Concentrações de fósforo orgânico lábil em solo cultivado com plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. O tratamento controle representa as ausências de inóculo ou de biochar para os fatores 1 e 2, respectivamente. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+UACG19, PA – biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e C – controle.

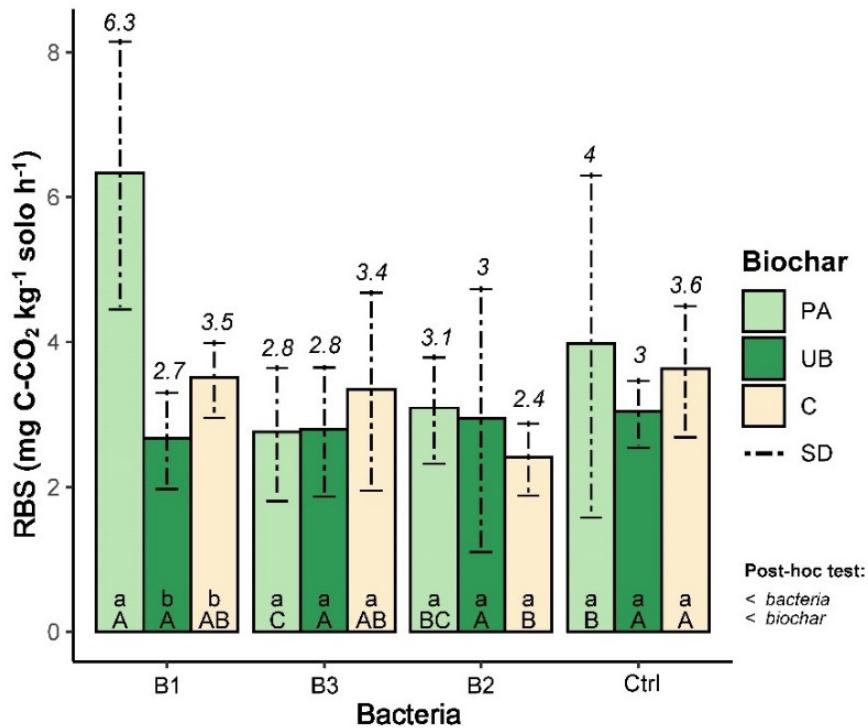
O maior valor para P orgânico total solúvel em meio básico foi observado no tratamento B1 com PA ( $59,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ), diferindo significativamente de UB ( $22,1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e do C ( $28,2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) dentro do nível de inóculo B1 (Figura 12). Dentro do nível de biochar PA, as concentrações de PoOH no tratamento B1 ( $59,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ), B3 ( $52,8 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e controle ( $33,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ) foram semelhantes, sendo maiores que no tratamento com a B2 ( $25,7 \text{ mg kg}^{-1}$ ).



**Figura 12.** Concentrações de fósforo orgânico total solúvel em meio básico em solo cultivado com plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. O tratamento controle representa as ausências de inóculo ou de biochar para os fatores 1 e 2, respectivamente. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+UAGC19, PA – biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e C – controle.

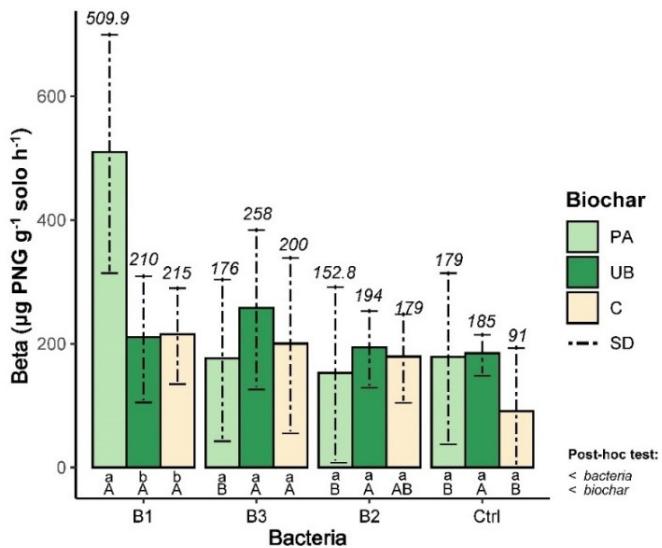
#### 4.5.4 Atividades enzimáticas e respiração basal do solo

Os resultados demonstraram que as diferentes combinações de inóculos bacterianos e tipos de biochar influenciaram algumas atividades dos microrganismos do solo. A respiração basal do solo variou em média entre  $6,3 \text{ mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$  a  $2,4 \text{ mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$  (Figura 13). O maior valor foi observado no tratamento B1 associado a PA ( $6,3 \text{ mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ ), diferindo significativamente de UB ( $2,7 \text{ mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ ) e do controle ( $3,5 \text{ mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ ) dentro do nível de inóculo B1. Dentro do nível de PA, o valor de RBS no tratamento B1 ( $6,3 \text{ mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ ) também foi significativamente superior aos tratamentos B3 ( $2,8 \text{ mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ ), B2 ( $3,1 \text{ mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ ) e C ( $4,0 \text{ mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ ).



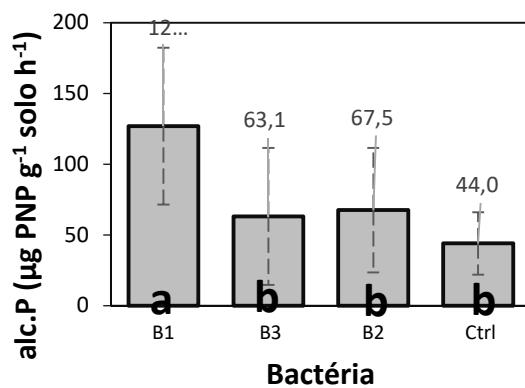
**Figura 13.** Respiração basal do solo (RBS) de solo cultivado com plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. O tratamento controle representa as ausências de inóculo ou de biochar para os fatores 1 e 2, respectivamente. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+UACG19, PA – biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e C – controle.

O maior valor para a enzima  $\beta$ -glucosidase (Beta) também foi observado no tratamento B1 com PA ( $510 \mu\text{g PNG g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ ), diferindo significativamente de UB ( $210 \mu\text{g PNG g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ ) e do controle ( $216 \mu\text{g PNG g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ ) dentro do nível de inóculo B1 (Figura 14). Dentro do nível de biochar PA, a atividade de Beta no tratamento B1 ( $510 \mu\text{g PNG g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ ) também foi significativamente superior aos tratamentos B3 ( $176 \mu\text{g PNG g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ ), B2 ( $153 \mu\text{g PNG g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ ) e controle ( $179 \mu\text{g PNG g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ ).



**Figura 14.** Atividade da enzima  $\beta$ -glucosidase de solo cultivado com plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. O tratamento controle representa as ausências de inóculo ou de biochar para os fatores 1 e 2, respectivamente. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+UACG19, PA – biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e C – controle.

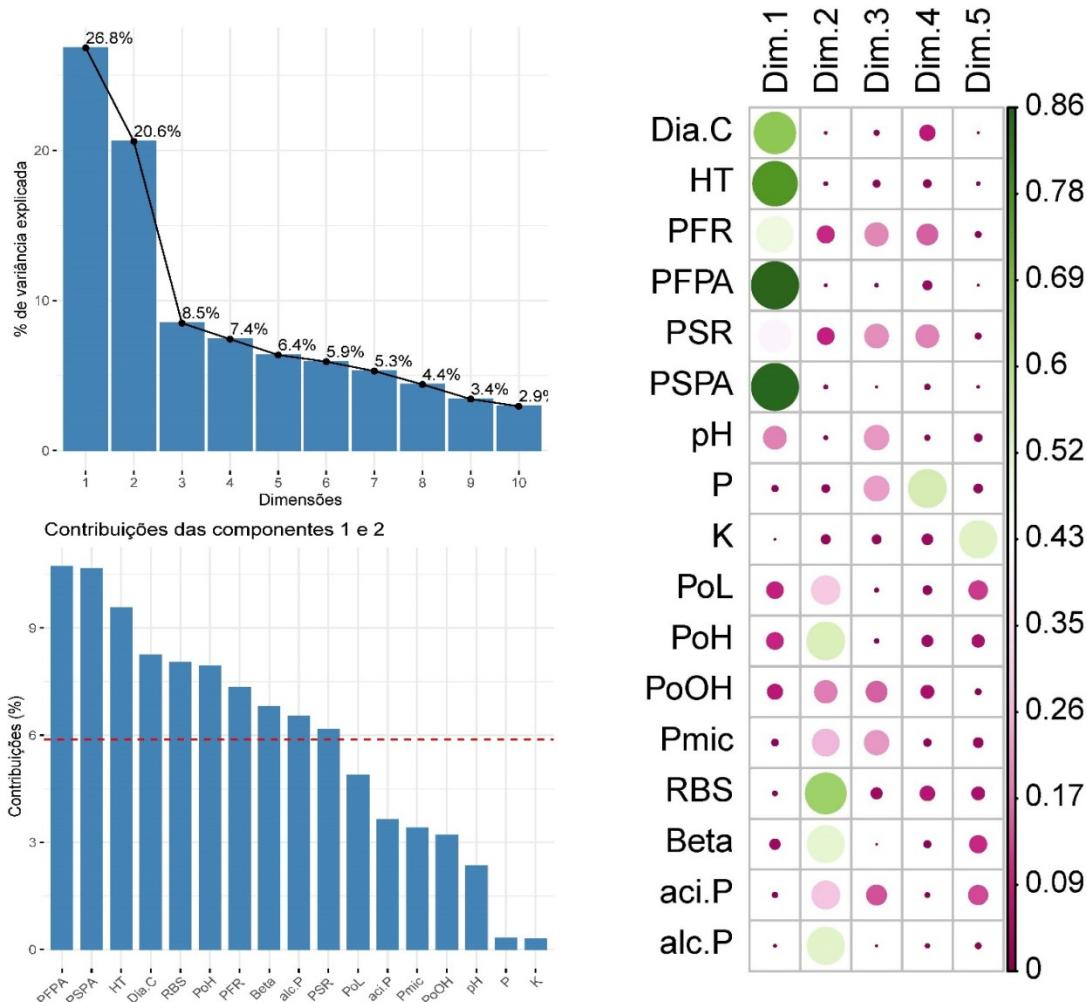
A fosfatase alcalina do solo também sofreu influência dos tratamentos com bactérias, onde B1 foi superior aos demais tratamentos, apresentando a média de  $126,9 \mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ , B3  $63,1 \mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ , B2  $67,5 \mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$  e o C  $44,0 \mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$  (Figura 15).



**Figura 15.** Atividade da enzima fosfatase alcalina de solo cultivado com plantas de milho tratadas com isolados bacterianos, independentemente do biochar (efeito simples). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes bactérias, considerando as médias globais dos tratamentos com todos os níveis de biochars (não significativo), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. O tratamento controle representa as ausências de inóculo bacteriano (controle negativo). Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+UACG19, C – controle.

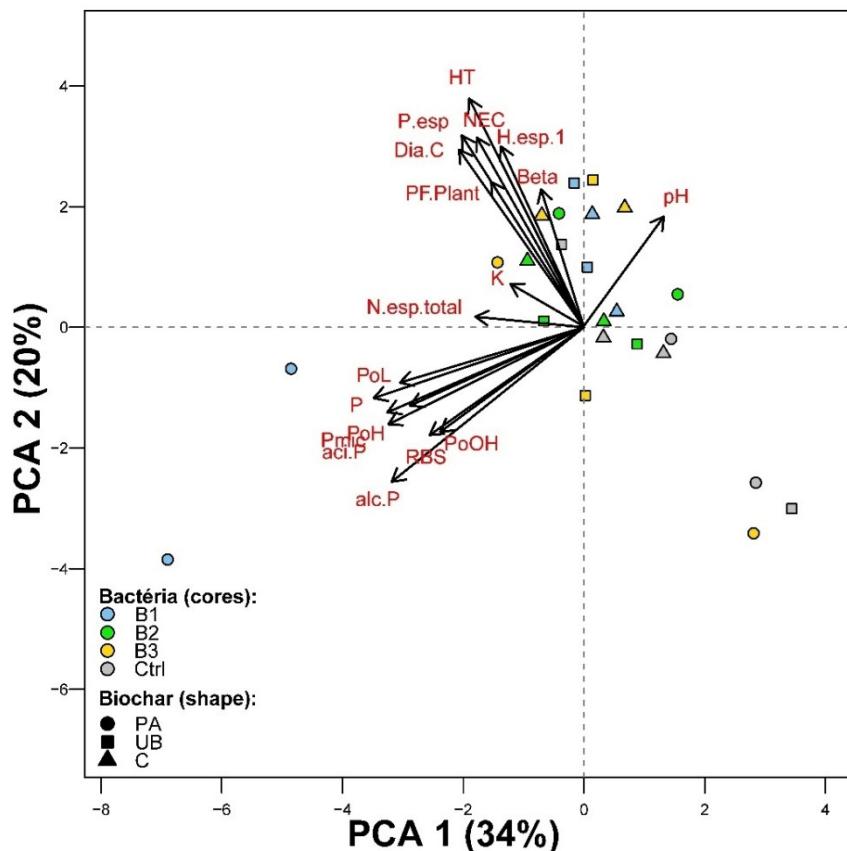
#### 4.5.5 Análise multivariada

Das 17 variáveis analisadas, 10 (a saber: PFPA, PSPA, HT, Dia.C, RBS, PoH, PFR, Beta, alc.P, PSR) apresentam uma contribuição acima da média esperada, quando consideradas a PC1 e a PC2 simultaneamente (Figura 16B), sendo Dia.C, HT, PFPA, e PSPA as variáveis de maior contribuição para a PC1 (Figura 16C), a qual responde por mais de 20% da variação total dos dados (Figura 16A).



**Figura 16.** Contribuições relativas das componentes principais e das variáveis sobre a variância total dos dados de plantas cultivadas em casa de vegetação. (A) Percentual de explicação da variância de cada componente principal. (B) Contribuição relativa das variáveis para as duas componentes principais. A linha tracejada vermelha no gráfico acima indica a contribuição média esperada. (C) Correlação das variáveis com as cinco principais componentes. O diâmetro dos círculos é proporcional a correlação entre a variável e as respectivas componentes principais (Dim) e a escala de cor indica o valor da correlação. Dia. C é o diâmetro do colmo da planta de milho; HT é a altura total da planta; PFR é o peso fresco de raiz; PFPA é o peso fresco da parte aérea; PSR é o peso seco de raiz; PSPA é o peso seco da parte aérea; PoL é o fósforo orgânico lável; PoH é o fósforo orgânico total solúvel em meio ácido; PoOH é fósforo orgânico total solúvel em meio básico; Pmic é o fósforo da biomassa microbiana; RBS é a respiração basal do solo; Beta é a enzima  $\beta$ -glucosidase do solo; aci.P é a enzima fosfatase ácida do solo; alc.P é a enzima fosfatase alcalina do solo.

Os componentes principais, PC1 e PC2, explicam mais de 47% da variação total dos dados. A partir da Figura 17, é possível observar uma forte correlação entre as variáveis mensuradas referentes às frações de P, a respiração basal do solo (RBS) e a enzima Beta com o tratamento B1 com PA.



**Figura 17.** Biplot da análise de componentes principais das variáveis de milho cultivado em casa de vegetação. Os rótulos em vermelho são as variáveis mensuradas e os polígonos coloridos representam todas as médias de todas as repetições de cada tratamento. As duas componentes principais explicaram cerca de 48% da variância total estimada. Dia. C é o diâmetro do colmo da planta de milho; HT é a altura total da planta; PFR é o peso fresco de raiz; PFPA é o peso fresco da parte aérea; PSR é o peso seco de raiz; PSPA é o peso seco da parte aérea; PoL é o fósforo orgânico lável; PoH é o fósforo orgânico total solúvel em meio ácido; PoOH é fósforo orgânico total solúvel em meio básico; Pmic é o fósforo da biomassa microbiana; RBS é a respiração basal do solo; Beta é a enzima glucosidase do solo; aci.P é a enzima fosfatase ácida do solo; alc.P é a enzima fosfatase alcalina do solo.

## 4.6 DISCUSSÃO

Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal podem colonizar tecidos internos das plantas (Plant growth-promoting bacterial endophytes - PGE) ou se associar à rizosfera das plantas (Plant growth-promoting rhizobacteria - PGPR) e atuarem no desenvolvimento das plantas por meio de mecanismos diretos e indiretos.

Essas bactérias podem diretamente atuar na promoção de crescimento vegetal, na disponibilização de nutrientes para as plantas (P, K, e Zn), quelando nutrientes (Fe) através da produção de sideróforos, fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios e mecanismos indiretos, como: indução de resistência sistêmica, antibiose e na produção de sideróforos que “sequestram” o Fe e o tornam indisponível para bactérias patogênicas que não conseguem se estabelecer (SOUSA; ECHER, 2023; KHOSO et al., 2024).

*Klebsiella* sp. é uma espécie de bactéria pertencente à família das Enterobacteriaceae e de ocorrência ubíqua, podendo ser encontrada em amostras de solo (ABBOTT et al., 2011), água, em vegetais e no trato gastrointestinal de diversos animais, inclusive dos humanos (ANDRADE, 2020).

A *Klebsiella* sp. é uma bactéria promotora de crescimento vegetal multifuncional por fixar biologicamente o nitrogênio através da presença de um complexo enzimático denominado nitrogenase, que tem a capacidade de realizar a quebra da tripla ligação do N<sub>2</sub> e convertê-lo em amônio, assim como por sintetizar fitormônios como o ácido indol-3-acético (AIA) (RANGJAROEN et al., 2015). Alguns trabalhos têm descrito o potencial de estirpes de *Klebsiella* sp. de serem halotolerantes e atuarem na promoção de crescimento e na atenuação dos efeitos do estresse salino em cereais de importância econômica, como o trigo e o milho (KUSALE et al., 2021) e arroz (KHUMAIRAH et al., 2022).

Nossos resultados revelam que existe uma interação significativa entre BPCV e biochar. Os maiores valores para PFR foram observados no tratamento B2 com PA, mostrando que a interação entre BPCV e o biochar é favorável ao desenvolvimento radicular de plantas de milho, possibilitando um aumento de 192% em relação ao controle.

A melhoria na biociclagem de nutrientes, promovidas pela adição do biochar no solo, pode promover maiores estímulos diretos e indiretos ao crescimento vegetal, dentre os estímulos indiretos, é possível citar um favorecimento da atividade microbiológica do solo, portanto, podendo favorecer a ação de bactérias promotoras do crescimento vegetal, assim, favorecendo o desenvolvimento das plantas (NAJAR et al., 2015; PALANSOORIYA et al., 2019).

Diante dos resultados observados neste estudo, é possível aferir que a adição de biochar pode estar associada a um maior estímulo da atividade das BPCV presentes naturalmente nos solos, visto que, a adição do biochar sem a inoculação de *Klebsiella aerogenes* promoveu maior valor de massa fresca de raiz quando comparado ao tratamento sem a adição do biochar.

A adição de biochar está associada a melhoria das propriedades físico-química do solo e estimula as atividades dos microrganismos do solo, levando a um melhor desenvolvimento vegetal por fornecer maior quantidade de nutrientes ao solo, mas também por possibilitar aumento na diversidade e na atividade microbiológica do solo (PALANSOORIYA et al., 2019).

Bactérias rizosféricas apresentam capacidade variada de produzir fitohormônios, e.g., estirpes de *Klebsiella* sp. produzem AIA que atua no aumento do desenvolvimento radicular e da parte aérea de plantas de trigo (KEJELA, 2024). Arruda (2012) afirma que a *Klebsiella* sp. atua como promotora do crescimento radicular de gramíneas de importância econômica, como o milho e o arroz, de forma direta, através da produção de reguladores de crescimento, como a auxina. A relação do AIA com a promoção do crescimento vegetal foi demonstrada por Costa et al. (2013), onde ao avaliar isolados de nódulos de feijão, perceberam que a maioria dos isolados sintetizavam AIA e que a presença desse hormônio estava relacionada com o aumento

da matéria seca da parte aérea do feijão. No entanto são vários os fatores que interferem na síntese desse fitohormônio, como fontes de nutrientes e pH (SINHA et al., 2019). Diversos autores comprovaram que bactérias do gênero *Klebsiella* sp. liberam diversas substâncias reguladoras de crescimento vegetal, como exemplo as giberelinas, citocininas e auxinas (TEIXEIRA et al., 2007).

Para Mardad et al. (2013), o ciclo do P é influenciado pela atividade das bactérias solubilizadoras presentes no solo, as quais contribuem para o aumento da disponibilidade do P na solução, tornando-o mais propenso a absorção pelas plantas. Diversos são os meios utilizados pelas bactérias solubilizadoras de fosfato, podendo ser citadas: acidificação e excreção de ácidos orgânicos (RASHID et al., 2004), quelação (PRABHU; BORKAR; GARG, 2019), extrusão de prótons (GAHOONIA et al., 1992), produção de sideróforos (SHARMA et al., 2013), reação oxi-redução (CAMARGO et al., 1999), ligantes orgânicos (PAVINATO; ROSOLEM, 2008) e produção de substâncias extracelulares (WELCH et al., 2002).

É importante salientar que o P orgânico lável (PoL) se encontra prontamente disponível na solução do solo para ser absorvido por plantas, assim como por microrganismos, podendo variar de acordo com o tipo de matéria orgânica adicionada ao solo, da atividade microbiológica local, do tipo de vegetação, do grau de intemperismo do solo, da mineralogia, entre outros fatores (BRASIL et al., 2014).

Nossos achados sugerem que a adição de tipos de biochar e a inoculação com BPCV influenciou no teor de PoL. Apesar do teor de P total no solo em geral não ser elevado, uma pequena parte encontra-se em equilíbrio com o P presente na solução, portanto, disponível para as plantas (BATISTA, 2020). A fração de P disponível para absorção radicular na solução do solo pode ser denominada de “fração lável”, a qual pode ser avaliada por meio de diversos extratores em laboratórios, nas análises de solo. Quando extraído em meio básico, pode ser chamado de P orgânico total solúvel em meio básico (PoOH) (COSTA, 2011).

A maior presença de PoOH verificada no tratamento B1 com PA mostra que a adição de biochar de palha de arroz pode ter contribuído com a adição de P orgânico ao solo, o qual, possivelmente, passou a ser solubilizado pela *Klebsiella* sp. inoculada.

As bactérias do gênero *Klebsiella* sp. são descritas por Sitepu et al. (2007) como de alto potencial solubilizador de fosfatos no solo. No entanto, como pode ser observado nessa pesquisa, nem todas as estirpes apresentam a mesma eficiência na solubilização. Batista et al. (2018), avaliando trinta isolados de rizobactérias e endofíticos da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo, observaram que a *Klebsiella* sp. foi o microrganismo mais eficiente quanto a solubilização do fosfato em meio líquido. Oliveira (2009) afirmou que apesar de a *Klebsiella* sp. ser caracterizada por apresentar alto potencial de solubilização de fosfato, cada estirpe apresenta características genotípicas que interferem na capacidade de solubilização de fosfatos no solo.

A inoculação assim como a adição de biochar, influenciaram as atividades de fosfatases alcalinas, o que pode ter influenciado na maior presença de PoOH.

Os teores de P solúveis em meio básico encontram-se associadas aos ácidos húmicos, apresentando como principal característica a baixa mineralização no solo, visto que os ácidos húmicos são mais estáveis que os fúlvicos.

Bezerra et al. (2015) afirmam que quanto maior o teor de PoOH encontrado, maior a probabilidade de maiores teores de carbono na fração de ácidos húmicos. Portanto, pode-se inferir que a matéria orgânica proveniente da palha de arroz fornece uma matéria orgânica mais rica em ácidos húmicos, significando maior estabilidade da matéria orgânica adicionada ao solo.

Diferentemente da fração PoOH, a PoH representa a fração de Po moderadamente lável e está associada a substâncias não-húmicas, assim como aos ácidos fúlvicos, sendo mais acessível aos microrganismos que o PoOH, o qual encontra-se mais associado aos ácidos húmicos. Com isso, é possível afirmar que o biochar de palha de arroz apresenta maior

capacidade de associação aos microrganismos presentes no solo, assim como aos adicionados, possibilitando maior liberação de P para as plantas através da biociclagem de nutrientes do solo (DUDA, 2000).

O biochar da palha de arroz associado à inoculação da B1, promoveu maior atividade da enzima  $\beta$ -glucosidase. Essa enzima é indicadora de uma boa qualidade do solo, visto que tem participação nos últimos processos de degradação da celulose, sendo usada como indicativo biológico da fertilidade do solo. Os produtos resultantes das ações da  $\beta$ -glucosidase desempenham diversas funções, incluindo funções bioquímicas, fisiológicas e nutricionais, dependendo do organismo são importantes fontes de energia para os microrganismos do solo (MÓL et al., 2023).

Um maior qMiq indica melhor qualidade da matéria orgânica adicionada ao solo, resultante de um maior acúmulo de C no solo (ARAÚJO, 2018). Portanto, apesar de os estudos apresentarem divergências quanto aos valores de RBS, assim como sobre a atividade da enzima  $\beta$ -glucosidase, pode-se afirmar que, ambos apresentam melhorias na qualidade microbiológica do solo, pois a presença da  $\beta$ -glucosidase associada a um aumento na RBS indica que a atividade microbiológica tem sido responsável pela maior emissão de CO<sub>2</sub>, não havendo associação a estresse.

Os resultados obtidos com o uso do biochar de palha de arroz contrastaram com os resultados apresentados por Araújo (2018), onde o biochar de palha de arroz associado a B1, possibilitou os maiores valores de RBS e da enzima  $\beta$ -glucosidase, indicando que nas condições aqui avaliadas, esse tratamento possibilitou um maior aporte energético para os microrganismos, os quais aumentaram suas funções decompositoras da matéria orgânica advinda da adição do biochar, resultando numa maior liberação de CO<sub>2</sub>, observado através da RBS.

## 4.7 CONCLUSÕES

Este estudo reporta o potencial de diferentes fontes de biochar como veículo de inoculação de bactérias promotoras do crescimento de plantas. No geral, os resultados indicam que o biochar de palha de arroz (PA), associado à B1 incrementou o desenvolvimento de plantas de milho, e algumas propriedades do solo como o fósforo orgânico lável, fósforo orgânico solúvel em meio básico, respiração basal do solo e a atividade das enzimas fosfatase alcalina e a  $\beta$ -glucosidase.

Portanto, este estudo indica que biochar tem potencial para servir como veículo de inoculação das bactérias *Klebsiella aerogenes* por melhorar o desenvolvimento de plantas de milho e melhorar as propriedades de solos arenosos.

## **5. CAPÍTULO III**

### **EFEITO DO REVESTIMENTO BIODEGRADÁVEL Á BASE DE BIOCHAR E BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO EM SEMENTES DE MILHO**

## 5.1 RESUMO

Diante da baixa eficiência da adubação fosfatada em solos tropicais, técnicas voltadas para um uso mais eficaz do fósforo em sistemas de produção sustentáveis são necessárias. A aplicação de biochar e o uso de microrganismos solubilizadores de fósforo têm o potencial de contribuir de forma mais promissora para o crescimento e desenvolvimento das plantas quando aplicados simultaneamente. O biochar tem sido utilizado como um carreador de inóculo estável e econômico. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação de bactérias solubilizadoras de fósfato associadas a biochars em sementes de milho, sobre as variáveis fitotécnicas da planta, na produção de milho verde e nas propriedades químicas e bioquímicas do solo. Um experimento de campo foi realizado no município de Jupi - PE, em um delineamento de blocos casualizados com um fatorial duplo 3 x 4 e oito repetições. Os tratamentos consistiram na combinação de três fontes de biochar (controle sem biochar – C, biochar de palha de arroz – PA e biochar de uva branca – UB) e quatro níveis de inoculações bacterianas: aplicação de *Klebsiella aerogenes* UAGC17, *Klebsiella aerogenes* UAGC19, a mistura entre as duas cepas nas mesmas concentrações e o controle sem inoculação. As plantas foram colhidas no estádio R3 ou Grão leitoso, onde apresentam uma rápida acumulação de matéria seca e a umidade do grão está em torno de 80%. O número e massa de espigas verdes, diâmetro do colmo, altura da planta e altura de inserção da primeira espiga foram avaliados. Na mesma data, foi coletado solo na cova de plantio, na profundidade de 0-20 cm, sendo analisado quanto ao pH, K e P extraível, atividade das enzimas fosfatases ácida, alcalina e  $\beta$ -glucosidase, a respiração basal do solo e frações de P do solo. O tratamento UAGC17+UAGC19 associado ao UB aumentou o diâmetro do colmo e a altura da primeira espiga. Todas as plantas que receberam inoculação apresentaram altura total superior às plantas sem inoculação. O tratamento UAGC17 com PA aumentou as frações lábil, moderadamente lábil e não lábil de P do solo, além de aumentar a atividade das fosfatases ácida e alcalina e a respiração basal do solo. Não foram observados efeitos em relação às variáveis de produção de milho verde (número de espigas comerciais, número total de espigas e peso de espiga).

**Palavras-chave:** Bioinoculante. Milho verde. Agricultura sustentável. Microorganismos solubilizadores de fosfatos. *Klebsiella aerogenes*.

## 5.2 ABSTRACT

Faced with the low efficiency of phosphate fertilization in tropical soils, techniques aimed to a more effective use of phosphorus in sustainable production systems are required. The application of biochar and the use of P-solubilizing microorganisms have the potential to contribute more promisingly to plant growth and development when applied simultaneously. Biochar has been used as a stable and economical inoculum carrier. This work aimed to evaluate the effect of the application of P solubilizing bacteria associated with biochars in corn seeds, on the phytotechnical variables of the plant, on the green corn production and on the chemical and biochemical properties of the soil. A field experiment was carried out in the municipality of Jupi - PE, in a randomized block design with a 3 x 4 double factorial and eight replications. The treatments consisted of a combination of three sources of biochar (control without biochar – C, rice straw biochar – PA and white grape biochar – UB) and four levels of bacterial inoculations: application of *Klebsiella aerogenes* UAGC17, *Klebsiella aerogenes* UAGC19, the mixture between the two bacteria at the same concentrations and the control without inoculation. The plants were harvested at the R3 stage, or Milk Stage, where they exhibit rapid dry matter accumulation, and the moisture content of the kernels is around 80%. The number and mass of green ears, stem diameter, plant height and insertion height of the first ear were evaluated. On the same date, soil was collected in the planting hole, at a depth of 0-20 cm, being analyzed for pH, K and extractable P, acid, alkaline and  $\beta$ -glucosidase phosphatase enzymes, soil basal respiration and soil fractions of P. The treatment UAGC17+UAGC19 associated with UB increased the stem diameter and height of the first ear. All plants that received inoculation had higher total height than plants without inoculation. Treatment UAGC17+PA increased labile, moderately labile and non-labile fractions of soil P, in addition to increasing acid and alkaline phosphatase activity and soil basal respiration. No effects were observed regarding corn yield variables (number of commercial ears, total number of ears and ear weight).

**Keywords:** Bioinoculant. Green corn. Agricultural sustainability. Phosphate solubilizing microorganisms. *Klebsiella aerogenes*.

### 5.3 INTRODUÇÃO

Cerca de 30-40% dos solos aráveis no mundo são pobres em fósforo (P), considerado um dos nutrientes mais limitantes para o crescimento das plantas (PEREIRA et al., 2021). Os fertilizantes minerais têm sido amplamente aplicados no solo para assegurar os altos rendimentos das culturas (BINDRABAN et al., 2020). No caso dos fertilizantes fosfatados, grande parte é prontamente imobilizada devido à forte adsorção nos coloides do solo, deixando de ser absorvido pelas plantas (KOCHIAN, 2012).

Os solos do Brasil vêm acumulando uma reserva de P que poderá chegar a 105 milhões de toneladas em 2050 (WITHERS et al., 2018). O desenvolvimento de novas estratégias para aumentar a eficiência do uso desse estoque de P é de grande relevância para os sistemas de produção agrícola. A redução da dependência do P, oriundo do mercado externo, fez surgir a demanda por alternativas mais sustentáveis para o agronegócio brasileiro, proporcionando maior autonomia e sustentabilidade para a produção agrícola (ANLAUF, 2023; WENDIMU et al., 2023).

Uma alternativa promissora para acessar a fração de P menos lábil no solo são os microrganismos solubilizadores de fosfato (CHAGAS JUNIOR et al., 2010). Esse grupo é majoritariamente formado por bactérias e fungos que tornam o P insolúvel no solo disponível às plantas, demonstrando aplicações potenciais na agricultura, engenharia ambiental, biorremediação e biotecnologia (WANG et al., 2023).

Embora as projeções apontem que as fontes de P secundário possam potencialmente fornecer cerca de 20% da demanda de P no Brasil até 2050, o estoque de P recalcitrante no solo seria muito maior (WITHERS et al., 2018). Esse fato reforçou a importância de estudos sobre PSMs capazes de acessar essa fonte no solo, o que redesenharia os sistemas agrícolas no Brasil do âmbito da sustentabilidade e lucratividade. As bactérias solubilizadoras de fosfato também são regularmente identificadas como bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) e vêm sendo utilizadas como inoculantes biológicos para melhorar a assimilação de P e a produtividade das plantas (WEI et al., 2018; DAMO et al., 2022). No entanto, a baixa taxa de sobrevivência da bactéria, após ser introduzida no solo, limita a sustentabilidade da inoculação (BACKER et al., 2018).

O biochar obtido através da pirólise de múltiplas matérias-primas é frequentemente utilizado como um carreador de inóculo estável e econômico (YRJÄLÄ; LOPEZ-ECHARTEA, 2021). Comumente, o biochar exibe efeitos benéficos no que tange à diversidade, abundância e aperfeiçoamento funcional da comunidade microbiana inoculada (KOCHANEK et al., 2022). Biochars com porosidades internas fornecem habitats protetores capazes de prolongar a sobrevivência das BPCV, e seu poder de adsorção de nutrientes pode apoiar o crescimento microbiano (THUNSHIRN et al., 2021).

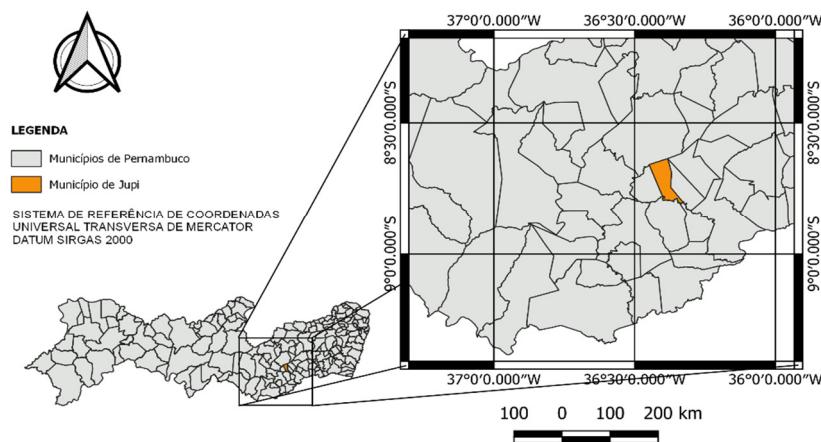
A adição de biochar agrega benefícios à regulação da comunidade de bactérias solubilizadoras de fosfato (WEI et al., 2018). No entanto, dependendo da matéria-prima utilizada na pirólise, a capacidade mantenedora de BPCV pode ser influenciada pelas diferentes propriedades físico-químicas do biochar (PATHY; RAY; PARAMASIVAN, 2020), afetando a capacidade de sobrevivência de isolados de BPCV (KHAN et al., 2014). Além disso, trabalhos demonstraram que o biochar aumenta o crescimento e a produção de biomassa do milho, além de diminuir o acúmulo de metais tóxicos (REHMAN et al., 2016). No entanto, ainda existem lacunas a respeito das interações físico-químicas e microbiológicas do biochar envolvidas na produtividade das culturas (SINGH et al., 2022).

Este estudo teve por objetivo de avaliar o efeito da associação de bactérias solubilizadoras de fosfato com biochars em sementes de milho, em condições de campo. Para tanto, as variáveis fitotécnicas da cultura, a produtividade de milho verde e as propriedades químicas e enzimáticas do solo foram analisadas.

## 5.4 MATERIAL E MÉTODOS

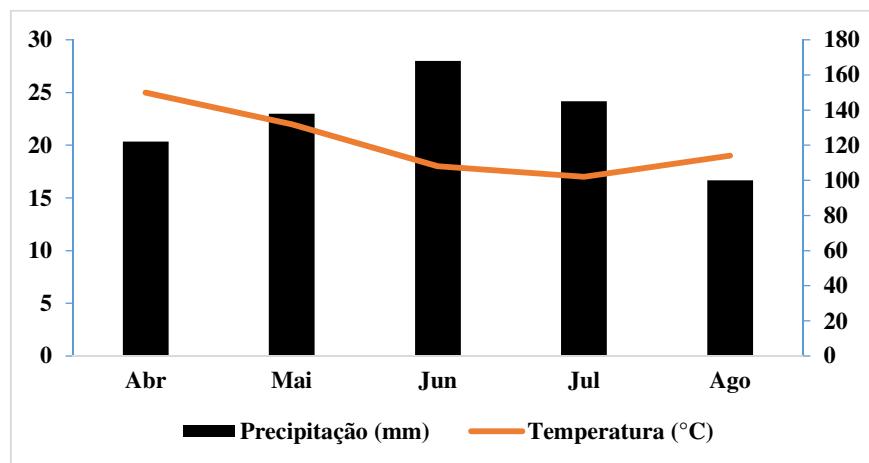
### 5.4.1 Área de implantação do experimento e caracterização do solo

O experimento de campo foi conduzido no Sítio Rio da Chata, localizado no município de Jupi – PE ( $8^{\circ}41'37''$  S e  $36^{\circ}24'37''$  W, com altitude de 782 m) (Figura 18). Nesta área o clima predominante é classificado conforme Köppen como Mesotérmico Tropical de Altitude (Cs'a). O solo da área foi classificado como Neossolo Regolítico Distrófico (SANTOS et al., 2018).



**Figura 18.** Mapa da localização da mesorregião do Agreste de Pernambuco e do município de Jupi-PE, Brasil.

Os dados meteorológicos do período de realização do experimento foram obtidos no banco de dados do INMET, extraídos da estação meteorológica automática situada no município de Garanhuns-PE, a 24 km da área do experimento (Figura 19).



**Figura 19.** Valores de precipitação pluviométrica acumulada e temperatura média do ar referente aos meses de realização do experimento, de abril a agosto de 2021.

A caracterização do solo da área experimental foi feita pelo LASP (Laboratório de Análise de Solo e Planta, Petrolina, PE) segundo metodologia de Teixeira et al. (2017) e está apresentada na Tabela 5.

**Tabela 5.** Atributos químicos de um Neossolo Regolítico Distrófico situado no município de Jupi, PE.

pH H <sub>2</sub> O	P mg dm <sup>-3</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H+Al	SB	V%
5,2	18	1,35	0,33	0,30	0,27	0,15	2,72	2,25	45

#### 5.4.2 Delineamento e unidade experimental

A obtenção das cepas bacterianas solubilizadoras de fosfato, a ativação das linhagens bacterianas e a produção e caracterização dos biochars, seguiram os mesmos procedimentos empregados no experimento anterior em casa de vegetação, e foram descritas nos itens 4.4.2, 4.4.3 e 4.4.4 do capítulo anterior desta Tese.

O experimento foi realizado em campo utilizando o delineamento experimental de blocos casualizados em arranjo fatorial 3x4 com 8 repetições, totalizando 96 parcelas. Dois fatores foram analisados, o primeiro com três níveis de biochar e o segundo com quatro níveis de isolados. O primeiro fator consistiu nos tipos de biochar, sendo: controle sem biochar, biochar de palha de arroz (PA), biochar de uva branca (UB). O segundo fator foi composto por: controle sem inoculação, isolado UAGC17 (B1); isolado UAGC19 (B2); mistura dos dois isolados em proporções equivalentes (B3).

Cada parcela foi constituída por quatorze linhas de 2,5 m de comprimento, espaçadas 1,0 m entre si, totalizando uma área de 35,0 m<sup>2</sup> (14,0 m x 2,5 m). As doze linhas centrais, destacando-se uma planta em cada extremidade, foi considerada área útil da parcela (19,2 m<sup>2</sup>).

#### 5.4.3 Instalação e condução do experimento

O preparo do solo se deu por uma aração do terreno e em seguida foi realizada a demarcação das parcelas e a adubação equivalente a 30 kg ha<sup>-1</sup> de N (como ureia), 20 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (como super simples) e 20 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O (como cloreto de potássio), seguindo o Manual de Adubação e Calagem do Estado de Pernambuco (IPA, 2008) para a cultura do milho sequeiro. O adubo foi colocado na cova e em seguida cobriu-se com um pouco de solo para posterior semeadura (Figura 20).



**Figura 20.** Montagem do experimento de campo em um Neossolo Regolítico Distrófico localizado no Sítio Rio da Chata no município de Jupi, PE. Foto: Rafaela F. da França.

A semeadura do milho foi realizada de forma manual com a variedade crioula Batité, no espaçamento de 1,0 m x 0,2 m (50 mil plantas ha<sup>-1</sup>), com plantio efetuado no período chuvoso

da região. Foram semeadas 2 sementes previamente inoculadas conforme descrito no item 4.4.3, e 10 dias após a germinação foi realizado o desbaste, restando 1 planta por cova. Os tratos culturais consistiram em capina manual de plantas daninhas e catação manual da lagarta da espiga do milho (*Helicoverpa zea*).

#### 5.4.4 Variáveis agronômicas do milho verde

A colheita foi realizada no estádio fenológico R3, que correspondeu a 110 dias após a germinação, quando os grãos apresentaram teor de umidade entre 70 e 80%. O número e a massa de espigas verdes de milho foram avaliadas em 8 plantas representativas de cada parcela (Figura 21), em espigas comercializáveis empalhadas, sem evidências aparentes do ataque de pragas e com comprimento superior a 19 cm (PAIVA et al., 2012). Também foi determinado o peso fresco total da planta ainda no campo, com o uso de uma balança com capacidade de 45 kg logo após a lavagem da raiz com água corrente para retirada do solo.

O diâmetro do colmo, a altura da planta e a altura de inserção da espiga foram avaliados na colheita. O diâmetro do colmo foi determinado no primeiro entre nó da planta, a aproximadamente 10 cm do nível do solo, através de um paquímetro digital. A altura da planta foi considerada como a distância do nível do solo ao ponto de inserção da lâmina foliar mais alta, determinada com uma fita métrica. A altura de inserção da espiga foi medida do nível do solo ao nó de inserção da primeira espiga.



**Figura 21.** Espigas de milho empalhada e sem palha de tamanho comercial e não comercial.  
Foto: Rafaela F. da França.

#### 5.4.5 Variáveis do solo

Juntamente com a coleta das plantas, também foi realizada a coleta do solo na cova de plantio, na profundidade de 0-20 cm. Uma parte da amostra de solo foi imediatamente acondicionada em sacos plásticos e guardada em cooler contendo gelo, a fim de refrigerá-los a uma temperatura de 4 °C, para a realização das análises bioquímicas.

A outra parte da amostra do solo foi seca, destorroada, passada em peneira de 2 mm e procedeu-se as análises do solo: pH (em água 1:2,5), K e P extraível, seguindo a metodologia descrita por Teixeira et al. (2017), com K quantificado por fotometria de chama e P por colorimetria (BRAGA; DEFELIPO, 1974).

As enzimas fosfatase ácida, alcalina e  $\beta$ -glucosidase foram determinadas conforme metodologias propostas por Eivazi e Tabatabai (1977; 1988), e a respiração basal do solo (RBS) de acordo a metodologia de Da Silva et al. (2007).

O fracionamento do P do solo se deu através da metodologia proposta por Bowman e Cole (1978) e a digestão pelo método 365.3 da USEPA (1978). O P total lábil (Ptl) e o P inorgânico lábil (Pil) foram determinados por colorimetria (BRAGA; DEFELIPO, 1974) e a quantificação do P orgânico lábil (Pol) obtida da diferença entre Ptl e Pil.

O P microbiano foi obtido conforme metodologia de Broockes et al. (1982) e McLaughlin et al. (1986) com modificação na relação solo:solução descrita por Guerra et al. (1995). Para a realização da análise, pesou-se em duplicata 10 g de solo, as quais foram submetidas a irradiação em microondas por um tempo previamente calculado. Em seguida adicionou-se 100 mL de  $\text{NaHCO}_3$  0,5 mol  $\text{L}^{-1}$  com pH corrigido para 8,5, agitadas por 30 min e em repouso por mais 30 min e depois procedeu-se a filtragem do extrato e digestão conforme o método 365.3 da USEPA (1978).

O cálculo de P foi obtido a partir das diferenças nas quantidades dos extratos irradiados e não irradiados, após as correções do teor de água das amostras, sendo o solo previamente seco em estufa a 105 °C.

#### 5.4.6 Análises estatísticas

A análise de variância (ANOVA) e o teste *post-hoc* LSD (Least Significant Difference) de Fisher foram realizados através da biblioteca R 'agricolae' (v. 1.3.5) adotando o nível de significância de 5% ( $p = 0.05$ ). A correção de Bonferroni foi aplicada para controlar a taxa de erro do tipo I da família de teste em função das comparações múltiplas entre tratamentos. Os gráficos de barras foram construídos utilizando as funções do pacote 'ggplot2' (v. 3.3.5). As análises estatísticas (multivariadas) foram feitas no software R versão 4.1.1 (R Core Team, 2021) com a ajuda da interface RStudio 2021.09.0-Build 351 (RStudio Team, 2021). A análise de componentes principais (PCA), cálculos de correlações, e a análise de variância multivariada (MANOVA) foram feitos com funções do pacote 'vegan' (v. 2.5.7) e os gráficos da estatística multivariada foram construídos pelo pacote ggplot2 (biplots) e 'graphics' (v. 4.1.1).

## 5.5 RESULTADOS

### 5.5.1 Análise de variância do modelo fatorial

A análise de variância do modelo fatorial de inoculação com bactérias e aplicação de biochars demonstrou interações significativas ( $p < 0.05$ ) entre esses fatores para as variáveis diâmetro do colmo e altura da primeira espiga (Tabela 6). A inoculação influenciou na altura das plantas (efeito simples) e não foram observadas respostas significativas das outras variáveis vegetais.

**Tabela 6.** Médias gerais, desvio padrão, coeficiente de variação do modelo estatístico e significância dos fatores, de acordo com análise de variância para 17 variáveis de solo e planta.

Variável	Média	DP	CV%	valores-p <sup>a</sup>		
				bactéria	biochar	bac*bio
Dia. Colmo (mm)	24,7	4,3	16,4	0,228	0,158	<b>0,045</b>
Alt. Total (cm)	157,7	26,0	14,3	<b>0,007</b>	0,434	0,062
Alt. 1 <sup>a</sup> esp. (cm)	74,4	15,9	18,9	0,317	0,243	<b>0,021</b>
N. Esp. Comerc.	1,0	0,4	38,1	0,219	0,403	0,559
N. Esp. Total	1,3	0,5	42,5	0,442	0,116	0,317
Peso / Esp. (g)	292,2	80,2	27,7	0,185	0,893	0,537
P.F. / Planta (kg)	1,1	0,5	51,8	0,520	0,883	0,734
pH	5,7	0,2	3,4	0,826	0,476	0,174
K (mg dm <sup>-3</sup> )	55,1	12,8	22,0	0,448	0,170	0,240
P (mg kg <sup>-1</sup> )	39,1	24,4	39,2	<b>0,000</b>	<b>0,003</b>	<b>0,000</b>
PoL (mg kg <sup>-1</sup> )	36,6	13,9	28,8	<b>0,000</b>	0,130	<b>0,000</b>
PoH (mg kg <sup>-1</sup> )	76,5	58,0	64,9	<b>0,012</b>	<b>0,003</b>	<b>0,002</b>
PoOH (mg kg <sup>-1</sup> )	57,1	25,9	38,4	<b>0,042</b>	<b>0,027</b>	<b>0,000</b>
Pmic (mg kg <sup>-1</sup> )	14,2	13,3	85,1	0,354	0,116	<b>0,002</b>
RBS (mg C-CO <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> solo h <sup>-1</sup> )	5,6	2,1	31,8	<b>0,000</b>	0,091	<b>0,001</b>
Beta (µg PNG g <sup>-1</sup> solo h <sup>-1</sup> )	328,4	184,6	50,1	0,219	0,485	0,169
aci.P (µg PNP g <sup>-1</sup> solo h <sup>-1</sup> )	110,7	104,2	64,7	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
alc.P (µg PNP g <sup>-1</sup> solo h <sup>-1</sup> )	121,3	139,8	95,2	<b>0,047</b>	<b>0,015</b>	<b>0,000</b>

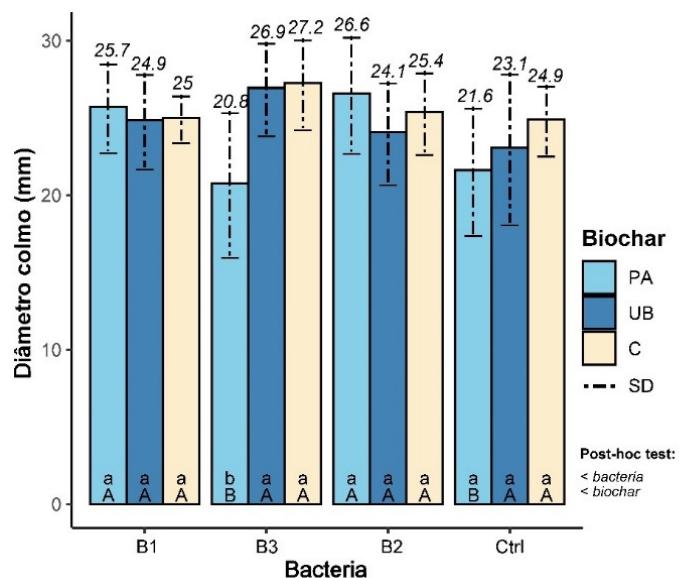
<sup>a</sup> de acordo com o teste F, valores-p < 0,05 foram destacados em negrito. Dia. Colmo é o diâmetro do colmo da planta de milho; Alt. total é a altura total da planta; Alt. 1<sup>a</sup> esp. é a altura da primeira espiga; N. Esp. Comerc. é o número de espigas comerciais; N. Esp. Total é o número de espigas total; Peso/Esp. é o peso de espigas; P.F./Planta é o peso fresco total da planta; PoL é o fósforo orgânico lável; PoH é o fósforo orgânico total solúvel em meio ácido; PoOH é fósforo orgânico total solúvel em meio básico; Pmic é o fósforo da biomassa microbiana; RBS é a respiração basal do solo; Beta é a enzima B-glucosidase do solo; aci.P é a enzima fosfatase ácida do solo; alc.P é a enzima fosfatase alcalina do solo.

Quanto às variáveis do solo, os fatores interagiram significativamente para o teor de P disponível (Mehlich), as concentrações das frações PoL, PoH, PoOH e Pmic, além da taxa de respiração basal do solo (RBS) e da atividade das fosfatases ácida e alcalina (Tabela 6).

### 5.5.2 Variáveis fitotécnicas da planta

As diferentes combinações de inóculos bacterianos e tipos de biochar influenciaram no diâmetro médio de colmos de plantas de milho, variando em média entre 20,8 e 27,2 mm. A combinação de bactérias (B3) demonstrou os maiores valores para diâmetro de colmo quando utilizada juntamente com o UB ou sem biochar, respectivamente 26,9 e 27,2 mm, contrastando

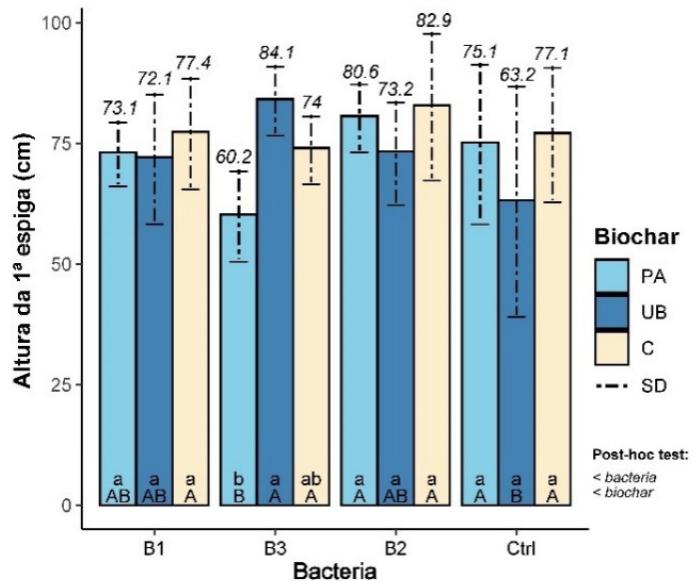
significativamente com a média de 20,8 mm observada para o PA (Figura 22). Esse último diâmetro foi semelhante ao observado em plantas tratadas com PA sem bactéria (21,6 mm), ambos diferiram das médias observadas em plantas com B1 (25,7 mm) e B2 (26,6 mm) para o mesmo biochar (PA). Outras diferenças significativas não foram detectadas para diâmetro de colmo.



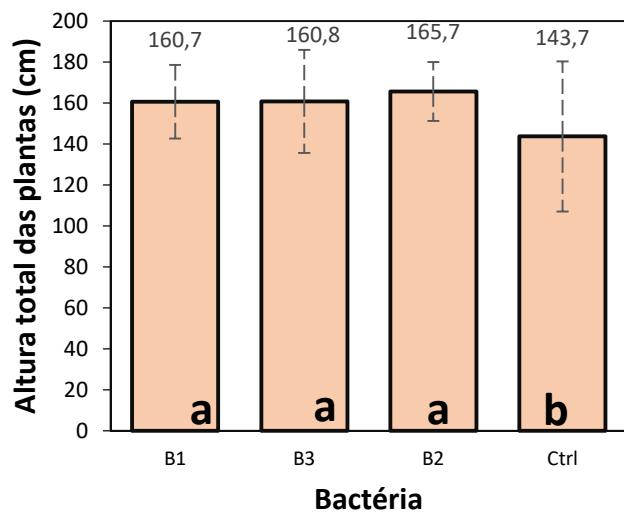
**Figura 22.** Diâmetro médio de colmos de plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. O tratamento controle representa as ausências de inóculo ou de biochar para os fatores 1 e 2, respectivamente. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+ UAGC19, PA – biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e controle – C.

Quanto à altura da 1<sup>a</sup> espiga, foram observadas plantas medindo em média 60,2 cm e 84,1 cm (Figura 23). A combinação B3 e UB também se destacou, com plantas apresentando a maior média. Ainda dentro dos níveis de UB, a combinação de inóculos (B3) proporcionou um incremento significativo nesse parâmetro (20,9 cm) em comparação ao controle (63,2 cm). Por outro lado, utilizando B3, a altura média da 1<sup>a</sup> espiga com UB foi semelhante ao controle (74,0 cm) e diferente das plantas com PA, que foi o outro extremo com plantas medindo apenas 60,2 cm.

No geral, todas as plantas inoculadas apresentaram alturas totais semelhantes, em média 162 cm, as quais cresceram significativamente mais do que as plantas não inoculadas, que apresentaram altura de 144 cm (Figura 24).



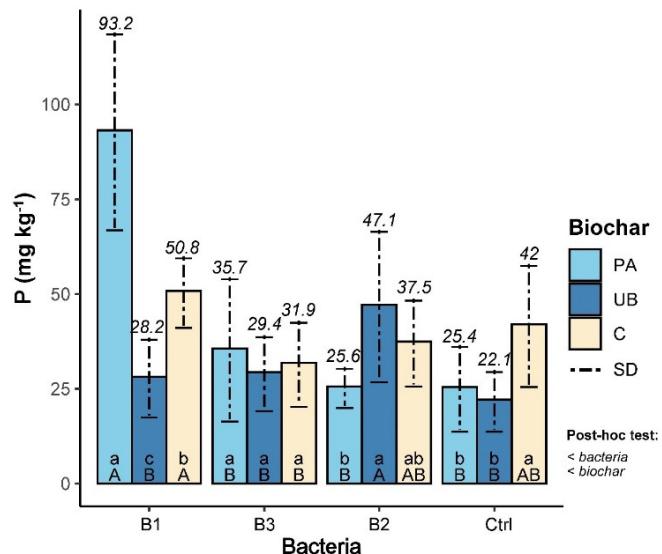
**Figura 23.** Altura média até a primeira espiga de plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. O tratamento controle representa as ausências de inóculo ou de biochar para os fatores 1 e 2, respectivamente. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+ UAGC19, PA – biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e controle – C.



**Figura 24.** Altura média total das plantas de milho tratadas com isolados bacterianos, independentemente do biochar (efeito simples). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes bactérias, considerando as médias globais dos tratamentos com todos os níveis de biochars (não significativo), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+ UAGC19 e controle – Ctrl.

### 5.5.3 Propriedades químicas do solo

Algumas propriedades químicas foram influenciadas pela associação entre inóculo bacteriano e tipo de biochar (Figura 25). O maior valor de P-Mehlich foi observado no tratamento B1 associado a PA ( $93.2 \text{ mg kg}^{-1}$ ), sendo semelhante ao de solo com plantas sem biochar ( $51 \text{ mg kg}^{-1}$ ), mas diferente da média observada em UB ( $28 \text{ mg kg}^{-1}$ ), todos dentro do nível de inoculante B1. Dentro do nível de biochar PA, as concentrações de P-Mehlich em solos com plantas inoculadas com B1 foi significativamente maior do que em todos os outros níveis de inoculantes:  $36 \text{ mg kg}^{-1}$  (PA com B3),  $26 \text{ mg kg}^{-1}$  (PA com B2) e  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  (controle PA).



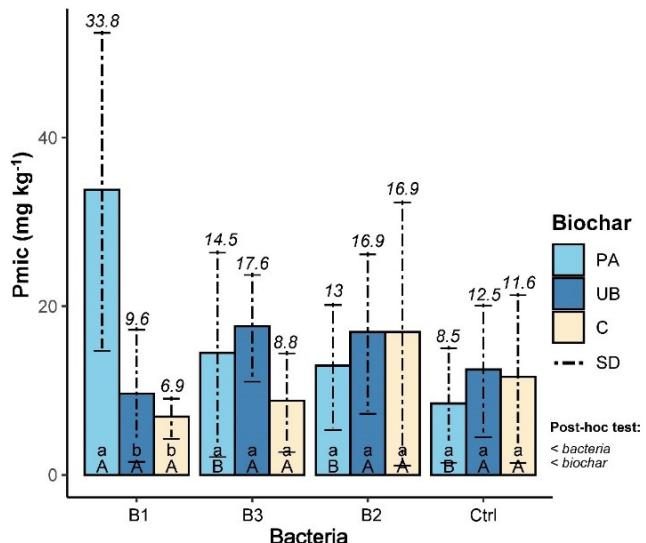
**Figura 25.** Concentrações de P-Mehlich em solos cultivados com plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+UAGC19, PA – biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e controle – C.

O maior valor para P microbiano foi observado no tratamento B1 com PA ( $33,8 \text{ mg kg}^{-1}$ ), diferindo significativamente de UB ( $9,6 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e do controle ( $6,9 \text{ mg kg}^{-1}$ ) dentro do nível de inóculo B1 (Figura 26). Dentro do nível de biochar PA, as concentrações de Pmico no tratamento B1 ( $33,8 \text{ mg kg}^{-1}$ ) também foi significativamente maior do que nos tratamentos B3 ( $14,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ), B2 ( $13,0 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e controle ( $8,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ).

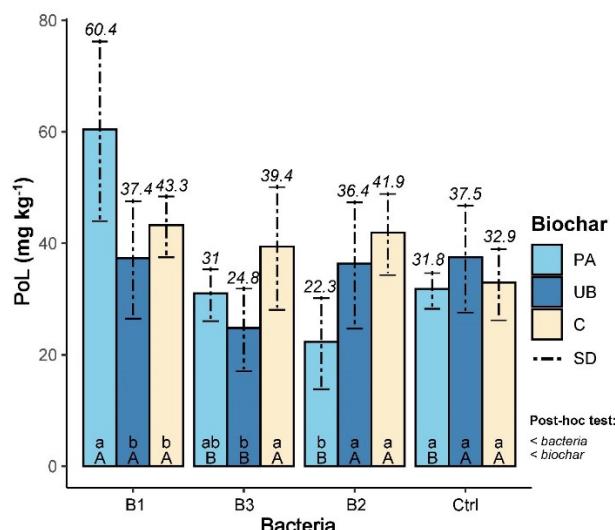
Para a variável P orgânico lável, o tratamento B1 associado a PA ( $60,4 \text{ mg kg}^{-1}$ ) se destacou dos demais, apresentando a maior concentração de PoL, diferindo significativamente de UB ( $37,4 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e do controle ( $43,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Também apresentou o maior resultado se comparado aos demais tratamentos de PA, sendo  $31,0 \text{ mg kg}^{-1}$  para B3,  $22,3 \text{ mg kg}^{-1}$  para B2 e  $31,8 \text{ mg kg}^{-1}$  para o controle (Figura 27).

O tratamento com B1 associado a PA ( $169,2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) apresentou o maior resultado para P orgânico total solúvel em meio ácido, contrastando com a média de UB ( $90,9 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e do controle ( $42,6 \text{ mg kg}^{-1}$ ), dentro do nível de inóculo para B1. Dentro do nível de PA, a concentração de PoH do tratamento B1 ( $169,2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) foi significativamente maior do que nos tratamentos B3 ( $71,9 \text{ mg kg}^{-1}$ ), B2 ( $104,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e controle ( $62,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Figura 28).

As concentrações de P orgânico solúvel em meio alcalino variaram entre 95,8 mg kg<sup>-1</sup> e 28,0 mg kg<sup>-1</sup> (Figura 29). O tratamento B1 com PA também se destacou para PoOH, apresentando a maior média, diferindo significativamente de UB (48,5 mg kg<sup>-1</sup>) e do controle (60,3 mg kg<sup>-1</sup>). Dentro do nível de PA, o tratamento B1 (95,8 mg kg<sup>-1</sup>) também foi significativamente superior a B3 (61,5 mg kg<sup>-1</sup>), B2 (45,6 mg kg<sup>-1</sup>) e controle (51,2 mg kg<sup>-1</sup>).

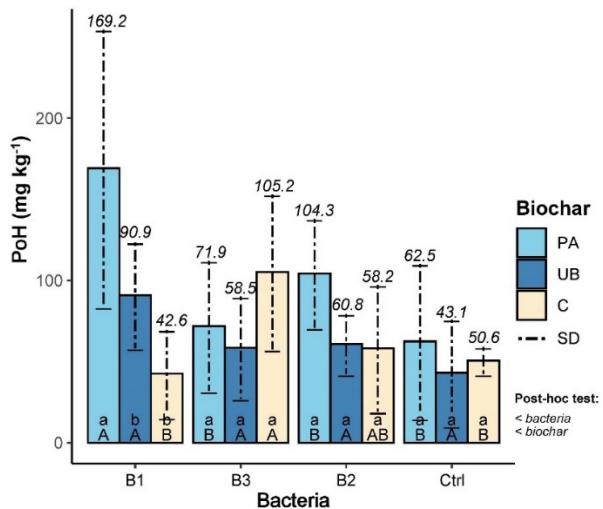


**Figura 26.** Concentrações de P microbiano (Pmic) em solo cultivado com plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+ UAGC19, PA – biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e controle – C.

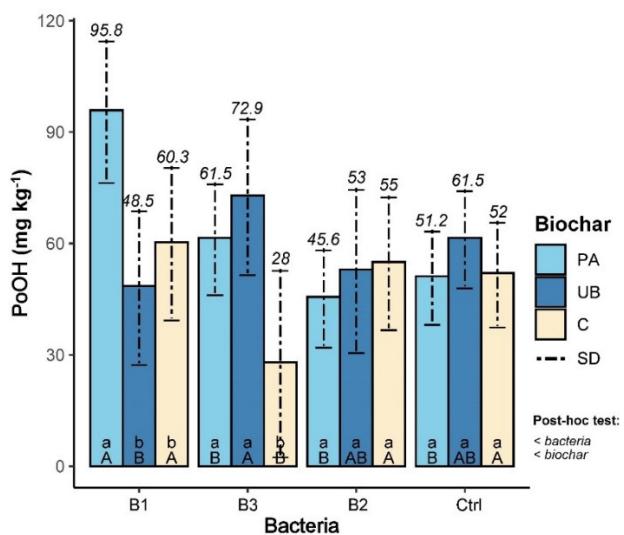


**Figura 27.** Concentrações de fósforo orgânico lável em solo cultivado com plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com

o teste LSD ao nível de 5% de significância. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+ UAGC19, PA – biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e controle – C.



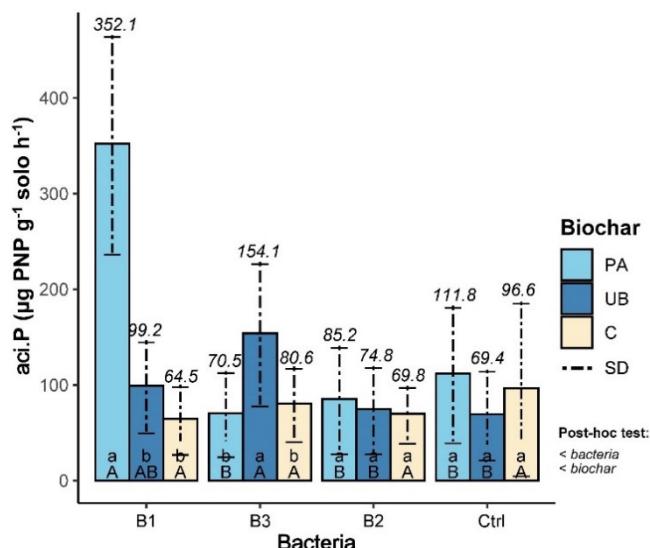
**Figura 28.** Concentrações de fósforo orgânico total solúvel em meio ácido (PoH) em solo cultivado com plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+ UAGC19, PA – biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e controle – C.



**Figura 29.** Concentrações de fósforo orgânico total solúvel em meio básico em solo cultivado com plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+ UAGC19, PA – biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e controle – C.

### 5.5.4 Atividades enzimáticas e respiração basal do solo

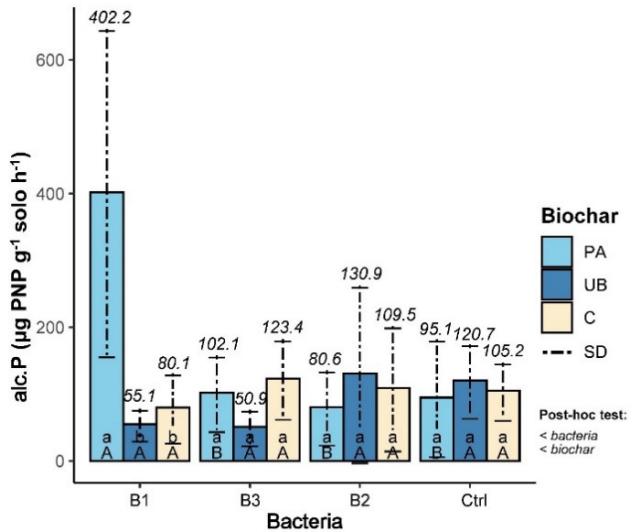
As diferentes combinações de inóculos bacterianos e tipos de biochar influenciaram na atividade de fosfatase ácida no solo, variando entre 352,1 e 64,5  $\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$  (Figura 30). O maior valor para a enzima fosfatase ácida foi observado no tratamento B1 PA (352,1  $\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ ), sendo significativamente diferente do tratamento com UB (99,2  $\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ ) e do controle (64,5  $\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ ), todos dentro do nível de inoculante B1. Dentro do nível de biochar PA, as concentrações de aci.P em solos com plantas inoculadas com B1 foram significativamente maiores do que em todos os outros níveis de inoculantes: 70,5  $\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$  (PA com B3), 85,2  $\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$  (PA com B2) e 111,8  $\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$  (PA com controle).



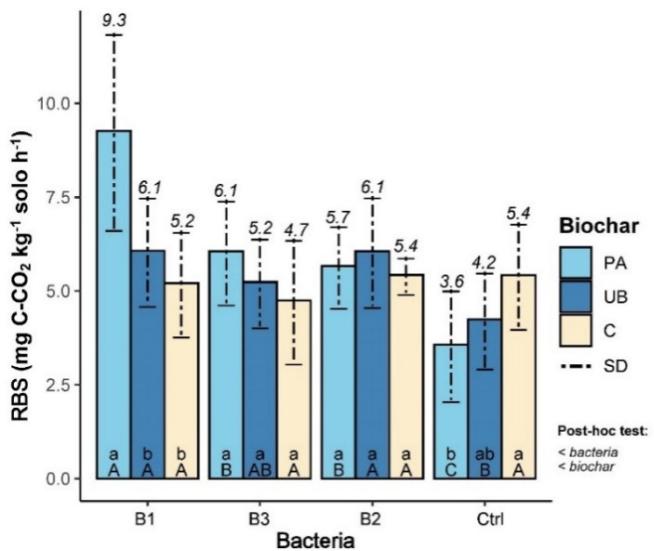
**Figura 30.** Atividade da enzima fosfatase ácida do solo cultivado com plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+UAGC19, PA – biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e controle – C.

O maior valor para a enzima fosfatase alcalina também foi observado no tratamento B1 com PA (402,2  $\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ ), diferindo significativamente de UB (55,1  $\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ ) e do controle (80,1  $\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ ) dentro do nível de inóculo B1 (Figura 31). Dentro do nível de biochar PA, as concentrações de alc.P no tratamento B1 (402,2  $\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ ) também foi significativamente superior aos tratamentos B3 (102,1  $\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ ), B2 (80,6  $\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ ) e controle (95,1  $\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ ).

Para a variável respiração basal do solo, o maior valor foi observado no tratamento B1 associado a PA (9,3 mg C-CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> solo h<sup>-1</sup>), diferindo significativamente de UB (6,1 mg C-CO<sub>2</sub> Kg<sup>-1</sup> solo h<sup>-1</sup>) e do controle (5,2 mg C-CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> solo h<sup>-1</sup>) dentro do nível de inóculo B1 (Figura 32). Dentro do nível de PA, a RBS no tratamento B1 (9,3 mg C-CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> solo h<sup>-1</sup>) também foi significativamente superior aos tratamentos B3 (6,1 mg C-CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> solo h<sup>-1</sup>), B2 (5,7 mg C-CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> solo h<sup>-1</sup>) e controle (3,6 mg C-CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> solo h<sup>-1</sup>).



**Figura 31.** Atividade da enzima fosfatase alcalina do solo cultivado com plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+ UAGC19, PA – biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e controle – C.



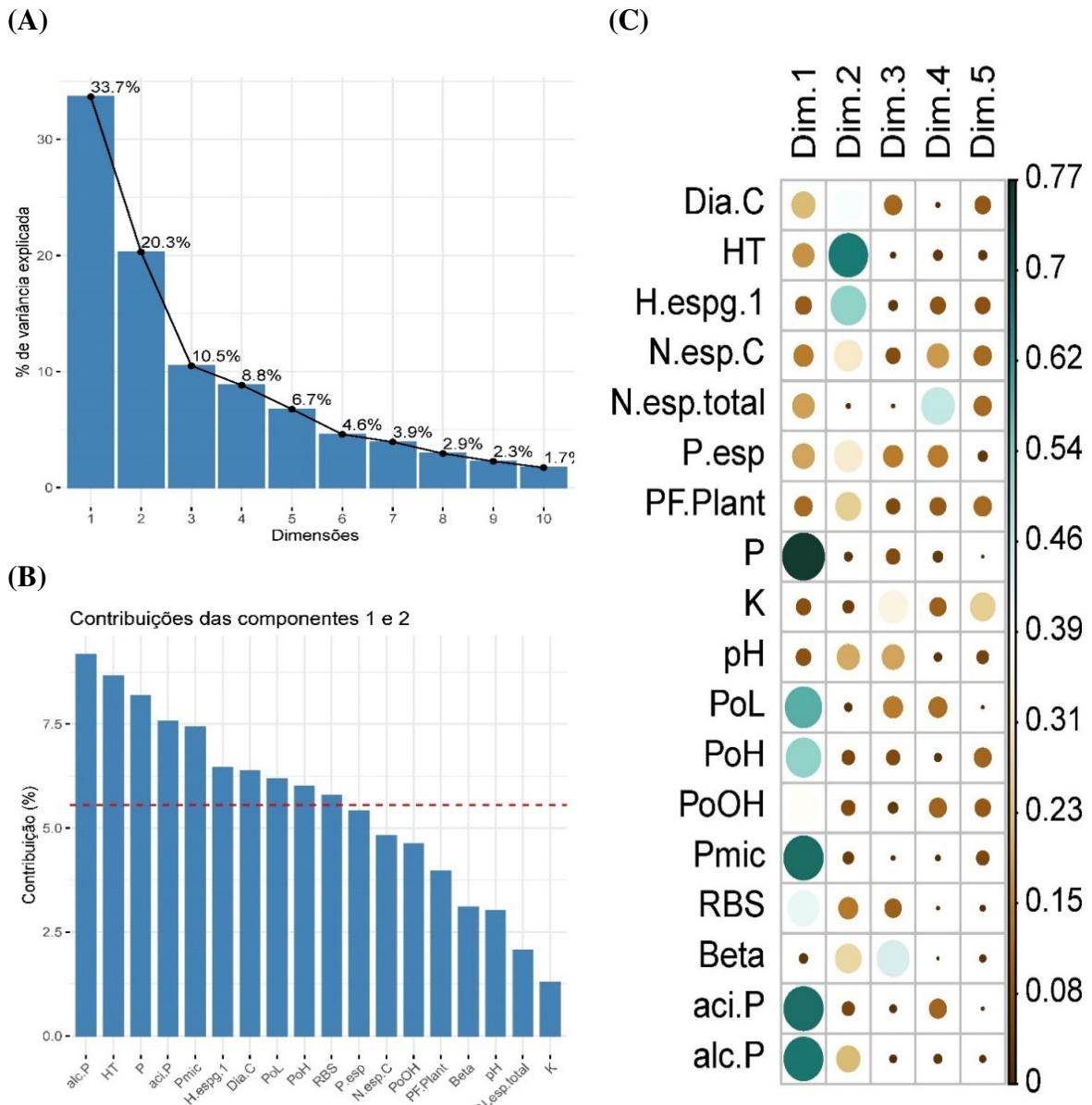
**Figura 32.** Respiração basal do solo (RBS) de solo cultivado com plantas de milho tratadas com isolados bacterianos (fator 1) e biochars (fator 2). As letras minúsculas compararam médias entre diferentes biochars para o mesmo nível de inóculo bacteriano (barras de cores diferentes) e as letras maiúsculas compararam as médias entre diferentes níveis de inóculo para o mesmo nível de biochar (barras com a mesma cor), de acordo com o teste LSD ao nível de 5% de significância. Legenda: B1 – UAGC17, B2 – UAGC19, B3 – UAGC17+ UAGC19, PA – biochar de palha de arroz, UB – biochar de resíduo de uva branca e controle – C.

### 5.5.5 Análise mulivariada

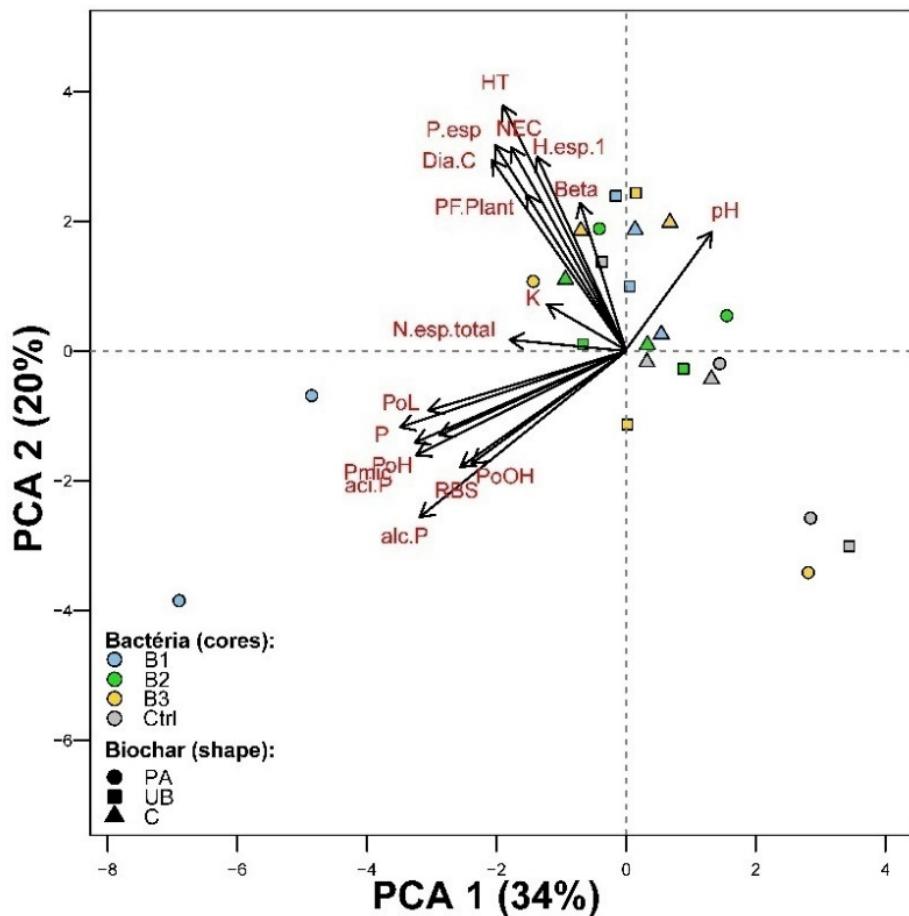
Das 19 variáveis analisadas, 10 (a saber: alc.P, HT, P, aci.P, P.mic, P.esp, Dia.C, PoL, N.esp.C e PoH) apresentam uma contribuição acima da média esperada, quando consideradas a PC1 e a PC2 simultaneamente (Figura 33B), sendo P, PoL, PoH, Pmis, aci.P e alc.P as variáveis de maior contribuição para a PC1 (Figura 35C), a qual respondeu por mais de 30% da variação total dos dados (Figura 33A). A variável HT destaca-se na contribuição dos 21.2% da variação total dos dados referente à PC2 (Figura 33 A e C).

As componentes principais, PC1 e PC2 explicam mais de 50% da variação total dos dados. A partir da Figura 34, é possível observar uma forte correlação entre as variáveis mensuradas referentes ao P e à respiração basal do solo (RBS), as quais são inversamente proporcionais à variação do pH.

As variáveis HT, P.esp, NEC, Dia.C, PF.Plant, H.esp.1, Beta se correlacionam com a maioria dos tratamentos empregados (polígonos coloridos). Tais variáveis, juntamente com as mensurações do P e o pH, contribuem majoritariamente para a primeira componente principal (PC1), respondendo por mais de 34% da variação dos dados. As mensurações de P, no entanto, não mostram correlação com os diferentes tratamentos empregados. K e N.esp.total destacam-se como os vetores de maior contribuição da PC2 e respondem por cerca de 20% da variação dos dados.



**Figura 33.** Contribuições relativas das componentes principais e das variáveis sobre a variância total dos dados de plantas cultivadas em campo. (A) Percentual de explicação da variância de cada componente principal. (B) Contribuição relativa das variáveis para as duas componentes principais. A linha tracejada vermelha no gráfico acima indica a contribuição média esperada. (C) Correlação das variáveis com as cinco principais componentes. O diâmetro dos círculos é proporcional a correlação entre a variável e as respectivas componentes principais (Dim) e a escala de cor indica o valor da correlação. Dia.C é diâmetro do colmo da planta de milho; HT é altura total; H.Espg.1 é altura de inserção da primeira espiga; N.Esp.C é o número de espigas comerciais; N.esp.total é o número de espigas total; P.esp é o peso de espigas; PF.Plant é o peso fresco total da planta; PoL é o fósforo orgânico lábil; PoH é o fósforo orgânico total solúvel em meio ácido; PoOH é fósforo orgânico total solúvel em meio básico; Pmic é o fósforo da biomassa microbiana; RBS é a respiração basal do solo; Beta é a enzima B-glucosidase do solo; aci.P é a enzima fosfatase ácida do solo; alc.P é a enzima fosfatase alcalina do solo.



**Figura 34.** Biplot da análise de componentes principais das variáveis de milho cultivado em campo. Os rótulos em vermelho são as variáveis mensuradas e os polígonos coloridos representam as médias dos tratamentos para os dois blocos experimentais. As duas componentes principais explicaram cerca de 54% da variância total estimada. Dia.C é diâmetro do colmo da planta de milho; HT é altura total; H.Espg.1 é altura de inserção da primeira espiga; NEC é o número de espigas comerciais; N.esp.total é o número de espigas total; P.esp é o peso de espigas; PF.Plant é o peso fresco total da planta; PoL é o fósforo orgânico lável; PoH é o fósforo orgânico total solúvel em meio ácido; PoOH é fósforo orgânico total solúvel em meio básico; Pmic é o fósforo da biomassa microbiana; RBS é a respiração basal do solo; Beta é a enzima  $\beta$ -glucosidase do solo; aci.P é a enzima fosfatase ácida do solo; alc.P é a enzima fosfatase alcalina do solo.

## 5.6 DISCUSSÃO

O biochar tem ganhado atenção devido à capacidade de atuar na correção do solo e no sequestro de carbono, tendo também demonstrado efeitos agronômicos promissores (SOHI et al., 2010; VERHEIJEN et al., 2010), com potencial de impactar de forma efetiva a gestão de agroecossistemas. A promoção de crescimento vegetal mediada pelo biochar também tem sido correlacionada à biota edáfica (ATKINSON et al., 2010; LEHMANN et al., 2011).

Neste trabalho, foi observado o aumento da taxa de respiração basal no solo (RBS) no tratamento B1 com PA, quando comparado com UB e o controle (Figura 32). A RBS pode ser definida como o somatório das reações metabólicas nas quais o CO<sub>2</sub> é produzido no solo. Os microrganismos, como bactérias e fungos, são tidos como os principais responsáveis pela emissão de CO<sub>2</sub> através da degradação da matéria orgânica (DA SILVA et al., 2007). Logo, esta taxa permite fazer inferência sobre a atividade microbiana frente à degradação de substratos orgânicos que contribuem para ciclagem de nutrientes, como o P no solo.

Regularmente, aceita-se que o C do biochar é indisponível para os microrganismos do solo (THEIS; RILLIG, 2009), entretanto, há evidências que alguns componentes do biochar podem ser facilmente biodegradáveis e, assim, promover um aumento temporário na atividade microbiana, influenciando no aumento da taxa de RBS (STEINER et al., 2008b). Além disso, compostos voláteis encontrados no biochar podem servir como fonte de C para microrganismos (STEINER et al., 2008a). Assim, é cabível que a aplicação de bactéria solubilizadora de P e o biochar tenha afetado a atividade microbiana do solo - visualizado por maiores valores de RBS - relacionada à maior liberação de P. De fato, maiores valores de P no solo foram obtidos com aplicação de PA com B1 (Figura 25).

Estudos verificaram que a adição de biochar aumenta a biomassa microbiana, com mudanças significativas na composição da comunidade microbiana e em atividades enzimáticas, e é sugerido que tais mudanças podem ter efeitos nos ciclos de nutrientes (LEHMANN et al., 2011) ou na estrutura do solo (RILLIG; MUMMEY, 2006) e assim, afetar indiretamente o crescimento das plantas (WARNOCK et al., 2007; LEHMANN et al., 2011). No entanto, o tratamento apenas com PA apresentou resultados significativamente menores de RBS em relação ao controle. Na presença da inoculação, esse resultado foi o oposto, onde a aplicação de B1 com PA para RBS foi superior às demais inoculações com o mesmo biochar, e superior à inoculação com B1 sozinha (Figura 32). Nota-se, desta forma, a importância das combinações entre os tipos de biochar e os inoculantes para a atividade da microbiota do solo.

Os microrganismos consomem rapidamente o C de fácil mineralização, que é fonte de energia para a produção de enzimas que atuarão sobre a matéria orgânica do solo, e tal processo gera maiores valores de respiração microbiana (ZHANG et al., 2017). Atrelado a maiores valores de RBS no tratamento PA com B1, observou-se o aumento das concentrações das enzimas fosfatases ácidas e alcalinas (Figura 9 e 10). A fosfatase alcalina em sua maioria é de origem microbiana, enquanto a ácida é sintetizada por plantas e microrganismos (NANNIPIERI et al., 2011).

As bactérias utilizadas neste trabalho, cuja capacidade de solubilizar P foi verificada *in vitro* anteriormente por Sousa et al. (2016), podem ter atuado diretamente na solubilização de P, excretando fosfatases. Alguns trabalhos mostraram que o biochar tem efeito positivo nas comunidades de bactérias solubilizadoras de fosfato e aumenta a abundância de famílias bacterianas capazes de degradar compostos de C mais recalcitrantes (ANDERSON et al., 2011). Não é descartado que microrganismos com outras funções relevantes para o solo (por exemplo, aqueles capazes de acessar frações não lábeis de P) tenham sido enriquecidos na presença de B1 com PA, já que houve aumento do teor P orgânico em meio básico neste tratamento (Figura 8). Esta fração corresponde a um material mais evoluído e polimerizado de difícil acesso aos vegetais e à microbiota (GUERRA, 1993).

As enzimas fosfatasas são amplamente encontradas em ambientes naturais e atuam na regulação de P pela hidrólise de ligações éster-fosfato em P orgânico, liberando fosfato à planta (BURNS; DICK, 2002). O aumento da concentração destas enzimas pode ter favorecido a redução da fração de P não disponível e incrementado a fração de P orgânico lábil (PoL; Figura 6) e moderadamente lábil. A fração de P orgânico em meio ácido (PoH) é tida como moderadamente lábil (BOWMAN; COLE, 1978).

A obtenção de Po pela biomassa dos microrganismos do solo pode ocorrer pela degradação da matéria orgânica ou pela mineralização do fosfato orgânico (MCGILL; COLE, 1981). Po destaca-se por ser uma relevante reserva de P lábil para os vegetais, uma vez que pode fornecer gradualmente este nutriente para plantas (GALVANI et al., 2004). Em determinadas condições, a biomassa microbiana do P pode corresponder em até 40% do Po do solo (TURNER et al., 2003). O P alocado na biomassa microbiana faz parte dos componentes celulares da microbiota, e a liberação de P ao solo ocorre após a morte destes microrganismos (MARTINAZZO et al., 2007). Tendo em vista os dados obtidos neste trabalho (P, P<sub>mic</sub> e PoL), é possível que a aplicação de PA com B1 possa ter estimulado a biomassa microbiana ocasionando a imobilização de P por tais microrganismos, o que por sua vez, estaria atrelado à disponibilização deste nutriente após a ruptura das células microbianas para o solo e, por conseguinte, à planta.

Outra possibilidade é que o biochar possa ter favorecido a colonização das bactérias inoculadas na planta e no solo, fornecendo proteção física a estes microrganismos e, de certa forma, fornecendo um ganho competitivo em relação aos microrganismos adaptados do solo frente aos sítios de infecção da planta. Outrossim, a ação do inoculante junto ao biochar pode ter favorecido o enriquecimento de grupos microbianos relacionados a mineralização de P e degradação da matéria orgânica.

Já foi sugerido que o tamanho dos poros do biochar afeta a sobrevivência microbiana, uma vez que poros maiores fornecem um habitat para o desenvolvimento de microrganismos e teria efeitos positivos na capacidade de reter nutrientes ligando cátions e ânions à superfície (LIANG et al., 2006). Um estudo utilizando 32 biochars mostrou que a sobrevivência de *Rhizobium tropici* tinha uma dependência em relação ao tamanho dos poros do biochar (VANEK et al., 2016).

Os microrganismos podem favorecer a aquisição de P do solo para as plantas, através de inúmeros mecanismos, como: aumento do crescimento radicular, alteração do equilíbrio de sorção que pode resultar em maior transferência de íons ortofosfato para a solução do solo, e através da indução de processos metabólicos eficazes na solubilização e mineralização direta do P no solo (RICHARDSON; SIMPSON, 2011). De fato, as próprias plantas exibem uma ampla gama de alterações morfológicas e fisiológicas das raízes em resposta à deficiência de P (RICHARDSON et al., 2009). No entanto, os microrganismos são essenciais para a ciclagem do P do solo e o aumento da atividade microbiana na rizosfera tem implicações significativas para a nutrição de P nas plantas.

Neste estudo, a aplicação dos inoculantes solubilizadores de fosfato teve efeitos expressivos na planta mesmo na ausência de biochar. No geral, todas as plantas inoculadas apresentaram alturas totais semelhantes, em média 162 cm, significativamente maiores do que as plantas não-inoculadas que apresentaram altura de apenas 144 cm (Figura 24).

As estirpes testadas neste trabalho foram previamente isoladas da rizosfera de plantas de cana-de-açúcar e foram confirmadas em sua capacidade de solubilizar P em meio sólido e líquido. Após o sequenciamento parcial da região 16S rRNA destas bactérias, foi possível identificá-las como pertencente ao gênero *Klebsiella aerogenes*. Bactérias pertencentes a este gênero *Klebsiella* sp. têm sido isoladas e caracterizadas em diferentes habitats, incluindo solo, plantas, alimentos, insetos, água, bem como associadas a doenças humanas (DURAN-BEDOLLA et al., 2021). Muitos trabalhos têm mostrado o potencial de espécies de *Klebsiella*

sp. como promotoras de crescimento vegetal eficazes, com ênfase na fixação biológica de nitrogênio (WEI et al., 2014). No entanto, novos trabalhos têm apontado a capacidade de membros deste gênero em atuar por outras vias da promoção de crescimento vegetal, como solubilização de P, tolerância à salinidade e adaptabilidade a diferentes faixas de pH (MUKHERJEE et al., 2020; DURAN-BEDOLLA et al., 2021; LIU et al., 2022).

É interessante que bactérias que componham um inoculante apresentem boa adaptabilidade a condições ambientais adversas. Por exemplo, *Klebsiella* sp PS19 isolada da rizosfera de mostrada foi capaz de solubilizar quantidades consideráveis de fosfato inorgânico mesmo na presença de doses altas de inseticidas (AHEMAD; KHAN, 2011).

Vale ressaltar que o pH do biochar é alcalino e que adaptabilidade a distintas faixas pH pelas estirpes testadas pode também ter contribuído para o sinergismo entre o inoculante e o biochar para algumas variáveis testadas. O contrário também foi observado. A baixa competitividade de *Pseudomonas* pode estar associada ao fato de biochars promoverem ambientes alcalinos e estas bactérias preferirem ambientes ácidos (GARBEVA et al., 2004).

Parâmetros de crescimento vegetal e de P no solo são índices importantes para avaliar o efeito da aplicação de inoculantes bacterianos solubilizadores de P e biochar no crescimento das plantas e na disponibilidade deste nutriente no solo. Neste trabalho, foi possível observar a relevância de se testar diferentes fontes de biochar e diferentes combinações de bactérias solubilizadoras de P, pois as diferentes composições refletiram em respostas distintas às variáveis analisadas. Por exemplo, em relação ao diâmetro de colmo, o valor referente ao biochar PA e o consórcio entre as duas estirpes testadas apresentaram valores similares ao controle, enquanto bactérias utilizadas separadamente com o mesmo biochar apresentaram valores superiores à testemunha. Já com a utilização do biochar UB, nos diferentes níveis do inóculo, não foi observado diferenças significativas entre os tratamentos testados. Estes dados demonstram que há combinações que podem ser promissoras ou neutras para o crescimento da cultura.

A combinação de PA com B1 foi a mais promissora frente às variáveis de P e RBS no solo, quando comparada aos demais tratamentos (Figura 25-32). No entanto, este comportamento não foi observado de forma clara em face aos parâmetros de crescimento vegetal (Figuras 22 e 23). Em algumas condições, a presença de biochar não incrementou os efeitos benéficos mediados pela inoculação. Inclusive, os valores de diâmetro do colmo foram menores no tratamento B3 com PA em face à inoculação destas mesmas bactérias na ausência de PA e dentre os diferentes níveis de inóculo para este mesmo biochar (PA). Então, apesar de mudanças expressivas sobre as variáveis do solo analisadas por PA com B1, não se observou um efeito pronunciado do mesmo tratamento sobre incrementos ao crescimento do milho como nas variáveis do solo.

Não deve ser descartado que diferenças estruturais do biochar também afetem a resposta da planta na presença do inoculante. Logo, a aplicação do biochar em sementes inoculadas pode ter efeito sobre a planta e microrganismos, bem como sobre a interação de ambos. Algo semelhante é observado em plantas que receberam a aplicação de substâncias húmicas. Uma revisão de Nardi et al. (2021) descreveu que a aplicação de substâncias húmicas pode influenciar a aquisição de nutrientes das plantas através do aumento da exsudação radicular e por conseguinte, na liberação de ácidos orgânicos. Tais compostos favorecem as interações da planta com microrganismos benéficos da rizosfera, e consequentemente o crescimento vegetal (NARDI et al., 2021).

Zheng et al. (2019) observaram que a aplicação de biochar aumentou a abundância da comunidade bacteriana solubilizadora de P, o crescimento de colza e a absorção de fosfato, sendo que o conteúdo de P disponível do biochar foi mais relevante que o pH do solo para a estrutura dessa comunidade, indicando que o material do biochar é crítico para a sobrevivência e funcionamento dessa comunidade (ZHENG et al., 2019).

Sendo assim, é possível que os efeitos observados sobre as variáveis do solo estejam atrelados ao papel destes bioestimulantes sobre o enriquecimento de bactérias que contribuem para a disponibilidade de nutrientes no solo. Ou, o biochar pode ter potencializado a ação das estirpes inoculadas frente à biodisponibilidade de P.

Tecnologias que reduzam a velocidade de exploração de um recurso finito como o P através de soluções práticas que melhorem sua eficiência e aproveitamento no campo, e também o reaproveitamento de “subprodutos” provenientes da indústria, pode ser o ponto de partida para uma maior autonomia do Brasil na produção de alimentos com menor dependência externa de insumos minerais provenientes de outros países.

## 5.7 CONCLUSÕES

A associação de fontes de biochar com bactérias do gênero *Klebsiella aerogenes*, demonstraram diferentes interações com a planta e solo.

A combinação de inóculo e biochar foi benéfica ao crescimento de plantas de milho, onde o tratamento com mix de bactérias e biochar de uva branca demonstrou o maior diâmetro do colmo e altura da primeira espiga.

As plantas que receberam inoculação apresentaram alturas totais superiores às plantas sem inoculação.

O tratamento B1 (UACG17) associado ao biochar palha de arroz, aplicado às sementes de milho, aumentou as frações lábeis, moderadamente lábeis e não lábil de P no solo, além de aumentar a atividade das enzimas fosfatases ácida e alcalina e a respiração basal do solo.

Não foram observados efeitos da inoculação com relação as variáveis de produção do milho verde (número de espigas comerciais, número total de espigas e peso de espiga).

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

As bactérias solubilizadoras de fosfato possuem um importante papel nos ecossistemas, se tornando um recurso a ser explorado em sistemas agrícolas bem como em condições adversas, como alternativa para otimização da utilização de insumos e consequentemente redução de impactos ambientais e aumento de ganhos econômicos.

A utilização das bactérias associadas a biochars, demonstraram interações e efeitos distintos com relação as plantas de milho e no solo, além de não causarem efeitos negativos aos mesmos.

De maneira geral, os resultados obtidos indicam que os tratamentos que foram inoculados com as bactérias associadas ou não aos biochars, obtiveram ganhos superiores ao controle com relação aos parâmetros fitotécnicos e de solo, com destaque para o isolado B1 com o biochar de palha de arroz para o experimento em casa de vegetação.

Da mesma forma, o tratamento B1 com biochar de palha de arroz teve destaque para as variáveis analisadas em campo, aumentando as frações de fósforo lábil, microbiano, solúvel em meio ácido, solúvel em meio básico além das enzimas fofatases ácida e alcalina e a respiração basal do solo.

Não foram observados ganhos com relação as variáveis de produção do milho (número de espigas comerciais, número total de espigas e peso de espiga).

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMER, M.; SHAABAN, M.; HASSAN, M. U.; GUOQIN, H.; YING, L.; YING, T. H.; RASUL, F.; QIAOYING, M.; ZHUANLING, L.; RASHEED, A.; PENG, Z. Biochar mitigates the N<sub>2</sub>O emissions from acidic soil by increasing the nosZ and nirK gene abundance and soil pH. *J. Environ. Manage.*, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109891>
- ABBOTT, S. L. *Klebsiella, enterobacter, citrobacter, serratia, plesiomonas* and other enterobacteriaceae. Manual of clinical microbiology, p. 639-657, 2011.
- ABIVEN, S.; SCHMIDT, M. W. I.; LEHMANN, J. Biochar by design. *Nature Geoscience*, v. 7, n. 5, p. 326-327, 2014.
- AFZAL, A., BANO, A. *Rhizobium* and phosphate solubilizing bacteria improve the yield and phosphorus uptake in wheat (*Triticum aestivum*). *Int J Agric Biol.*, 10(1), 85-88, 2008.
- AHEMAD, M. Phosphate-solubilizing bacteria-assisted phytoremediation of metalliferous soils: a review. *3. Biotech.*, 5(2), 111–121, 2015. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0206-0>
- AHEMAD, M.; KHAN, M. S. Effects of insecticides on plant-growth-promoting activities of phosphate solubilizing rhizobacterium *Klebsiella* sp. strain PS19. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 100, n. 1, p. 51-56, 2011.
- AHMED, H. F. S.; El-ARABYV, M. M. I. Evaluation of the influence of nitrogen fixation, phosphate solubilization and potassium mobilization biofertilizers on the growth, yield and fatty acid constituents of peanut and sun flower oil. *Afr. J. Biotechnol.*, v. 11, p. 10079 – 10088, 2012.
- AKHTAR, N.; IQBAL, A.; QURESHI, M. A.; KHAN, K. H. Effect of phosphate solubilizing bacteria on the phosphorus availability and yield cotton (*Gossypium hirsutum*). *Journal of Scientific Research*, 40(1), 15–24, 2010.
- AKOTO-DANSO, E. K.; MANKA'ABUSI, D.; STEINER, C.; WERNER, S.; HÄRING, V.; NYARKO, G.; MARSCHNER, B. DRESHEL, P.; BUERKERT, A. Agronomic effects of biochar and wastewater irrigation in urban crop production of Tamale, northern Ghana. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, v. 115, n. 2, p. 231-247, 2019.
- ALAM, S., KHALIL, S., AYUB, N., RASHID, M. In vitro solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere. *Int J Agric Biol.*, 4(4), 454-458, 2002.
- AMEEN, F.; ALYAHYA, S. A.; ALNADHARI, S.; ALASMARI, H.; ALHOSHANI, F. WAINWRIGHT, M. Phosphate solubilizing bacteria and fungi in desert soils: species, limitations and mechanisms. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 65(10), 1446–1459, 2019. <https://doi.org/10.1080/03650340.2019.1566713>
- AMOAH-ANTWI, C.; KWIATKOWSKA-MALINA, J.; THORNTON, S. F.; FENTON, O.; MALINA, G.; SZARA, E. Restoration of soil quality using biochar and brown coal waste: A review. *Science of the Total Environment*, 722, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137852>

ANDERSON, C. R.; CONDRON, L. M.; CLOUGH, T. J.; FIERS, M.; STEWART, A.; HILL, R. A.; SHERLOCK, R. R. Biochar induced soil microbial community change: implications for biogeochemical cycling of carbon, nitrogen and phosphorus. *Pedobiologia*, 54(5-6), 309-320, 2011.

ANDRADE, V. D. C. Enterobacteriales no litoral de São Paulo: diversidade, resistência e sua relação com a contaminação por efluentes. 2020. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2020.

ANILLO, H. J. B.; ZENTELLA, M. L. C.; SIERRA, G. T. *Burkholderia tropica* Una Bacteria Con Gran Potencial Para Su Uso En La Agricultura. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 19, 102–108, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2016.06.003>

ANLAUF, A. An extractive bioeconomy? Phosphate mining, fertilizer commodity chains, and alternative technologies. *Sustainability Science*, 18(2), 633-644, 2023.

ARAÚJO NETO, L. J. D. Resposta de indicadores biológicos edáficos de caatinga impactadas pela exploração de madeira. Universidade federal de Campina Grande, 2013.

ARAUJO, A. S. Biochar de lodo de esgoto e *Trichoderma afroharzianum* no controle de fungos fitopatogênicos. 2022. 160 f., il. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade de Brasília, Brasília. 2022.

ARAÚJO, F. F. Seed inoculation with *Bacillus subtilis*, formulated with oyster meal and growth of corn, soybean and cotton. *Ciência e Agrotecnologia*, 32(2), 456–462, 2008.

ARAÚJO, M. S. B.; SCHAEFER, C. E. G. R.; SAMPAIO, E. V. S. B. Frações de fósforo após extrações sucessivas com resina e incubação, em Latossolos e Luvissolos do semi-árido de Pernambuco. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 28, n. 2, p. 259-268, 2004.

ARAÚJO, R. M. Uso de resíduos na agricultura familiar de base ecológica: efeitos na qualidade do solo e no desempenho agronômico do feijoeiro. 2018.

ARIF, M.; ILYAS, M.; RIAZ, M.; ALI, K.; SHAH, K.; HAQ, I. U.; FAHAD, S. Biochar improves phosphorus use efficiency of organic-inorganic fertilizers, maize-wheat productivity and soil quality in a low fertility alkaline soil. *Field Crops Research*, 214, 25-37, 2017.

ARORA, N. K.; MISHRA, J. Prospecting the roles of metabolites and additives in future bioformulations for sustainable agriculture. *Applied Soil Ecology*, 107, 405-407. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.05.020>

ARRUDA, L. M. Seleção e caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de milho cultivadas no Rio Grande do Sul. 2012.

ATKINSON, C. J.; FITZGERALD, J. D.; HIPPS, N. A. Potential mechanisms for achieving agricultural benefits from biochar application to temperate soils: a review. *Plant and soil*, v. 337, n. 1, p. 1-18, 2010.

BACKER, R., ROKEM, J. S., ILANGUMARAN, G., LAMONT, J., PRASLICKOVA, D., RICCI, E., ... & SMITH, D. L. Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of

action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in plant science*, 9, 1473, 2018.

BAGYALAKSHMI, B.; PONMURUGAN, P.; BALAMURUGAN, A. Potassium solubilization, plant growth promoting substances by potassium solubilizing bacteria (KSB) from southern Indian Tea plantation soil. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12, 116–124, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.09.011>

BAHADIR, P. S.; LIAQAT, F.; ELTEM, R. Plant growth promoting properties of phosphate solubilizing *Bacillus* species isolated from the Aegean Region of Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 42(2), 183–196, 2018. <https://doi.org/10.3906/bot-1706-51>

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. *Applied Soil Ecology*, v. 29, n. 1, p. 73-83, 2005.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R. Superior polymeric formulations and emerging innovative products of bacterial inoculants for sustainable agriculture and the environment. In: SINGH, H., SARMA, B., KESWANI, C. (eds) *Agriculturally Important Microorganisms*. Springer, Singapore. pp 15–46. 2016. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-2576-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-10-2576-1_2)

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J. P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil*, 378, 1–33, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>

BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Canadian Journal of Microbiology*, 36(9), 591–608, 1990. <https://doi.org/10.1139/m90-105>

BATISTA, E. S. Mineralogia e fósforo disponível em solos do Vale do Jari. Embrapa Amapá-Tese/dissertação (ALICE), 2020.

BATISTA, F. D. C.; FERNANDES, T. A.; ABREU, C. S.; OLIVEIRA, M. C.; RIBEIRO, V. P.; GOMES, E. A.; OLIVEIRA-PAIVA, C. A. Potencial de microrganismos rizosféricos e endofíticos de milho em solubilizar o fosfato de ferro e produzir sideróforos, 2018.

BEHERA, B. C.; SINGDEVSACHAN, S. K.; MISHRA, R. R.; DUTTA, S. K.; THATOI, H. N. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganisms in mangrove- a review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3, 97–110. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.008>

BELHARDI, D.; LAJUDIE, P.; RAMDANI, N.; ROUX, C. L.; BOULILA, P.; TISSEYRE, P.; BOULILA, A.; BENGUEDOUAR, A.; KACI, Y.; LAGUERRE, G. *Vicia faba* L. in the Bejaia region of Algeria is nodulated by *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae*, *Rhizobium laguerreae* and two new genospecies. *Systematic and Applied Microbiology*, 41, 122–130. 2018.

BERNABEU, P. R., GARCÍA, S. S., GARCIA FERREYRA, G., GUIDI, V. I., GALAR, M. L., BOIARDI, J. L., LUNA, M. F. Mineral phosphate solubilization in *Burkholderia tropica* involves an inducible PQQ-glucose dehydrogenase, 2016.

BEZERRA, R. P. M.; LOSS, A.; PEREIRA, M. G.; PERIN, A. Frações de fósforo e correlação com atributos edáficos sob sistemas de plantio direto e integração lavoura-pecuária no Cerrado Goiano. Semina: Ciências Agrárias, 36(3), 1287-1306, 2015.

BINDRABAN, P. S.; DIMKPA, C. O.; PANDEY, R. Exploring phosphorus fertilizers and fertilization strategies for improved human and environmental health. *Biology and Fertility of Soils*, 56(3), 299-317, 2020.

BOJKOV V. N.; VASSILEVA, M. H.; MARTOS NÚÑEZ, M. V.; GARCÍA DEL MORAL GARRIDO, L. F.; KOWALSKA, J.; TYLKOWSKI, B.; MALUSA, E. Formulation of Microbial Inoculants by Encapsulation in Natural Polysaccharides: Focus on Beneficial Properties of Carrier Additives and Derivatives, 2020.

BORHAM, A., BELAL, E., METWALY, M. Phosphate solubilization by *Enterobacter cloacae* and its impact on growth and yield of wheat plants. *Journal of Sustainable Agricultural Sciences*, 43(2), 89-103, 2017.

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

BRAGA, J. M.; DEFELIPO, B. V. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extrato de solo e material vegetal. *Rev. Ceres*, Viçosa, v. 21, n. 1, p. 73-85, 1974.

BRASIL, E. C.; DANTAS, R. C. R.; DA HUNGRIA, L. C.; DOS SANTOS, D. G.; VIEIRA, M. E., FERREIRA, J. N. Formas de fósforo lábil em solos sob diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia, 2014.

BROOKES, P. C. POWLSON, D. S. JENKINSON, D. S. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, v. 14, p. 319-329, 1982.

BROWN, R. Biochar Production Technology. In: JOSEPH, J. L. A. S. (Ed.). *Biochar for Environment Management – Science and Technology*. London, United Kingdom: Earthscan, cap. 8, p. 127-146, 2010.

BURNS, R. G.; DICK, R. P. (Ed.). *Enzymes in the environment activity, ecology, and applications*. CRC Press, 2002.

BUTNAN, S.; DEENIK, J. L.; TOOMSAN, B.; ANTAL, M. J.; VITYAKON, P. Biochar characteristics and application rates affecting corn growth and properties of soils contrasting in texture and mineralogy. *Geoderma*, 237, 105–116, 2015. [https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2014.08.010 2015](https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2014.08.010).

CAMARGO, F. A. O.; SANTOS, G. DE A.; ZONTA, E. Alterações eletroquímicas em solos inundados. *Ciência Rural*, v. 29, n. 1, p. 171-180, 1999.

CARDOSO, E. J. B. N.; ESTRADA-BONILLA, G. A. Inoculantes agrícolas. *Biotecnologia Industrial: Processos fermentados e enzimáticos*. Blucher, São Paulo, 2019.

CARVALHO, M. T. M; MAIA, A. H. N; MADARI, B. E.; BASTIAANS, L.; VAN OORT, P. A. J. Biochar increases plant available water in a sandy soil under an aerobic rice cropping system. *Solid Earth*, v. 5, n. 1, p. 939-952, 2014. Available in: doi: 10.5194/sed-6-887, 2014.

CASARIN, V.; STIPP, S. R. Quatro medidas corretas que levam ao uso eficiente dos fertilizantes. *Informações Agronômicas*, 142, 14-20, 2013.

CHABOT, R.; ANTON, H.; CESCAS, M. C. Growth promotion of maize and lettuce by *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli phosphate solubilizer. *Plant Soil*, v. 184, p 311 – 321, 1996.

CHAGAS JUNIOR, A. F., OLIVEIRA, L. A. D., OLIVEIRA, A. N. D., ANDRÉ, L. W. Phosphate solubilizing ability and symbiotic efficiency of isolated Rhizobia from Amazonian soils. Volume 32, Número 2, Pags. 359-366, 2010.

CHAGAS, L. F. B.; MARTINS, A. L. L.; DE CARVALHO FILHO, M. R.; DE OLIVEIRA MILLER, L.; DE OLIVEIRA, J. C.; JUNIOR, A. F. C. *Bacillus subtilis* and *Trichoderma* sp. in biomass increase in soybean, beans, cowpea, corn and rice plants. *Agri-Environmental Sciences*, 3(2), 10–18, 2017.

CHEN, Y. C. Y.; YANG, H. Y. H.; WANG, X. W. X.; ZHANG, S. Z. S.; CHEN H. C. H. Biomass-based pyrolytic polygeneration system on cotton stalk pyrolysis: influence of temperature, 2012.

CHEN, M.; ALIM, N.; ZHANG, Y.; XU, N.; CAO, X. Contrasting effects of biochar nanoparticles on the retention and transport of phosphorus in acidic and alkaline soils. *Environmental Pollution*, 239, 562–570, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.050>

CHEN, Y. P., REKHA, P. D., ARUN, A. B., SHEN, F. T., LAI, W. A., YOUNG, C. C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied soil ecology*, 34(1), 33-41, 2006.

CHENG, J.; ZHUANG, W.; LI, N. N.; TANG, C. L.; YING, H. J. Efficient biosynthesis of d-ribose using a novel co-feeding strategy in *Bacillus subtilis* without acid formation. *Letters in Applied Microbiology*, 64(1), 73–78, 2017. <https://doi.org/10.1111/lam.12685>

CHINTALA, R.; SCHUMACHER, T. E.; MCDONALD, L. M.; CLAY, D. E.; MALO, D. D.; PAPIERNIK, S. K.; CLAY, S. A.; JULSON, J. L. Phosphorus sorption and availability from biochars and soil/biochar mixtures. *Clean–Soil, Air, Water*, 42(5), 626–634, 2014. <https://doi.org/10.1002/clen.201300089>

CISNEROS-ROJAS, C. A.; SÁNCHEZ-DE PRAGER, M.; MENJIVAR-FLORES, J. C. Efecto de bacterias solubilizadoras de fosfatos sobre el desarrollo de plántulas de café. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 149–158, 2017. <https://doi.org/10.15517/am.v28i1.22021>

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

CORTÉS-PATIÑO, S.; BONILLA, R. R. Polymers selection for a liquid inoculant of *Azospirillum brasiliense* based on the Arrhenius thermodynamic model. African Journal of Biotechnology, 14(33), 2547–2553, 2015. <https://doi.org/10.5897/ajb2015.14777>

COSTA, A. R. Formas de fósforo do solo em sítios de terra preta arqueológica na Amazônia Oriental. Dissertação, UFRA-PA, 2011.

COSTA, E. M. D., NÓBREGA, R. S. A., CARVALHO, F. D., TROCHMANN, A., FERREIRA, L. D. V. M., MOREIRA, F. M. D. S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 48, 1275-1284, 2013.

DA SILVA, E. E.; DE AZEVEDO, P. H. S.; DE-POLLI, H. Determinação da respiração basal (RBS) e quociente metabólico do solo (qCO<sub>2</sub>), 2007.

DAI, Z.; MENG, J.; MUHAMMAD, N.; LIU, X.; WANG, H.; HE, Y.; XU, J. The potential feasibility for soil improvement, based on the properties of biochars pyrolyzed from different feedstocks. Journal of Soils and Sediments, 13, 989-1000, 2013.

DAMO, J. L. C.; RAMIREZ, M. D. A.; AGAKE, S. I.; PEDRO, M.; BROWN, M.; SEKIMOTO, H.; OHKAMA-OHTSU, N. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from paddy field soils in Japan. Microbes and Environments, 37(2), ME21085, 2022.

DEAKER, R.; LÁSZLÓ, M.; ROSE, M. T.; AMPRAYN, K.; GANISAN, K.; TRAN, T. K. C.; NGA, V. T.; CONG, P. T.; HIEN, M. T.; KENNEDY, I. R. Practical methods for the quality control of inoculant biofertilisers. Centre for International Agricultural Research, Australian, 2011.

DEAKER, R.; ROUGHLEY, R. J.; KENNEDY, I. R. Legume seed inoculation technology-a review. Soil Biology & Biochemistry, 36(8), 1275-1288, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.04.009>

DEBODE, J.; EBRAHIMI, N.; D'HOSE, T.; CREMELIE, P.; VIAENE, N.; VANDECASSELE, B. Has compost with biochar added during the process added value over biochar or compost to increase disease suppression? Applied Soil Ecology, 153, 103571, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103571>

DELVASTO, A.; VALVERDE, A.; BALLESTER, J. M.; IGUAL, J. A.; MUÑOZ, F.; GONZALEZ, M. L.; BLAZQUEZ, C.; GARCIA. Characterization of brushite as a recrystallization product formed during bacterial solubilization of hydroxyapatite in batch cultures. Soil Biol. Biochem., v. 38, n. 9, p. 2645-2654, 2006.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbiosis in tropical grass: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. Symposium on Nitrogen Fixation, Washington State Univ Press, 1976.

DONATO, A.; MAIA, T. F.; CONTO, T. D.; PEREIRA, M. G.; FRAGA, M. E. Microbiota produtora de fitase isolada de solo e serapilheira do Bioma Cerrado. Ciência Florestal, 29(3), 1270–1281, 2019. <https://doi.org/10.5902/1980509815586>

DU, J.; ZHANG, Y.; QU, M.; YIN, Y.; FAN, K.; HU, B.; ZHANG, H.; WEI, M.; MA, C. Effects of biochar on the microbial activity and community structure during sewage sludge composting. *Bioresource Technology*, 272, 171–179, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.10.020>

DUDA, G. P. Conteúdo de fósforo microbiano, orgânico e biodisponível em diferentes classes de solo, UFRRJ-RJ, 2000.

DURAN-BEDOLLA, J., GARZA-RAMOS, U., RODRÍGUEZ-MEDINA, N., AGUILAR VERA, A., BARRIOS-CAMACHO, H. Exploring the environmental traits and applications of *Klebsiella variicola*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1-13, 2021.

DWORZANSKI, J. P.; DESHPANDE, S. V.; CHEN, R.; JABBOUR, R. E.; SNYDER, A. P.; WICK, C. H.; LI, L. Mass spectrometry-based proteomics combined with bioinformatic tools for bacterial classification. *Journal of Proteome Research*, 5(1), 76–87, 2006. <https://doi.org/10.1021/pr050294t.s001>

EIVAZI, F., TABATABAI, M. A. Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 20(5), 601-606, 1988.

EIVAZI, F.; TABATABAI, M. A. Phosphatases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 9(3), 167-172, 1977.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Dependência externa de fertilizantes NPK é debatida em Audiência Pública. *Embrapa Notícias*, 2017.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Milho em números (safra 2013/2014). Londrina, 2015. Disponível em: [Primeiro passo para o sucesso no milho é escolher a semente correta para o plantio - Portal Embrapa](#). Acesso em: 23 jul. 2021.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Sistemas diferenciais de cultivo do milho verde. Embrapa Agência de Informação, 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/milho/producao/sistemas-diferenciais-de-cultivo/milho-verde>

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Production crops, 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> Acesso em: 20 maio 2021.

FLORENTINO, L. A.; SILVA, A. B.; LANDGRAF, P. R.; SOUZA, F. R. Inoculação de bactérias produtoras de ácido 3-indol acético em plantas de alface (*Lactuca sativa* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 11(1), 89–96, 2017. <https://doi.org/10.17584/rcch.2017v11i1.5780>

FOLTRAN, E. C.; ROCHA, J. H. T.; BAZANI, J. H.; DE MORAES GONCALVES, J. L.; RODRIGUES, M.; PAVINATO, P.; GARCIA-MINA, J. M. Phosphorus pool responses under different P inorganic fertilizers for a eucalyptus plantation in a loamy Oxisol. *Forest Ecology and Management*, 435, 170-179, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.10.053>

FRANÇA, R. F.; DE MEDEIROS, E. V.; SILVA, R. O.; DA SILVA FAUSTO, R. A.; DE SOUZA, C. A. F.; DE OLIVEIRA, J. B.; ARAÚJO, A. P. Perspectives for Biochar as a vehicle

for inoculation of phosphate solubilizing bacteria: a review. Research, Society and Development, 11(1), e36211124885-e36211124885, 2022.

FRANCHINI, J. C.; CRISPINO, C. C.; SOUZA, R. A.; TORRES, E.; HUNGRIA, M. Microbiological parameters as indicators of soil quality under various soil management and crop rotation systems in southern Brazil. Soil and Tillage Research, 92(1-2), 18–29, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.still.2005.12.010>

GAHOONIA, T. S.; CLAASSEN, N.; JUNGK, A. Mobilization of phosphate in different soils by ryegrass supplied with ammonium or nitrate. Plant and Soil, v. 140, n. 2, p. 241-248, 1992.

GALINDO, F. S.; TEIXEIRA FILHO, M.; BUZETTI, S., LUDKIEWICZ, M. G.; ROSA, P. A.; TRITAPEPE, C. A. Technical and economic viability of co-inoculation with *Azospirillum brasilense* in soybean cultivars in the Cerrado. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, 22(1), 51–56, 2018. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v22n1p51-56>

GALVANI, R. Fracionamento de fósforo inorgânico no solo em função de fontes de fósforo na soja cultivada em semeadura direta. In: Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas. Anais, 2004.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. Assessment of the diversity, and antagonism towards *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes. FEMS Microbiology Ecology, v. 47, n. 1, p. 51-64, 2004.

GATIBONI, L. C.; KAMINSKI, J.; RHEINHEIMER, D. dos S.; FLORES, J. P. C. Bioavailability of soil phosphorus forms in no tillage system. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 31, n. 4, p.691–699. 2007.

GAUR, A. C.; ARORA, D.; PRAKASH, N. Electron microscopy of some rock phosphate dissolving bacteria and fungi. Folia microbiologica, v. 24, p. 314-317, 1979.

GHADERI, A., ALIASGHARZAD, N., OUSTAN, S., OLSSON, P. A. Efficiency of three *Pseudomonas* isolates in releasing phosphate from an artificial variable-charge mineral (iron III hydroxide). Soil Environ, 27(1), 71-76, 2008.

GIAGNONI, L.; MAIENZA, A.; BARONTI, S.; VACCARI, F. P.; GENESIO, L.; TAITI, C.; RENELLA, G. Long-term soil biological fertility, volatile organic compounds and chemical properties in a vineyard soil after biochar amendment. Geoderma, v. 344, p. 127-136, 2019.

GŁĄB, T.; ŻABIŃSKI, A.; SADOWSKA, U.; GONDEK, K.; KOPEĆ, M.; MIERZWA-HERSZTEK, M.; STANEK-TARKOWSKA, J. Fertilization effects of compost produced from maize, sewage sludge and biochar on soil water retention and chemical properties. Soil and Tillage Research, 197, 104493, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.still.2019.104493>

GOMES, O. M. T.; GORESTEIN, M. R.; TATEYAMA, G. H. Diferentes doses de adubação de cobertura em milho (*Zea Mays L.*) com sulfato de amônio farelado. Revista Científica Eletrônica de Agronomia, v. 5, n. 10, p. sn, 2010.

GRANT, C. A.; FLATEN, D. N.; TOMASIEWICZ, D. J.; SHEPPARD, S. C. A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. *Informações Agronômicas*, n. 95, Piracicaba, Instituto Potafós, 2001.

GRANT, M. J., BOOTH, A. A typology of reviews: an analysis of 14 review types and associated methodologies. *Health information & libraries journal*, 26(2), 91-108, 2009.

GUERRA, J. G. M. Produção sazonal de *Brachiaria decumbens* Stapf., conteúdo de fósforo orgânico e microbiano em solos tropicais de baixa fertilidade natural 234f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1993.

GUERRA, J. G. M.; FONSECA, M. C.; ALMEIDA, D. L.; DE-POLLI, H.; FERNANDES, M. S. Conteúdo de fósforo da biomassa microbiana de um solo cultivado com *Brachiaria decumbens* Stapf. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 30. p. 543-551, 1995.

GUPTA, M.; KIRAN, S.; GULATI, A.; SINGH, B.; TEWARI, R. Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of *Aloe barbadensis* Miller. *Microbiological Research*, 167(6), 358–363, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.02.004>

HAJJAM, Y.; CHERKAOUI, S. The influence of phosphate solubilizing microorganisms on symbiotic nitrogen fixation: Perspectives for sustainable agriculture. *Journal of Materials Science*, 8(3), 801–808, 2017.

HALE, L.; LUTH, M.; CROWLEY, D. Biochar characteristics relate to its utility as an alternative soil inoculum carrier to peat and vermiculite. *Soil Biology & Biochemistry*, 81, 228–235, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.11.023>

HERATH, H. M. L. I.; MENIKDIWELA, K. R.; IGALAVITHANA, A. D.; SENEVIRATNE, G. Developed fungal-bacterial biofilms having nitrogen fixers: Universal biofertilizers for legumes and non-legumes. *Biological Nitrogen Fixation*, 2(2), 1041-1046, 2015.

HOU, E.; LUO, Y.; KUANG, Y.. Global meta-analysis shows pervasive phosphorus limitation of aboveground plant production in natural terrestrial ecosystems. *Nat. Commun.* 11, 637, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14492-w>

HOWIESON, J. G.; DILWORTH, M. J. Working with rhizobia. Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australian, 2016.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, R. J.; GRAHAM, P. H. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment*, 25–42, 2005. <https://doi.org/10.1007/1-4020-3544-63>

HUSNA, N.; BUDIANTA, D.; NAPOLEON, A. Evaluation of several biochar types as inoculant carrier for indigenous phosphate solubilizing microorganism from acid sulphate soil. *Journal of Ecological Engineering*, 20(6), 1-8, 2019. <https://doi.org/10.12911/22998993/109078>

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento sistemático da produção agrícola, 2019. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil.2019>. Acesso em: 22 de mai. de 2021.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Safra recorde no ano de 2022. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/33998-em-maio-ibge-preve-safra-recorde-de-263-0-milhoes-de-toneladas-para-2022>

IPA - Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária. Recomendações de Adubação para o Estado de Pernambuco (2<sup>a</sup> Aproximação). 2.ed. Recife: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, 198p, 2008.

IPA – Sementes crioulas e a resistência no Agreste pernambucano, 2020. Disponível em: <http://www.ipa.br/novo/noticia?n=2294>

IRFAN, M.; ZAHIR, A. Z.; ASGHAR, H. N.; KHAN, M. Y.; AHMAD, H. T.; ALI, Q. Effect of multi-strain bacterial inoculation with different carriers on growth and yield of maize under saline conditions. International Journal of Agriculture and Biology, 22, 1407–1414, 2019.

JORQUERA, M. A.; HERNÁNDEZ, M. T.; RENGEL, Z.; MARSCHNER, P.; DE LA LUZ MORA, M. Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. Biology and Fertility of Soils, 44(8), 1025, 2008. <https://doi.org/10.1007/s00374-008-0288-0>

KALAYU, G. Phosphate solubilizing microorganisms: promising approach as biofertilizers. International Journal of Agronomy, 2019(1), 4917256, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4917256>

KANG, S. M.; JOO, G. J.; HAMAYUN, M.; NA, C. I.; SHIN, D. H.; KIM, H. Y.; HONG, J. K.; LEE, I. J. Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. Biotechnology Letters, 31(2), 277–281, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9867-2>

KEJELA, T. Phytohormone-Producing Rhizobacteria and Their Role in Plant Growth. Intech Open, 2024. doi: 10.5772/intechopen.1002823

KHAN, A. A.; JILANI, G.; AKHTAR, M. S.; NAQVI, S. M. S.; RASHEED, M. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. J. Agric. Biol. Sci. 1(1):48-58, 2009.

KHAN, T. F.; AHMED, M. M.; HUQ, S. M. I. Effects of biochar on the abundance of three agriculturally important soil bacteria. Journal of Agricultural Chemistry and Environment, 3(02), 31, 2014.

KHOSO, M. A.; WAGAN, S.; ALAM, I.; HUSSAIN, A.; ALI, Q.; SAHA, S.; POUDEL, T. R.; MANGHWAR, H.; LIU, F. Impact of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on plant nutrition and root characteristics: Current perspective. Plant Stress, Volume 11, 100341, ISSN 2667-064X, 2024.

KHUMAIRAH; F. H.; SETIAWATI, M. R.; FITRIATIN, B. N.; SIMARMATA, T.; ALFARAJ, S.; ANSARI, M. J.; NAJAFI, S. Halotolerant plant growth-promoting rhizobacteria isolated from saline soil improve nitrogen fixation and alleviate salt stress in rice plants. *Frontiers in Microbiology*, 13, 905210, 2022.

KOCHANEK, J.; SOO, R. M.; MARTINEZ, C.; DAKUIDREKETI, A.; MUDGE, A. M. Biochar for intensification of plant-related industries to meet productivity, sustainability and economic goals: A review. *Resources, Conservation and Recycling*, 179, 106109, 2022.

KOCHIAN, L. V. Rooting for more phosphorus. *Nature*, v. 488, n. 7412, p. 466-467, 2012. KUCEY, R. M. N.; JANZEN, H. H.; LEGGETT, M. E. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Advances in Agronomy*, 42, 199-228, 1989. [https://doi.org/10.1016/s0065-2113\(08\)60525-8](https://doi.org/10.1016/s0065-2113(08)60525-8)

KUMAR, A. Phosphate solubilizing bacteria in agriculture biotechnology: diversity, mechanism and their role in plant growth and crop yield. *International Journal of Advanced Research*, 4(5), 116–124, 2016. <https://doi.org/10.21474/ijar01/111>

KUMAR, A., KUMAR, A., PATEL, H. Role of microbes in phosphorus availability and acquisition by plants. *International journal of current microbiology and applied Sciences*, 7(5), 1344-1347, 2018.

KUMAR, C., WAGH, J., ARCHANA, G., NARESH KUMAR, G. Sucrose dependent mineral phosphate solubilization in *Enterobacter asburiae* PSI3 by heterologous overexpression of periplasmic invertases. *World journal of microbiology and biotechnology*, 32, 1-10, 2016.

KUSALE, S. P.; ATTAR, Y. C.; SAYYED, R. Z.; EL ENSHASY, H.; HANAPI, S. Z.; ILYAS, N.; MARRAIKI, N. Inoculation of *Klebsiella variicola* alleviated salt stress and improved growth and nutrients in wheat and maize. *Agronomy*, 11(5), 927, 2021.

LANDAU, E. C.; HIRSCH, A.; GUIMARÃES, D. P.; MOURA, L.; SANTOS, A. H.; NERY, R. N. Variação geográfica da produção de grãos e principais culturas agrícolas no Brasil em 2013. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, Documentos, 182. 143 p. il, 2015.

LARA, N.; FIGUEROA, L.; CARVAJAL, F.; ZAPATA, Y.; URBINA, C.; ESCOBAR, H. Quantitative differentiation between soil organic carbon and biochar carbon in Aridisols. *International Journal of Agriculture and Natural Resources*, 40(2), 387-395, 2013. <https://doi.org/10.4067/s0718-16202013000200013>

LEE, K. E.; ADHIKARI, A.; KANG, S. M.; YOU, Y. H.; JOO, G. J.; KIM, J. H.; KIM, S. J.; LEE, I. J. Isolation and Characterization of the High Silicate and Phosphate Solubilizing Novel Strain *Enterobacter ludwigii* GAK2 that Promotes Growth in Rice Plants. *Agronomy* 9(3), 144-155, 2019. <https://doi.org/10.3390/agronomy9030144>

LEHMANN, J.; JOSEPH, S. Biochar for environmental management: science and technology. *Earthscan*, 1, 1-12, 2009.

LEHMANN, J.; RILLIG, M. C.; THIES, J.; MASIELLO, C. A.; HOCKADAY, W. C.; CROWLEY, D. Biochar effects on soil biota – a review. *Soil biology and biochemistry*, 43(9), 1812-1836, 2011.

LI, H.; DONG, X.; DA SILVA, E. B.; DE OLIVEIRA, L. M., CHEN, Y.; MA, L. Q. Mechanisms of metal sorption by biochars: biochar characteristics and modifications. *Chemosphere*, 178:466-478, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.072>

LI, S.; WANG, S.; FAN, M.; WU, Y. SHANGGUAN, Z. (2020). Interactions between biochar and nitrogen impact soil carbon mineralization and the microbial community. *Soil and Tillage Research*, 196, 104437, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.still.2019.104437>

LIANG, B.; LEHMANN, J.; SOLOMON, D.; KINYANGI, J.; GROSSMAN, J.; O'NEILL, B. J. O. J. F. J. J. E. G.; NEVES, E. G. Black carbon increases cation exchange capacity in soils. *Soil science society of America journal*, 70(5), 1719-1730, 2006.

LIANG, X.; JIN, Y.; HE, M.; LIU, Y.; HUA, G.; WANG, S.; TIAN, G. Composition of phosphorus species and phosphatase activities in a paddy soil treated with manure at varying rates. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 237, 173–180, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.12.033>

LIFFOURRENA, A. S.; LUCCHESI, G. I. Alginate-perlite encapsulated *Pseudomonas putida* A (ATCC 12633) cells: Preparation, characterization and potential use as plant inoculants. *Journal of Biotechnology*, 278, 28–33, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.04.019>

LIMA, J. R. DE S.; DE MORAES SILVA, W., DE MEDEIROS, E. V., DUDA, G. P., CORRÊA, M. M., MARTINS FILHO, A. P.; CLERMONT-DAUPHIN, C.; DANTAS, A. C.; HAMMECKER, C. Effect of biochar on physicochemical properties of a sandy soil and maize growth in a greenhouse experiment. *Geoderma*, 319, 14–23, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.12.033>

LIRA-CADETE, L.; FARIAS, A. R. B.; RAMOS A. P. S.; COSTA, D. P.; FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Variabilidade genética de bactérias diazotróficas associadas a plantas de cana-de-açúcar capazes de solubilizar fosfato inorgânico. *Biosci. J.* 28:122-129, 2012.

LIU, B.; CAI, Z.; ZHANG, Y.; LIU, G.; LUO, X.; ZHENG, H. Comparison of efficacies of peanut shell biochar and biochar-based compost on two leafy vegetable productivity in an infertile land. *Chemosphere*, v. 224, p. 151-161, 2019.

LIU, Y.; HOSSEINI, B. S.; WANG, J.; HU, D.; WU, R.; ZHANG, W.; ZHANG, M. Strain *Klebsiella* ZP-2 inoculation activating soil nutrient supply and altering soil phosphorus cycling. *Journal of Soils and Sediments*, 1-12, 2022.

LYU, H., ZHANG, H., CHU, M., ZHANG, C., TANG, J., CHANG, S. X., OK, Y. S. Biochar affects greenhouse gas emissions in various environments: A critical review. *Land Degradation & Development*, 33(17), 3327-3342, 2022.

MALAVOLTA, E. Manual de nutrição mineral de plantas. São Paulo: Agronômica Ceres, 631p. 2006.

MANZOOR, M.; ABBASI, M. K.; SULTAN, T. Isolation of phosphate solubilizing bacteria from maize rhizosphere and their potential for rock phosphate solubilization–mineralization

and plant growth promotion. *Geomicrobiology Journal*, 34(1), 81–95, 2017. <https://doi.org/10.1080/01490451.2016.1146373>

MAPA – INSTRUÇÃO NORMATIVA SDA Nº 13, DE 24 DE MARÇO DE 2011. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf>

MAPA – PLANO NACIONAL DE FERTILIZANTES – PNF 2022-2050, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/plano-nacional-de-fertilizantes/o-plano-nacional-de-fertilizantes>

MARDAD, I.; SERRANO DELGADO, A.; SOUKRI, A. Solubilization of inorganic phosphate and production of organic acids by bacteria isolated from a Moroccan mineral phosphate deposit. *African Journal of Microbiology Research*, 7, 626-635, 2013.

MARTINAZZO, R.; RHEINHEIMER D. S.; GATIBONI L. C.; BRUNETTO C.; KAMINSKI, J. Fósforo microbiano do solo sob sistema plantio direto em resposta à adição de fosfato solúvel. *Brasileira de Ciência do Solo*, 31:563-570, 2007.

MARTINEZ, C. L. M.; JESUS, M. S.; VAKKILAINEN, E.; CARDOSO, M.; ALMEIDA, G. M. Bioenergy Technology Solutions in Brazil. *Brazilian Journal of Wood Science*, 10(2), 112–122, 2019. <https://doi.org/10.12953/2177-6830/rwm.v10n2p112-122>

MARTINS FILHO, A. P.; DE MEDEIROS, E. V.; DE SOUSA LIMA, J. R.; DUDA, G. P.; DE MORAES SILVA, W.; ANTONINO, A. C. D.; DA SILVA, J. S. A. Impact of coffee biochar on soil carbon, microbial biomass and enzymatic activities in Semi-arid Sandy soil cultivated with maize. *Revista Brasileira de Geografia Física*, 13(02), 903-914, 2020. <https://doi.org/10.26848/rbgf.v13.3.p903-914>

MARTINS, L. R. G.; PATAH, L. A. Barreiras e oportunidades para escolha do modelo de canal da agroindústria brasileira de fertilizantes. *Quaestum*, v. 3, p. 1-15, 2022.

MASSENSSINI, A. M., TÓTOLA, M. R., BORGES, A. C.; COSTA, M. D. (2015). Potential Phosphate Solubilization Mediated by Rhizospheric Microbiota of Eucalyptus Cultivated in a Typical Toposequence of the Zona da Mata, Minas Gerais. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 39(3), 692–700, 2015. <https://doi.org/10.18178/ijesd.2017.8.5.979>

MCGILL, W. B.; COLE, C. V. Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. *Geoderma*, 26(4), 267-286, 1981.

MCLAUGHLIN, M. J.; ALSTON, A. M.; MARTIN, J. K. Measurement of phosphorus in the soil microbial biomass: a modified procedure for field soil. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, v. 18, p. 437-443, 1986.

MEDEIROS, E. V.; DOS SANTOS, M. D. C. H.; DA COSTA, D. P.; DUDA, G. P.; DE OLIVEIRA, J. B.; DA SILVA, J. A.; LIMA, J. R. S.; HAMMECKER, C. Effect of biochar and inoculation with *Trichoderma aureoviride* on melon growth and sandy Entisol quality. *Aust J Crop Sci* 14(6):971–977, 2020. <https://doi.org/10.21475/ajcs.20.14.06.p2302>

MEDEIROS, E. V.; MORAES, M. C.; COSTA, D. P.; SILVA, J. S.; OLIVEIRA, J. B.; LIMA, J. R. S.; MENEZES, R. S. C.; HAMMECKER, C. Biochar and *Trichoderma aureoviride* applied to the sandy soil: effect on soil quality and watermelon growth. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj Napoca* 48(2):735–751, 2020. <https://doi.org/10.15835/nbha48211851>

MEDEIROS, E. V.; SILVA, A. O.; DUDA, G. P.; DOS SANTOS, U. J.; DE SOUZA JUNIOR, A. J. The combination of *Arachis pintoi* green manure and natural phosphate improves maize growth, soil microbial community structure and enzymatic activities. *Plant and Soil*, 435(1), 175–185, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3887-z>

MELO, A. L.; CASIMIRO, E. L. N. Emergência do milho submetido a diferentes doses de enraizador a base de molibdênio e potássio. *Revista Cultivando o Saber*, ed. esp., p. 109-116, 2017.

MENDES, I. D. C.; DOS REIS JUNIOR, F. B. Microrganismos e disponibilidade de fósforo (P) nos solos: uma análise crítica. *Embrapa Cerrados, Documentos, Planaltina Brasil*, 2003.

MOHAMED, H. M.; ALMAROAI, Y. A. Effect of phosphate solubilizing bacteria on the uptake of heavy metals by corn plants in a long-term sewage wastewater treated soil. *International Journal of Environmental Science and Development*, 8(5), 366, 2017. <https://doi.org/10.18178/ijesd.2017.8.5.979>

MÓL, P. C. G.; JÚNIOR, J. C. Q.; VERÍSSIMO, L. A. A.; BOSCOLO, M.; GOMES, E.; MINIM, L. A.; DA SILVA, R.  $\beta$ -glucosidase: An overview on immobilization and some aspects of structure, function, applications and cost. *Bioquímica de Processos*, v. 130, p. 26-39, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.03.035>

MORAES, CARIME; DOS SANTOS, ROBERTA MENDES; RIGOBELO, EVERLON CID. Rock phosphate fertilization harms' *Azospirillum brasiliense*'selection by maize. *Australian Journal of Crop Science*, v. 13, n. 12, p. 1967-1974, 2019.

MUKHERJEE, T.; BANIK, A.; MUKHOPADHYAY, S. K. Plant growth-promoting traits of a thermophilic strain of the *Klebsiella* group with its effect on rice plant growth. *Current Microbiology*, v. 77, n. 10, p. 2613-2622, 2020.

NADEEM, S. M.; ZAHIR, Z. A.; NAVEED, M.; NAWAZ, S. Mitigation of salinity-induced negative impact on the growth and yield of wheat by plant growth-promoting rhizobacteria in naturally saline conditions. *Annals of Microbiology*, 63(1), 225–232, 2013. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0465-0>

NAJAR, G. R.; GANIE, M. A.; TAHIR, A. L. I. Biochar for sustainable soil health: a review of prospects and concerns. *Pedosphere*, 25(5), 639-653, 2015.

NAKBANPOTE, W., PANITLURTUMPAI, N., SANGDEE, A., SAKULPONE, N., SIRISOM, P. & PIMTHONG, A. (2014). Salt-tolerant and plant growth-promoting bacteria isolated from Zn/Cd contaminated soil: identification and effect on rice under saline conditions. *Journal of Plant Interactions*, 9(1), 379–387, 2014. <https://doi.org/10.1080/17429145.2013.842000>

NANNIPIERI, P.; GIAGNONI, L.; LANDI, L.; RENELLA, G. Role of Phosphatase Enzymes in Soil. In: BÜNEMANN, E.; OBERSON, A.; FROSSARD, E. (Eds.) *Phosphorus in Action: Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling*. Springer, Berlin, p. 215–243, 2011.

NARDI, S.; SCHIAVON, M.; FRANCIOSO, O. Chemical structure and biological activity of humic substances define their role as plant growth promoters. *Molecules*, v. 26, n. 8, p. 2256, 2021.

NAUTIYAL, C. S. An eficiente microbiological growth médium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, v. 170, p. 265-270, 1999.

NIGUSSIE, A.; KISSI, E.; MISGANAW, M.; AMBAW, G. Effect of biochar application on soil properties and nutrient uptake of lettuces (*Lactuca sativa*) grown in chromium polluted soils. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science*, 12(3), 369-376, 2012.

NOBILE, C. M.; BRAVIN, M. N.; BECQUER T.; PAILLAT J. M. Phosphorus sorption and availability in an andosol after a decade of organic or mineral fertilizer applications: Importance of pH and organic carbon modifications in soil as compared to phosphorus accumulation. *Chemosphere* 239:124709, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124709>

NÓBREGA, I. P. C. Efeitos do biochar nas propriedades físicas e químicas do solo: Sequestro de carbono no solo (Doctoral dissertation, Universidade Técnica de Lisboa (Portugal)), 2011.

OGUT, M. E. R. F.; KANDEMIR, N. Phosphate solubilization potentials of soil *Acinetobacter* strains. *Biology and Fertility of Soils*, 46(7), 707–715, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0475-7>

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology & Biochemistry*, 26(12), 1591–1601, 1994. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90311-5](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)90311-5)

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. *Biology and Fertility of Soils*, 21(3), 197–200, 1996. <https://doi.org/10.1007/s003740050049>

OLIVEIRA FILHO, J. S.; FERRARI, A. C.; PEREIRA, M. G.; PINTO, L. A. S. R.; ZONTA E.; MATOS, T. S. Phosphorus accumulation in soil after successive applications of swine manure: a long-term study in Brazil. *Environ. Earth Sci.* 79(2):62, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12665-019-8805-z>

OLIVEIRA JÚNIOR, A.; CASTRO, C.; OLIVEIRA, F. A.; JORDÃO, L. T. Adubação potássica da soja: cuidados no balanço de nutrientes. *Informações Agronômicas*; n. 143, p. 1-10, set. 2013.

OLIVEIRA, R. I.; GAMA-RODRIGUES, A. C.; GAMA-RODRIGUES, E. F.. Fósforo orgânico em horizontes diagnósticos superficiais de diferentes classes de solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 38, n. 5, p. 1411-1420, 2014.

OLIVEIRA, Z. M. Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal isoladas de cana-de-açúcar sob fertilização orgânica e/ou convencional. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2009.

OWEN, D.; WILLIAMS, A. P.; GRIFFITH, G. W.; WITHERS, P. J. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorous acquisition. *Appl. Soil Ecol.* 86:41–54, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.09.012>

PAIVA, C. A. O.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; COTA, L. V.; DOS SANTOS, F. C.; TINOCO, S. M. S.; LANA, U. G. P.; OLIVEIRA, M. C.; MATTOS, B. B.; ALVES, V. M. C., RIBEIRO, V. P.; VASCO JUNIOR, R. Recomendação agronômica de cepas de *Bacillus subtilis* e *Bacillus megaterium* na cultura do milho. Embrapa Milho e Sorgo, Circular Técnica. 2020.

PAIVA, M. R. F. C.; SILVA, G. F.; TAVARES, F. H.; PEREIRA, R. G.; QUEIROGA, F. M. Doses de nitrogênio e de fósforo recomendadas para produção econômica de milho-verde na Chapada do Apodi-RN. *Revista Caatinga*, v. 25, n. 4, p. 1-10, 2012.

PALANSOORIYA, K. N.; WONG, J. T. F.; HASHIMOTO, Y.; HUANG, L.; RINKLEBE, J.; CHANG, S. X.; BOLAN, N.; WANG, H.; OK, Y. S. Response of microbial communities to biochar-amended soils: a critical review. *Biochar* 1(1), 3–22, 2019. <https://doi.org/10.1007/s42773-019-00009-2>

PANDE, A., KAUSHIK, S., PANDEY, P., NEGI, A. Isolation, characterization, and identification of phosphate-solubilizing *Burkholderia cepacia* from the sweet corn cv. Golden Bantam rhizosphere soil and effect on growth-promoting activities. *International Journal of Vegetable Science*, 26(6), 591-607, 2020.

PANDEY, D.; DAVEREY, A.; ARUNACHALAM, K. Biochar: Production, properties and emerging role as a support for enzyme immobilization. *Journal of Cleaner Production*, 255, 120267, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120267>

PANTANO, G.; GROSSELI, G. M.; MOZETO, A. A.; FADINI, P. S. Sustentabilidade no uso do fósforo: uma questão de segurança hídrica e alimentar. *Química Nova*, 39, 732-740, 2016.

PARK, H. S., YEOM, Y. H., YOON, M. H. Comparison on phosphate solubilization ability of *Pantoea rodasii* and *Burkholderia stabilis* isolated from button mushroom media. *Journal of Mushroom*, 16(1), 31-38, 2018.

PATHY, A.; RAY, J.; PARAMASIVAN, B. Biochar amendments and its impact on soil biota for sustainable agriculture. *Biochar*, 2(3), 287-305, 2020.

PAVINATO, P. S.; ROSOLEM, C. A. Effects of organic compounds produced by plants on soil nutrient availability. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 32, n. 3, p. 911-920, 2008.

PEIX, A., RIVAS-BOYERO, A. A., MATEOS, P. F., RODRIGUEZ-BARRUECO, C., MARTINEZ-MOLINA, E., VELAZQUEZ, E. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(1), 103-110, 2001.

PEREIRA FILHO, I. A.; CRUZ, J. C.; GAMA, E. E. G. Cultivares de milho para o consumo verde, 2002.

PEREIRA, D. S.; DA COSTA, Y. K. S., DE CARVALHO, L. B. O elemento P: formas e dinâmica em solos tropicais. *Revista Agronomia Brasileira*, 2594-6781, Vol 5. doi: 10.29372/rab202124, 2021.

PEREIRA, M. E.; VARANDA, L. D.; NAKASHIMA, G. T; HANSTED, A. L. S.; SILVA, D. A.; TOMELERI, J. O. P.; BELINI G. B.; YAMAJI, F. M. Caracterização da biomassa de cama de frango para fabricação de biochar. *Revista Virtual de Química*, v. 11, n. 4, p. 13301343. doi: 10.21577/1984-6835.20190092, 2019.

PERIN, L.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; BALDANI, J. I.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; REIS, V. M.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(8), 1931–1937, 2006. <https://doi.org/10.1099/ijns.0.64362-0>

PIKOVSKAYA, R. I. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17, 362–370, 1948.

POSSO E. J. S.; DE PRAGER, M. S. Production of organic acids by rhizosphere microorganisms isolated from a Typic Melanudands and its effects on the inorganic phosphates solubilization. *Acta Agronómica* 66(2):1–23, 2017.

PRABHU, N.; BORKAR, S.; GARG, S. Phosphate solubilization by microorganisms: overview, mechanisms, applications and advances. *Advances in Biological Science Research*, 161–176, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817497-5.00011-2>

PRABHU, N.; BORKAR, S.; GARG, S. Phosphate solubilization mechanisms in alkaliphilic bacterium *Bacillus marisflavi* FA7. *Current Science*, 114(4), 845–853, 2018. <https://doi.org/10.18520/cs/v114/i04/845-853>

PRAKONGKEP, N.; GILKES, R. J.; WIRIYAKITNATEEKUL, W. Forms and solubility of plant nutrient elements in tropical plant waste biochars. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, v. 178, n. 5, p. 732–740, 2015.

QIAN, L.; CHEN, Y.; OUYANG, D.; ZHANG, W.; HAN, L.; YAN, J.; KVAPIL, P.; CHEN, M. Field demonstration of enhanced removal of chlorinated solvents in groundwater using biochar-supported nanoscale zero-valent iron. *Science of the Total Environment*, 698, 134215, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134215>

R CORE TEAM R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>. 2021.

RANGJAROEN, C.; RERKASEM, B.; TEAUMROONG, N.; NOISANGIAM, R.; LUMYONG, S. Promoting plant growth in a commercial rice cultivar by endophytic diazotrophic bacteria isolated from rice landraces. *Annals of Microbiology*, 65, 253-266, 2015. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0857-4>

RASHID, M.; CURI, N.; SANTANA, D. P.; ALAM, S.; LATIF, F. Organic acids production and phosphorus solubilizing microorganisms (PSM) under *in vitro* conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v. 7, p. 187 – 196, 2004.

RAZZAGHI, F.; OBOUR, P. B.; ARTHUR, E. Does biochar improve soil water retention? A systematic review and meta-analysis. *Geoderma*, 361, 114055, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.114055>

REETHA, S.; BHUVANESWARI, G.; THAMIZHINIYAN, P.; MYCIN, T. R. Isolation of indole acetic acid (IAA) producing rhizobacteria of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* and enhance growth of onion (*Allium cepa* L.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(2), 568–574, 2014.

REETZ, H. F. Fertilizantes e o seu uso eficiente. São Paulo: ANDA, 178. 2017. Disponível em: <https://www.ufla.br/dcom/wp-content/uploads/2018/03/Fertilizantes-e-seu-uso-eficiente-WEB-Word-Ouubro-2017x-1.pdf>

REGKOUZAS, P.; DIAMADOPoulos, E. Adsorption of selected organic micro-pollutants on sewage sludge biochar. *Chemosphere*, v. 224, p. 840-851, 2019.

REHMAN, M. Z. U., RIZWAN, M., ALI, S., FATIMA, N., YOUSAF, B., NAEEM, A., ... & OK, Y. S. Contrasting effects of biochar, compost and farm manure on alleviation of nickel toxicity in maize (*Zea mays* L.) in relation to plant growth, photosynthesis and metal uptake. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 133, 218-225, 2016.

REIS, M., OLIVARES, F. L.; DÖBEREINER, J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 10(4), 401–405, 1994. <https://doi.org/10.1007/bf00144460>

RHEINHEIMER, D. S.; GATIBONI, L. C.; KAMINSKI, J. Fatores que afetam a disponibilidade do fósforo e o manejo da adubação fosfatada em solos sob sistema de plantio direto. *Ciência Rural*, v. 38, n.2, p. 576-586, 2008.

RIBEIRO, H. Influência da adição de biochar sobre as modificações das propriedades físicas de um Latossolo Amarelo Distrófico da Amazônia Central, 2020.

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

RICHARDSON, A. E.; HOCKING, P. J.; SIMPSON, R. J.; GEORGE, T. S. Plant mechanisms to optimise access to soil phosphorus. *Crop and Pasture Science*, 60(2), 124-143, 2009.

RICHARDSON, A. E.; SIMPSON, R. J. Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant physiology*, v. 156, n. 3, p. 989-996, 2011. RILLIG, M. C.; MUMMEY, D. L. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist*, v. 171, n. 1, p. 41-53, 2006.

RODRIGUEZ, H., GONZALEZ, T., GOIRE, I., BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften*, 91, 552-555, 2004.

SANI, M. N. H.; HASAN, M.; UDDAIN, J.; SUBRAMANIAM, S. Impact of application of *Trichoderma* and biochar on growth, productivity and nutritional quality of tomato under reduced NPK fertilization. *Annals of Agricultural Sciences*, v. 65, n. 1, p. 107-115, 2020.

SANTOS, A. D; CURADO, F. F; TAVARES, E. D. Pesquisas com sementes crioulas e suas interações com as políticas públicas na região Nordeste do Brasil. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, 36: 119, 2019.

SANTOS, D. R. D.; GATIBONI, L. C.; KAMINSKI, J. Factors affecting the phosphorus availability and the fertilization management in no-tillage system. *Ciência Rural*, 38(2), 576–586, 2008.

SANTOS, H. G., JACOMINE, P. K. T., DOS ANJOS, L. H. C., DE OLIVEIRA, V. A., LUMBRERAS, J. F., COELHO, M. R., ... & CUNHA, T. J. F. (2018). Sistema brasileiro de classificação de solos. Brasília, DF: Embrapa, 2018.

SATYAPRAKASH, M.; NIKITHA, T.; REDDI, E. U. B.; SADHANA, B.; VANI, S. S. Phosphorous and phosphate solubilising bacteria and their role in plant nutrition. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(4), 2133–2144, 2017. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.604.251>

SCHMALENBERGER, A.; FOX, A. Bacterial mobilization of nutrients from biochar-amended soils. In: GADD, G. M.; SARIASLANI, S. (Eds.) *Advances in Applied Microbiology*, Academic Press, pp 109–159, 2016. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2015.10.001>

SHAHZAD, S.; KHAN, M. Y.; ZAHIR, Z. A.; ASGHAR, H. N.; CHAUDHRY, U. K. Comparative effectiveness of different carriers to improve the efficacy of bacterial consortium for enhancing wheat production under salt affected field conditions. *Pakistan Journal of Botany*, 49(4), 1523–1530, 2017.

SHARMA, S. B., SAYYED, R. Z., TRIVEDI, M. H., GOBI, T. A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2, 1-14, 2013.

SHI, W.; JU, Y.; BIAN, R.; LI, L.; JOSEPH, S.; MITCHELL, D. R.; MUNROE, P.; TAHERYMOOSAVI, S.; PAN, G. Biochar bound urea boosts plant growth and reduces nitrogen leaching. *Science of the Total Environment*, 701, 134424, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134424>

SILVA, M. F. D.; OLIVEIRA, P. J. D.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; REIS, V. M. Inoculants containing polymers and endophytic bacteria for the sugarcane crop. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44(11), 1437–1443, 2009.

SILVA, M. F.; DE SOUZA ANTÔNIO, C.; DE OLIVEIRA, P. J.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; DE BARROS SOARES, L. H.; REIS, V. M. Survival of endophytic bacteria in polymer-based inoculants and efficiency of their application to sugarcane. *Plant and Soil*, 356(1-2), 231–243, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1242-3>

SILVA, R. D. N.; SENNA, T. O.; SÁ MENDONÇA, E.. Formas de fósforo em Luvissolo Crómico Órtico sob sistemas agroflorestais no município de Sobral-CE. *Revista Ciência Agronômica*, v. 39, n. 4, 494-502, 2008.

SINDERAÇÕES Balanço do setor de alimentação animal 2021. <https://sindiracoes.org.br/sindiracoes-anuncia-o-balanco-do-setor-de-alimentacao-animal-em-2021>, 2021. Acessado em: 21 de Mar de 2022.

SINGH, H.; NORTHUP, B. K.; RICE, C. W.. Biochar applications influence soil physical and chemical properties, microbial diversity, and crop productivity: a meta-analysis. *Biochar* 4, 8(2022), 2022. <https://doi.org/10.1007/s42773-022-00138-1>

SINGLETON, P.; KEYSER, H.; SANDE, E. Development and evaluation of liquid inoculants. Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam. *ACIAR Proceedings* 109e, Canberra 52–66, 2002.

SINHA, A.; LULU, S.; VINO, S.; OSBORNE, W. J. Reactive green dye remediation by *Alternanthera philoxeroides* in association with plant growth promoting *Klebsiella* sp. VITAJ23: a pot culture study. *Microbiological Research*, v. 220, p. 42-52, 2019. [doi.org/10.1016/j.micres.2018.12.004](https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.12.004)

SITEPU, I. R.; HASHIDOKO, Y.; SANTOSO, E.; TAHARA, S. Potent phosphate-solubilizing bacteria isolated from dipterocarps grown in peat swamp forest in Central Kalimantan and their possible utilization for biorehabilitation of degraded peatland. In: *Proceedings of the international symposium and workshop on tropical Peatland*, Yogyakarta (pp. 27-29), 2007.

SIVAKUMAR, P. K.; PARTHASARTHI, R.; LAKSHMIPRIYA, V. P. Encapsulation of plant growth promoting inoculant in bacterial alginate beads enriched with humic acid. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(6), 415–422, 2014.

SMITH, R. S. Legume inoculant formulation and application. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(6), 485-492. <https://doi.org/10.1139/m92-080> 1992.

SOHI, S. P.; KRULL, E.; LOPEZ-CAPEL, E.; BOL, R. A review of biochar and its use and function in soil. *Advances in agronomy*, 105, 47-82, 2010.

SON, H. J., PARK, G. T., CHA, M. S., & HEO, M. S. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt-and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource technology*, 97(2), 204-210, 2006.

SOUCHE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. D. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40, 1149-1152, 2005.

SOUSA, C. A.; JUNIOR, M. D. A. L.; FRACETTO, G. G. M.; FREIRE, F. J.; SOBRAL, J. K. Evaluation methods used for phosphate-solubilizing bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 15(34), 1796-1805, 2016.

SOUSA, G. G.; THALES, V. D. A.; BRAGA, E. S.; DE AZEVEDO, B. M.; MARINHO, A. B.; BORGES, F. R. Fertigation with bovine biofertilizer: Effects on growth, gas exchange and yield of physic nut (*Jatropha curcas*). *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 8(3), 503–509, 2013.

SOUSA, M. DOS S.; ECHER, M. M. Microrganismos promotores de crescimento: uma alternativa sustentável no desempenho agronômico da beterraba. *Concilium*, v. 23, n. 10, p. 529-541, 2023.

SOUZA, A. E.; REIS, J. G. M.; RAYMUNDO, J. C.; PINTO, R. S. Estudo da produção do milho no Brasil: regiões produtoras, exportação e perspectivas. *South American Development Society Journal*, v. 04, n. 11, p. 182-194, 2018.

STEINER, C.; DAS, K. C.; GARCIA, M.; FÖRSTER, B.; ZECH, W. Charcoal and smoke extract stimulate the soil microbial community in a highly weathered xanthic Ferralsol. *Pedobiologia*, 51(5-6), 359-366, 2008.

STEINER, C.; GLASER, B.; GERALDES TEIXEIRA, W.; LEHMANN, J.; BLUM, W. E.; ZECH, W. Nitrogen retention and plant uptake on a highly weathered central Amazonian Ferralsol amended with compost and charcoal. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 171(6), 893-899, 2008.

STEPHENS, J. H. G.; RASK, H. M. Inoculant production and formulation. *Field Crops Research*, 65(2-3), 249–258, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0378-4290\(99\)00090-8](https://doi.org/10.1016/s0378-4290(99)00090-8)

SZILAGYI-ZECCHIN, V. J.; MÓGOR, A. F.; RUARO, L.; RÖDER, C. Tomato seedlings growth (*Solanum lycopersicum*) promoted by bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* FZB42 in organic system. *Revista de Ciências Agrárias*, 38(1), 26–33, 2015.

TAMURA K.; STECHER G.; KUMAR S. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 2021. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

TEIXEIRA, M. A.; I. S. DE MELO, I. S.; VIEIRA, R. F.; F. E. C. COSTA; HARAKAVA, R. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovariedades em três estados brasileiros. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 42, n. 1, p. 43-49. Brasília, 2007.

TEIXEIRA, P. C.; DONAGEMMA, G. K.; FONTANA, A.; TEIXEIRA, W. G. Manual de Métodos de Análise de Solo. Embrapa, 2017.

TENG, Z.; SHAO, W.; ZHANG, K.; HUO, Y.; LI, M. Characterization of phosphate solubilizing bacteria isolated from heavy metal contaminated soils and their potential for lead immobilization. *Journal of Environmental Management*, 231, 189–197, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.10.012>

THAKUR, D., KAUSHAL, R., SHYAM, V. Phosphate solubilising microorganisms: role in phosphorus nutrition of crop plants-a review. *Agricultural Reviews*, 35(3), 159-171, 2014.

THEIS, J.; RILLIG, M. Characteristics of biochar biological properties, biochar for environment management science and technology. *Earthscan*, London, v. 85, 2009.

THUNSHIRN, P.; WENZEL, W. W.; PFEIFER, C. Pore characteristics of hydrochars and their role as a vector for soil bacteria: A critical review of engineering options. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, p. 1-25, 2021.

TURNER, B. L.; MAHIEU, N.; CONDRON, L. M. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectral assignments of phosphorus compounds in soil NaOH-EDTA extracts. *Soil Science Society of America Journal*, v. 67, n. 2, p. 497-510, 2003.

USEPA. Method 365.3: Phosphorous, All Forms (Colorimetric, Ascorbic Acid, Two Reagent). United States Environmental Protection Agency, 1978. [https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/method\\_365-3\\_1978.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/method_365-3_1978.pdf)

VANCE, C. P., UHDE-STONE, C. & ALLAN, D. L. (2003). Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*, 157(3), 423–447, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00695.x>

VANEK, S. J.; THIES, J.; WANG, B.; HANLEY, K.; LEHMANN, J. Pore-size and water activity effects on survival of *Rhizobium tropici* in biochar inoculant carriers. *J. Microb. Biochem. Technol.*, 8, 296-306, 2016.

VASSILEV, N.; EICHLER-LÖBERMANN, B.; VASSILEVA, M. Stress-tolerant P-solubilizing microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(4), 851–859, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4224-8>

VERHEIJEN, F.; JEFFERY, S.; BASTOS, A. C.; VAN DER VELDE, M.; DIAFAS, I. Biochar application to soils. A critical scientific review of effects on soil properties, processes, and functions. *EUR*, 24099, 162, 2010.

WAKELIN, R. A.; WARREN, P. R.; HARVEY, M. H.; RYDER. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots *Biol. Fert. Soils*, v. 40, p. 36-43, 2004.

WALPOLA, B. C.; YOON, M. H. Prospectus of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus availability in agricultural soils: A review. *African Journal of Microbiology Research*, 6(37), 6600–6605, 2012. <https://doi.org/10.5897/ajmr12.889>

WANG, C.; PAN, G.; LU, X.; QI, W. Phosphorus solubilizing microorganisms: potential promoters of agricultural and environmental engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1181078, 2023. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1181078>

WANG, J.; XIONG, Z.; KUZYAKOV, Y. Biochar stability in soil: meta-analysis of decomposition and priming effects. *Gcb-Bioenergy*, 8(3), 512–523, 2016. <https://doi.org/10.1111/gccb.12266>

WARNOCK, D. D.; LEHMANN, J.; KUYPER, T. W.; RILLIG, M. C. Mycorrhizal responses to biochar in soil—concepts and mechanisms. *Plant and soil*, 300(1), 9-20, 2007.

WEI, C. Y.; LIN, L.; LUO, L. J.; XING, Y. X.; HU, C. J.; YANG, L. T.; AN, Q. Endophytic nitrogen-fixing *Klebsiella variicola* strain DX120E promotes sugarcane growth. *Biology and Fertility of Soils*, 50(4), 657-666, 2014.

WEI, Y.; ZHAO, Y.; LU, Q.; CAO, Z.; WEI, Z. Organophosphorus-degrading bacterial community during composting from different sources and their roles in phosphorus transformation. *Bioresource technology*, 264, 277-284, 2018.

WELCH, S. A.; TAUNTON, A. E.; BANFIELD, J. F. Effect of microorganisms and microbial metabolites onapatite dissolution. *Geomicrobiology Journal*, v. 19, n. 3, p. 343-367, 2002.

WENDIMU, A.; YOSEPH, T.; AYALEW, T. Ditching phosphatic fertilizers for phosphate-solubilizing biofertilizers: a step towards sustainable agriculture and environmental health. *Sustainability*, 15(2), 1713, 2023.

WITHERS, P. J., RODRIGUES, M., SOLTANGHEISI, A., DE CARVALHO, T. S., GUILHERME, L. R., BENITES, V. D. M., GATIBONI, L. C., DE SOUSA, D. M. G., NUNES, R. S., ROsolem, C. A., ANDREOTE, F. D., OLIVEIRA JR, A., COUTINHO, E. L. M. & PAVINATO, P. S. Transitions to sustainable management of phosphorus in Brazilian agriculture. *Scientific Reports*, 8(1), 1-13, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20887-z>

XIAO, Y., LYU, HH, TANG, JC, WANG, K., SUN, HW. Efeitos da moagem de bolas na fotoquímica do biochar: degradação da enrofloxacina e possíveis mecanismos. *Chemical Engineering Journal*, 384, 123311, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123311>

YAN, Y.; SARKAR, B.; ZHOU, L.; ZHANG, L.; LI, Q.; YANG, J.; BOLAN, N. Phosphorus-rich biochar produced through bean-worm skin waste pyrolysis enhances the adsorption of aqueous lead. *Environmental Pollution*, 266, 115177, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115177>

YANG, W.; FENG, G.; MILES, D.; GAO, L.; JIA, Y.; LI, C.; QU, Z. Impact of biochar on greenhouse gas emissions and soil carbon sequestration in corn grown under drip irrigation with mulching. *Science of the Total Environment*, 729, 138752, 2020.

YE, S.; ZENG, G.; TAN, X.; WU, H.; LIANG, J.; SONG, B.; TANGA, N.; ZHANGA, P.; YANGA, Y.; CHENA, Q.; LI, X. Nitrogen-doped biochar fiber with graphitization from Boehmeria nivea for promoted peroxymonosulfate activation and non-radical degradation pathways with enhancing electron transfer. *Applied Catalysis B: Environmental*, 269, 118850, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2020.118850>

YOU, M., FANG, S., MACDONALD, J., XU, J., & YUAN, Z. C. Isolation and characterization of *Burkholderia cenocepacia* CR318, a phosphate solubilizing bacterium promoting corn growth. *Microbiological Research*, 233, 126395, 2020.

YRJÄLÄ, K.; LOPEZ-ECHARTEA, E. Structure and function of biochar in remediation and as carrier of microbes. *Advances in Chemical Pollution, Environmental Management and Protection* (Vol. 7, pp. 263-294). Elsevier, 2021.

ZENG, Q., WU, X., WANG, J., & DING, X. Phosphate solubilization and gene expression of phosphate-solubilizing bacterium *Burkholderia multivorans* WS-FJ9 under different levels of soluble phosphate, 2017.

ZHANG, X.; ZHAO, Y.; ZHU, L.; CUI, H.; JIA, L.; XIE, X.; LI, J.; WEI, Z. Assessing the use of composts from multiple sources based on the characteristics of carbon mineralization in soil. *Waste Management*, v. 70, p. 30-36, 2017.

ZHENG, B. X.; DING, K.; YANG, X. R.; WADAAN, M. A.; HOZZEIN, W. N.; PEÑUELAS, J.; ZHU, Y. G. Straw biochar increases the abundance of inorganic phosphate solubilizing bacterial community for better rape (*Brassica napus*) growth and phosphate uptake. *Science of the total environment*, 647, 1113-1120, 2019.

ZHU, J.; LI, M.; WHELAN, M. Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: a review. *Science of the Total Environment*, 612, 522–537, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.095>

ZUFFO, A. M.; BRUZI, A. T.; DE REZENDE, P. M.; DE CARVALHO, M. L. M.; ZAMBIAZZI, E. V.; SOARES, I. O.; SILVA, K. B. Foliar application of *Azospirillum brasilense* in soybean and seed physiological quality. *African Journal of Microbiology Research*, 10(20), 675–680, 2016. <https://doi.org/10.5897/ajmr2016.7911>