

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**MICROORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATOS EM CULTIVOS DE
ALFACE (*Lactuca sativa* L.)**



**Trabalho apresentado junto à
Coordenadoria de Estágio do
Curso de Agronomia - AGR 5904:
Estágio de Conclusão de Curso
da Universidade Federal de Santa
Catarina (UFSC)**

Elsa Aurora Mendoza

Florianópolis, julho de 2001

MICROORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATOS

EM CULTIVO DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.)

ESTAGIÁRIA: Elsa Aurora Mendoza

ÁREA: Microbiologia de Solo

ORIENTADOR: Prof. Dr. Germano Nunes Silva Filho

LOCAL DE ESTÁGIO: Departamento de Microbiologia e Parasitologia

Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

LOCAL DE COLETA DAS AMOSTRAS: Município de Antônio Carlos

Santa Catarina - SC

FOTO DE CAPA: Propriedade em cultivo de Alface - Sistema Convencional

Município de Antônio Carlos - SC

Produtor: Sr. Márcio Geussn

PERÍODO: Julho de 2000 a Março de 2001

MICROORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATOS

EM CULTIVO DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.)

COMISSÃO DA BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. GERMANO NUNES SILVA FILHO
ORIENTADOR

Prof.^a Dra. VETURIA LOPES de OLIVEIRA
Membro da Banca

Prof. Dr. ÊNIO LUIZ PEDROTTI
Membro da Banca

Estágio realizado no Laboratório de
Microbiologia do Solo do Departamento de
Microbiologia e Parasitologia da
Universidade Federal de Santa Catarina.

E DISSE DEUS: “Produza a terra erva verde, erva que dêem semente e árvores frutíferas que dêem frutos, segundo a sua espécie, cuja semente esteja nele, sobre a terra”. E assim se fez...

Gênesis, 1:11.

“Crise vai, crise vêm para que se saiba quem é quem...”

Continuarei a sacudir a árvore da vida que nos produz frutos inimaginável.

Autor desconhecido

DEDICATORIA

Dedico este trabalho aos meus avós: Miguel "*In memóriam*" e Justa Aurora, os primeiros a mostrar-me o amor ao campo, durante a minha infância e adolescência.

Aos meus filhos: Alexander e Eliane, motivadores de minha estrada.

A minha infinita gratidão a toda minha família.

Beijos,....

AGRADECIMENTOS

A Deus, luz da minha vida, por estar presente em todos os momentos para fornecer-me forças necessárias perante as dificuldades do dia a dia, permitindo desta forma, concluir este passo importante do meu processo profissional.

Agradecimentos especiais aos meus pais, Ramiro e Juana que mesmo longe me brindam amor e carinho e sempre me mostraram lições de vida e ensinamentos em que mesmo as pequenas conquistas podem se tornar grandes, com muita fé e amor a DEUS.

A Alexander, meu filho, que nos momentos mais difíceis da minha vida, me abraçou e me deu forças para continuar o caminho que eu tinha-me traçado para concluir a graduação.

A Eliane, minha filha amorosa pela compreensão nas horas de ausência. Meu amor infinito.

Ao Professor Germano Silva Filho, meu orientador, pela paciência, disposição e pelo acompanhamento na execução do estágio e elaboração do relatório.

Em especial a Luciano Alves, pela grande amizade que, não medindo esforços proporcionou-me incentivo moral, profissional e ajuda constante na condução deste trabalho.

A todos os profissionais do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSC pela amizade e atenção a mim dispensada, permitindo-me o uso do espaço físico, instalações e aparelhagem para a realização deste trabalho.

Ao Sr. João Carlos Weingartner, técnico da EPAGRI de Antônio Carlos (SC), pelo fornecimento das amostras necessárias para a elaboração deste trabalho.

Ao Eg^o Agrônomo Luiz Afonso Borges, pela constante amizade e colaboração durante a montagem dos experimentos.

Ao Eg^o Agrônomo Charles Narloch, com grato afeto pela amizade e sugestões profissionais nos longos momentos de conversa a pesar de sua constante ocupação.

Aos meus colegas de aula pelo apoio e afeto que sempre me proporcionam dia a dia.

A meus ex-colegas do IMPA (Instituto de Matemática Puras e Aplicadas), e em especial a Carolina Celano que desde Rio de Janeiro, não poupam esforços no telefone para mostrar incentivo amigo.

Assim, poderia continuar a agradecer a muitos que colaboraram de uma ou outra forma comigo, correndo o risco de esquecer de mencionar a alguém. Por isso, a todos os que estenderam a mão amiga, meus mais sinceros agradecimentos.

A todos meu muito obrigada, OK!

CONTEÚDO

	Página
1 - INTRODUÇÃO -----	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1 - Sistema convencional -----	3
2.2 - Agricultura de transição -----	4
2.3 - Sistema orgânico -----	5
2.4 - Produção de mudas de hortaliças -----	6
2.5 - Alface (<i>Lactuca sativa</i> L.) -----	7
2.6 - Fósforo no solo -----	8
2.7 - Microrganismos solubilizadores de fosfatos -----	11
3 - OBJETIVO GERAL	
3.1 - Objetivo específico -----	14
4 - MATERIAL E MÉTODOS	
4.1 - Avaliação da População de Microrganismos Solubilizadores de Fosfatos --	15
4.1.1 Amostragem -----	15
4.1.2 Preparo das amostras -----	16
4.1.3 Preparo da diluição -----	16
4.1.4 Contagem -----	17
4.2 - Isolamento de Microrganismos Solubilizadores de Fosfatos -----	17
4.3 - Capacidade e Potencial de Solubilização e Potencial de Solubilização dos Isolados -----	18
4.4 - Análise Estatística -----	19

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5.1 - População de microrganismos	
solubilizadores de fosfatos -----	20
5.2 - Manutenção da característica solubilizadora durante	
o cultivo dos isolados em meio de cultivo GEL -----	23
5.3 - Capacidade e potencial de solubilização de fosfatos -----	23
6 - CONCLUSÕES -----	25
7 - ANEXOS -----	26
8 - CONSIDERAÇÕES FINAIS -----	27
9 - BIBLIOGRAFIA	

1 - INTRODUÇÃO

A agricultura é expressão de vida já que o solo comporta uma biota diversificada que junto a mecanismos de interação, formam um complexo vital para o ecossistema em sua totalidade, onde pode-se incluir também o homem. Este último, busca na agricultura seu sustento, e para trabalhar no solo precisa ter conhecimento das interações que aí ocorrem com vista a manutenção do sustento de vital importância.

No que se refere a agricultura tem-se dois paradigmas: o paradigma químico que surge com a agricultura convencional e o paradigma biológico/ecológico ligado à agricultura “alternativa”.

Com relação a agricultura convencional, utilizada por grande parcela de produtores, busca-se com o uso de tecnologias agressivas ao solo uma alta produção visando apenas o mercado, com pouca preocupação com a saúde humana.

Entretanto, no fim da década de 80, após reflexões sobre o sistema convencional, ocorre uma transição deste sistema para a agricultura alternativa buscando-se com esta produtos comercializados livres de agrotóxicos. Segundo dados da Agriannual 2000 (ALIMENTOS orgânicos 2000), a conversão de produtores convencionais para orgânicos, vem crescendo anualmente, representando no Brasil, um total de 10%.

Na agricultura orgânica, para que ocorra um uso equilibrado entre o solo e os vegetais, o fornecimento de nutrientes ao solo é feito

principalmente por compostos orgânicos, dentre eles, resíduos foliares de processos biológicos, fontes renováveis de macro e micro nutrientes, esterco de “curral”, sendo todos estes aplicados no cultivo de hortícolas.

No Brasil, a alface é a hortaliça mais consumida. Ela necessita de um solo rico em nutrientes, principalmente no último ciclo de desenvolvimento.

O fósforo é um macronutriente essencial para a nutrição das plantas. Sua disponibilidade nos solos brasileiros é geralmente baixo, com a sua falta as plantas, principalmente as de ciclo curto, tornam-se fracas, apresentando sintomas de carência, o que irá interferir na produtividade. Dentre a diversidade de microrganismos que o solo apresenta, são encontrados os que vivem no solo e na rizosfera, desempenhando papel importante na ciclagem do fósforo, e entre eles os que promovem a solubilização de fosfatos, promovendo o suprimento do nutriente para as plantas. A avaliação da população de microrganismos solubilizadores de fosfatos, de sua capacidade e potencial de solubilização são importantes em programas de manejo de população ou em programas de seleção visando a produção de inoculantes.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Sistema Convencional

O sistema convencional introduz materiais e métodos que afetam o meio ambiente, assim como a qualidade dos alimentos. Ainda que a produtividade seja alta, esta técnica tem custos mais elevados. Dentre os materiais que causam impacto negativo no ecossistema estão os adubos minerais solúveis, cujo uso indiscriminado pode, com o passar do tempo, causar aumento da salinidade e o enriquecimento das águas subterrâneas. Além disso, a contaminação com agrotóxicos, aliada à técnicas de irrigação e mecanização num manejo intensivo do solo, exposição a incidência direta dos raios solares, falta de reposição adequada de matéria orgânica, diminuição da biomassa microbiana, terminam acarretando o empobrecimento deste solo em cultivo sucessivo (PRIMAVESI, 1992), reduzindo a produtividade ao longo do tempo e aumentando o uso de insumos industriais (SRIVASTAVA & SINGH, 1991), aumentando a erosão, a compactação e a destruição dos agregados do solo, promovendo reduções nos teores de matéria orgânica, o principal componente de fertilidade do solo (SILVA et al., 1994). Desta forma, o sistema convencional trouxe sérias consequências no aspecto químico, físico e biológico, assim como na qualidade de alimentos (PARR et al., 1990).

2.2- Agricultura de transição (alternativa)

A agricultura passa por momentos de reflexão frente a problemas ambientais gerados por erros e distorções do modelo convencional que afetam inclusive a saúde do homem. Iniciando, assim, a busca de alternativas para melhor aproveitamento e preservação do solo. O conceito de agroecologia passou a incorporar idéias mais ambientais e sociais acerca de agricultura, não somente para a produção, mas, principalmente, para a sustentabilidade ecológica e social do sistema de produção, englobando os diferentes sistemas da “agricultura alternativa” (ALTIERI, 1989). Os movimentos que surgiram em oposição ao modelo agrícola “moderno” apresentam, em maior ou menor grau, propostas para a agricultura em seus aspectos agronômicos, econômicos, ecológicos e sociais. Assim, surgiu, entre as várias frentes da agricultura, a agricultura orgânica como uma das alternativas que têm como objetivo manter a fertilidade do solo com a generalização da policultura e da integração da lavoura e da criação animal. Realiza-se, assim, o controle da erosão e a preservação da qualidade de água sem emprego de agrotóxicos poluidores do ambiente, buscando-se um equilíbrio no solo, preservando as suas propriedades físicas, químicas e biológicas. Pelo fato de não usar agrotóxicos, o sistema orgânico não causa desequilíbrio à comunidade de microrganismos que ocorrem no solo (PASCHOAL, 1991).

2.3 - Sistema Orgânico

Este sistema é uma alternativa ao sistema convencional, onde busca-se produzir com menor dependência e, se possível, sem a presença de agrotóxicos, removendo o fator determinante do sistema convencional em relação à incidência de pragas, doenças e plantas daninhas, minimizando esses problemas com a diversificação e rotação de culturas para melhor produtividade. Assim, na agricultura orgânica, utiliza-se, como manejo, a adubação orgânica que é representada por toda incorporação de vegetais/restos e animais/resíduos no horizonte "A" do solo. Essa modalidade de agricultura oferece muitas vantagens além da econômica, pois funciona como fornecedora de nutrientes para as plantas e melhora as condições físicas e biológicas do solo. É interessante frisar que o excesso de adubação com esterco de animais pode criar problemas de contaminação dos lençóis subterrâneos de água (FISCHER, 1992). Assim, o correto manejo do solo e da água são de fundamental importância junto à incorporação de matéria orgânica que possibilita melhor circulação de ar e água, aumentando a atividade biológica e a mineralização da matéria orgânica.

Nos últimos anos a área plantada sem agroquímicos vem crescendo rapidamente na Europa. Segundo dados da Ifoam - International Federation of Organic Agriculture Movements (ALIMENTOS orgânicos, 2000), ela saltou de 250 mil hectares em 1987 para 2,9 milhões de hectares no ano passado, quase o equivalente ao espaço agrícola brasileiro. A demanda por

alimentos sem agrotóxicos cresce 40% ao ano no continente Europeu. No Brasil, embora esse seguimento represente apenas 2% do mercado de FLV (frutas, legumes e verduras), o avanço também se dá aos saltos na média de 50% ao ano (CERRI, 2001).

2.4 - Produção de mudas de hortaliças

Nas atuais condições brasileiras, com mão-de-obra barata e abundante, custo de semente muito alto, e índice de mecanização da agricultura ainda baixo, a semeadura direta de espécies olerícolas não é viável, do ponto de vista econômico. Portanto a produção de mudas em viveiros está crescendo cada vez mais. As mudas podem ser produzidas em canteiros ou em bandejas.

No sistema de produção de mudas em bandejas, utilizam-se normalmente bandejas de isopor, com 200 ou 288 células, usa-se também substrato comercial e semente peletizada. Após um período de 21 a 28 dias, as mudas vão diretamente para os canteiros a campo. O ponto ideal de desenvolvimento da muda é quando atinge de 10 - 15 cm de altura para a maioria das olerícolas (FILGUEIRA, 1982).

Este sistema de produção favorece o controle da microbiota que é levada a campo com a muda.

2.5 - Alface (*Lactuca sativa* L.)

A cultura de alface é uma ótima opção para os agricultores, por ser de alta rentabilidade, ter ciclo curto, grande procura a cada dia, pelo valor econômico acessível e pelo seu valor nutritivo. A alface está entre as plantas do grupo 1 da classificação de KHRISTEWA (1953), planta folhosa, herbácea, rica em glicídios. Ela pode apresentar um aumento na produção superior a 50%, devido à adição de substâncias húmicas (SILVA et al. 2000).

O crescimento da alface e o acúmulo de nutrientes é lento até cerca de trinta dias após a emergência, aumentando, rapidamente, após esse período. Apesar de absorver quantidades relativamente pequenas de nutrientes, quando comparadas com outras culturas, devido ao seu ciclo curto (50 a 70 dias, em função de cultivares, épocas e locais de cultivo), a alface pode ser considerada como exigente em nutrientes, principalmente na fase final do ciclo (KATAYAMA, 1990).

É importante conhecer as exigências climáticas, variedades, épocas de plantio, necessidades hídricas, identificação de pragas e doenças, cuidados pré e pós colheita e aspectos de comercialização para se ter sucesso. Portanto, o conhecimento da curva de crescimento e a quantidade de nutrientes extraídos pela alface durante o seu ciclo devem ser levados em consideração num programa de adubação. De acordo com Zink & YamaguchiI, (Apud. FERNANDEZ, 1981), a absorção dos macronutrientes

pela alface em cada hectare é a seguinte: 106,4 kg de nitrogênio, 30,2 Kg de fósforo, 233 Kg de potássio, 35Kg de cálcio e 13,5 kg de magnésio

2.6 - Fósforo no solo

O teor de fósforo no solo é muito variável, as quantidades dependem do material que lhe dão origem. Os solos das regiões tropicais e subtropicais apresentam um enorme reservatório de fósforo, mas a maior parte deste ocorre na fração mineral não disponível para os vegetais (SIQUEIRA & FRANCO, 1988; TSAI & ROSSETO, 1992). Há várias formas de fósforo no solo. Ele pode estar em forma sólida (P orgânico ou P inorgânico), em forma de solução (P inorgânico) ou ainda pode estar ocluso nas partículas do solo e, portanto, indisponível para as plantas. Isso ocorre, principalmente, pela ligação ou fixação desse elemento aos óxidos de Fe e Al, nos solos ácidos, ou ao Ca, nos solos neutros e alcalinos, formando fosfatos poucos solúveis (FASSBENDER, 1977; SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

Devido à baixa solubilidade dos compostos fosfatados e à baixa quantidade de água que o solo retém, a quantidade de P em solução é pequena em relação ao P sólido. O fósforo encontra-se na fase líquida do solo na forma de H_2PO_4^- (muito solúvel e comum em solos ácidos), HPO_4^{2-} (solúvel e comum em solos com pH próximo de 7) e PO_4^{3-} (pouco solúvel e comum em solos alcalinos). Essas formas têm origem na mineralização de

minerais como a apatita $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, na decomposição de resíduos de origem animal e vegetal (fosfolipídios) e na aplicação de adubos ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$). Nos solos ácidos, existe Al^{3+} que se combina rapidamente com as formas solúveis de P, tornando-as insolúveis e não assimiláveis pelas raízes das plantas (AWAD & CASTRO, 1983).

O fósforo orgânico pode representar até 3% da matéria orgânica do solo (SIQUEIRA & FRANCO, 1988), ocorrendo em teores proporcionais aos da própria matéria orgânica, podendo-se citar a relação C:P de 50:1 (RAIJ, 1987). De forma geral, o fósforo orgânico, em relação ao P total, varia de 20% a 80% e, em solos minerais, representa de 20% a 25% do total (MALAVOLTA, 1985). O fósforo orgânico vem despertando grande interesse pelo potencial em termos de nutrição vegetal, além de ser originário dos restos do próprio tecido vegetal que se decompõe no solo. Porém, a metade ou mais do fósforo orgânico presente no solo não tem sido identificada e a outra metade é constituída por fosfatos de inositol (TEDESCO, 1976). Os componentes de húmus estão diretamente relacionados com os constituintes que formam os tecidos vegetais e células de microrganismos ou seus derivados. Destas substâncias, os fosfatos de inositol, ácidos nucleicos, fosfolipídeos e moléculas que as contêm são componentes importantes da fração orgânica do solo (ALEXANDER, 1980). A mineralização da matéria orgânica depende de fatores como: material orgânico, microrganismos, temperatura, umidade, aeração e pH do solo. Esse processo ocorre, também, com a alternância de muita umidade e seca,

da mesma forma como está correlacionado à quantidade de substrato a ser decomposto (TSAI & ROSSETTO, 1992). É importante frisar que, na mineralização, há enzimas importantes envolvidas como é o caso das fosfatases que liberam o fósforo dos substratos orgânicos disponível às plantas (NAHAS, 1991).

O fósforo é um nutriente essencial às plantas, aos animais e aos microrganismos, necessário para processos bioquímicos vitais tanto para acumulação como para a liberação de energia; é um dos constituintes de compostos ricos em energia como o ATP. É essencial, também, para a síntese de carboidratos, proteínas e transporte ativo de íons. O P é componente dos ácidos nucléicos (ADN e RNA), co-enzimas, fosfoproteínas e fosfolípidos (TATE, 1984).

Apesar de sua essencialidade, este nutriente encontra-se em baixa disponibilidade no solo, sendo necessárias altas dosagens de adubos fosfatados para a obtenção de alta produtividade. A produção de adubos solúveis em água apresenta problemas, entre os quais o baixo índice de aproveitamento do minério nacional. Apesar de o Brasil possuir várias reservas de rochas fosfatadas, o uso de fosfatos naturais é pequeno e limitado a áreas próximas às jazidas (SILVA FILHO, 1998).

É importante valorizar a atividade biológica como fator importante na disponibilização do fósforo pelos microrganismos atendendo-se, assim, às necessidades das plantas. Grupos de microrganismos, que vivem no solo e

na rizosfera, são capazes de extrair e solubilizar o fósforo, inclusive dos compostos

com elevada estabilidade química assim como dos fosfatos inorgânicos naturais insolúveis por meio de diversos mecanismos (SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

2.7- Microrganismos Solubilizadores de Fosfatos

A diversidade e quantidade de organismos no solo é muito grande. Em apenas, 1cm^3 de solo podem ser encontrados milhões de bactérias, além de outros organismos. Todos esses componentes vivos, a partir da década de 70, passaram a ser denominados de “microbiomassa do solo” (RITZ et al., 1994). O solo é capaz de manter uma população diversificada segundo as suas propriedades e dentre eles muitos solubilizam fosfatos disponibilizando-os para as plantas.

As populações de microrganismos solubilizadores ocorrem em quase todos os tipos de solo e variam em função de fatores como o próprio solo, vegetação, temperatura, pH e matéria orgânica. A quantidade desses microrganismos, pode variar entre 10^5 e 10^7 por grama de solo (ALEXANDER, 1980); numericamente representam 50% da população da microbiota do solo (CHABOT et al.1993). Entretanto, encontram-se trabalhos cuja amplitudes e número destes microrganismos variam segundo o sistema de cultivo.

As populações observadas na rizosfera ou rizoplano são maiores que a do solo adjacente. De 30 a 50% dos microrganismos desta região (rizosfera) são solunilizadores (SPERBER, 1958; LOUW & WEBLEY, 1959). Eles representam uma parcela expressiva dos microrganismos do solo incluindo bactérias (*Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Brevibacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcina* e *Serratia*), fungos (*Aspergillus*, *Candida*, *Cilindrocladium*, *Oidiodendrom*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Sclerotium*) e Actinomicetos (*Micromonospora*, *Nocardia* e *Streptomyces*) (SILVA FILHO, 1998).

Estudos revelaram que espécies de microrganismos isolados do solo liberavam fosfatos em diferentes concentrações. Por esta verificação, pesquisadores passaram a determinar o número de microrganismos e sua capacidade solubilizadora em diferentes classes de solo. A capacidade solubilizadora dos microrganismos é frequentemente associada à produção de ácidos inorgânicos ou orgânicos (SPERBER, 1958, KUCEY, 1983, KIM et al., 1997) não entanto outros mecanismos podem ocorrer (ILMER et al., 1992).

O íon fosfato tem afinidade pelos cátions Ca, Fe e Al, causando a precipitação ou a adsorção e neste caso os cátions apenas estão ligados à superfície, não fazendo parte da estrutura de cristais. Para disponibilizar este fósforo para as plantas, é necessário a solubilização. Os microrganismos

podem solubilizar fosfatos como hidróxiapatitas, fluorapatitas, fosfatos tri, dicálcico, fosfatos de ferro e alumínio. (AGNIHOTRI, 1970, ILLMER et al. 1992, SILVA FILHO, 1998). Eles podem solubilizar uma ou mais fontes e apresentarem diferentes potenciais de solubilização.

Diversos trabalhos têm demonstrado o efeito de microrganismos solubilizadores de fosfatos na disponibilização de fósforo, no crescimento e aumento na produtividade de culturas.(RALSTON & MC BRIDE, 1976; CHABOT et al., 1993, KUCEY, 1987).

Isto tem despertado o interesse para a possibilidade de utilização agrônômica desses organismos. O processo de seleção, visando a produção de inoculantes ou manejo da produção do solo, envolve várias etapas iniciando-se pela avaliação da população existente, obtenção de isolados e a avaliação da capacidade do potencial de solubilização.

3- OBJETIVO GERAL

Verificar o efeito de sistemas de produção de alface (convencional e orgânico) sobre microrganismos solubilizadores de fosfato.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A) Avaliar a população de microrganismos solubilizadores de fosfatos em solos cultivados com alface em dois sistemas de produção (convencional e orgânico).

B) Obter isolados de microrganismos solubilizadores de fosfatos.

C) Verificar a capacidade e o potencial dos isolados em solubilizar fosfato de cálcio ou de alumínio.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Avaliação da População de Microrganismos Solubilizadores de Fosfatos

4.1.1 Amostragem

Para a realização deste trabalho, foram selecionadas duas propriedades produtoras de olerícolas, que utilizam sistema de cultivo convencional ou orgânico localizados no município de Antônio Carlos, no Estado de Santa Catarina, região com relevo acidentado - suave, ondulado e montanhoso, com predomínio de Cambissolo.

As amostras foram obtidas antes do plantio em 17/07/00 e na colheita em 04/09/00. Foram coletadas amostras de substrato (Plantmax®), substrato com produção de mudas e amostras de solo nas duas propriedades. A amostra de substrato Plantmax® foi coletada em três diferentes sacos, as amostras de substrato com mudas foram coletadas de bandejas destinadas aos dois produtores. Foram tomadas ao acaso três bandejas de cada produtor e nessas foram coletadas 10 mudas de alface aos 30 dias de idade (momento do plantio).

Em cada propriedade, foram coletadas amostras de solo, antes do plantio e no momento da colheita. As amostras foram realizadas com o auxílio de uma pá, coletando-se um cilindro com 10 cm de diâmetro por 20

cm de profundidade em torno da planta, em três pontos diferentes da lavoura. No momento da colheita, as amostras foram realizadas tendo-se a planta no centro da coleta, o material foi colocado em saco plástico e fechado. Todas as amostras foram mantidas à temperatura ambiente e transportadas para o laboratório.

4.1.2 Preparo das amostras

Para a realização de contagem das populações de microrganismos solubilizadores de fosfatos, as amostras foram conduzidas para o Laboratório de Microbiologia de Solo do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Neste local, as amostras passaram por uma peneira de malha de 2mm de abertura e os resíduos removidos cuidadosamente. No caso das amostras obtidas no momento da colheita, foi separado o solo não rizosférico, do solo aderido as raízes. Esta última fração foi considerada como solo rizosférico.

4.1.3 Preparo da diluição

De cada amostra, foram separadas três porções de 10g, colocadas em frasco contendo 95 mL de H₂O destilada, previamente, esterilizada. Em seguida, procedeu-se a agitação por 30 minutos, num agitador mecânico.

A partir desta suspensão, transferiu-se 1mL da diluição para o tubo de ensaio, contendo 9 ml de solução diluente, obtendo-se a diluição 10^2 . Assim outras diluições ocorreram até que se obtivesse a diluição 10^6 .

4.1.4- Contagem

De cada diluição de 10^4 a 10^6 foi transferido 1mL, para cada placa de Petri (num conjunto de três placas por diluição). Em seguida, verteram-se 10 mL de meio de cultura GEL (SYLVESTER-BRADLEY et al. 1982) modificado e corrigido o pH em 7,0, contendo 1 mL de K_2HPO_4 (5%) e 1mL de $CaCl_2$ (10%), misturados no tubo de ensaio no momento da adição. Após solidificação do meio, as placas foram invertidas e colocadas para incubar a $25^{\circ}C$ por 72 horas.

Após esse período, foram feitas as contagens das colônias. O aparecimento de um halo transparente em volta da colônia, caracterizou a presença de isolado solubilizador de fosfato.

4.2 Isolamento de Microrganismos Solubilizadores de Fosfatos

Das placas de contagem, foram selecionadas colônias que solubilizaram o fosfato, definidas pelo tamanho do halo em relação à colônia. Após a seleção das colônias, procedeu-se o isolamento, utilizando-se o método de esgotamento por estrias compostas com o auxílio de uma alça, espalhando-se

o inóculo numa placa de Petri contendo meio de cultura GEL solidificado. O processo foi repetido até obterem-se colônias puras, homogêneas ao olho nú. Esse mecanismo foi realizado por cinco vezes.

As culturas puras, em tubos com meio GEL inclinado foram mantidas em geladeira, à temperatura média de 4°C junto à coleção do Laboratório de Microbiologia de Solo, do Centro de Ciências Biológicas do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, (UFSC).

4.3- Capacidade e Potencial de Solubilização dos Isolados

A partir das culturas puras mantidas na coleção, foram feitas repicagens para tubo de ensaio com 2mL de meio de cultura GEL previamente esterilizado e inclinado, incubando-se a 25°C por 72 horas.

Nesse intervalo de tempo, prepararam-se placas de Petri com meio de cultura GEL, com suplemento de duas fontes de fósforo (Ca-PO_4 e AlPO_4). O fosfato de cálcio, foi obtido pela adição de 1mL de K_2HPO_4 a 5% e 1mL de uma solução de CaCl_2 a 10% para 10 mL de meio em cada placa. O fosfato de alumínio, na forma de suspensão 4,375g em 250 mL de H_2O , foi adicionado na proporção de 2mL da solução para cada 10 mL de meio em cada placa.

Após as 72 horas de incubação das culturas, adicionaram-se ao tubo de ensaio contendo a cultura, 3mL de H_2O destilada e esterilizada, agitando-se em seguida manualmente. Procedeu-se, então, à inoculação, utilizando-se um

bastão de arame de mais ou menos 1mm de diâmetro. Em cada placa, foram inoculados sete isolados em pontos equidistantes. As placas foram invertidas e incubadas a 25^o C por 72 horas.

Após a incubação, foi verificada a presença de área solubilizadora (capacidade de solubilizar) e feitas as medidas do diâmetro das colônias, assim como da parte translúcida (halo). Com essas medidas, obteve-se a relação halo/colônia.

4.4 - Análise Estatística

Realizou-se a análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% realizado no programa EXCEL de acordo com o delineamento completamente casualizado para três repetições. No caso específico da contagem, para cada repetição, foram realizadas três determinações para propiciar redução do erro experimental, dando uma melhor representatividade aos resultados.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 População de microrganismos solubilizadores de fosfatos

A população de microrganismos solubilizadores de fosfatos em substrato e solo oriundos de diferentes sistemas de produção de alface, variou de 10^3 a 10^7 unidades formadoras de colônias por grama de solo (UFCg⁻¹) (TABELA1). As maiores populações correspondem ao substrato com mudas aos 30 dias, onde obtiveram-se 7,6 e 7,3 x 10⁶ UFCg⁻¹ para as variedades Vera e Brisa, respectivamente, e as menores foram observadas no solo no momento da colheita 4,1 e 1,0 x 10³ UFCg⁻¹, para o sistema orgânico e convencional respectivamente. Estes resultados são semelhantes aos observados por outros autores nas mais diversas condições de solo e sistema de manejo (ALEXANDER 1980; SILVA FILHO & VIDOR, 1984; DOYLE et al., 1990).

A população existente no substrato não foi significativamente alterada pelo cultivo das mudas de alface, embora fosse de se esperar um aumento devido ao efeito rizosférico sobre a população pelos exsudatos. O efeito rizosférico no solo foi mais expressivo, no entanto, não foi estatisticamente significativo.

A rizosfera, definida como o volume de solo adjacente e influenciado pelas raízes das plantas (METTING, 1993), representa uma região de intensa atividade microbiana, principalmente devido à produção de exsudatos

TABELA 1 – População de microrganismos solubilizadores de fosfatos em substrato e solo de diferentes sistemas de produção de alface.

Procedência	População UFC g ⁻¹
Substrato	2,8 x 10 ⁶ ab ^(*)
Substrato com mudas aos 30 dias	
Variedade Vera	7,6 x 10 ⁶ a
Variedade Brisa	7,3 x 10 ⁶ a
Solo no momento do plantio	
Sistema convencional	3,8 x 10 ⁶ ab
Sistema orgânico	4,7 x 10 ⁶ ab
Solo no momento da colheita	
Solo no sistema convencional	1,0 x 10 ³ b
Solo no sistema orgânico	4,1 x 10 ³ b
Rizosfera no sistema convencional	2,4 x 10 ⁵ b
Rizosfera no sistema orgânico	1,6 x 10 ⁴ b

(*) – Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

radiculares, que podem estimular o desenvolvimento de populações microbianas distintas do solo não rizosférico, particularmente os microrganismos solubilizadores de fosfatos (SPERBER, 1958). A rizosfera age seletivamente sobre a microbiota, de tal forma que diferencia-se quantitativamente e qualitativamente do solo não rizosférico, podendo aumentar em muito essa quantificação. Esse estímulo inicia-se pela germinação da semente e alcança o máximo no florescimento, quando há amplo sistema radicular. Com a morte, o estímulo cessa e os carboidratos são rapidamente metabolizáveis (ALEXANDER, 1980).

Embora não sejam estatisticamente diferentes a comunidade de microrganismos solubilizadores de fosfatos no momento do plantio apresentou valores absolutos maiores que na colheita. Isto pode ser resultado do manejo e fertilização usados nos sistemas. Onde a aração e gradeação, junto com a adição de esterco, podem ter estimulado a população inicial.

Não foram verificadas diferenças consistentes da microbiota entre os sistemas de produção de alface. Embora não haja muitas pesquisas com relação à comparação entre o sistema convencional e o orgânico, esperava-se maior população neste sistema, porque no sistema convencional os microrganismos sofrem acentuada influência pelo uso e manejo do solo, diminuição nos teores de matéria orgânica, alteração das propriedades físicas do solo, diminuição no diâmetro das partículas e na proporção dos macroagregados (TISDALL & OADES, 1982; SOANE, 1990). A alteração

dos macroporos afeta a umidade e a aeração que é importante para a sobrevivência e para os processos metabólicos da microbiota, em sua maioria aeróbica, e necessitando um volume mínimo de aeração de 10% (DREW & LYNCH, 1980). O cultivo orgânico caracteriza-se pelo uso de restos vegetais e esterco de animais livre de agrotóxicos, esta prática favorece a retenção e manutenção da água no solo, beneficiando processos microbiológicos que são maximizados nos níveis de 50% e 70% da capacidade de campo (DOMSCH et al., 1983). O armazenamento da água diminui as variações térmicas e hídrica (ALEXANDER, 1977, VOSS E SIDIRAS, 1985) favorecendo os microrganismos do solo que têm o crescimento otimizado entre 20^o C e 40^o C (SIQUEIRA et al., 1994). O sistema convencional afeta, com o passar do tempo, os microrganismos, com graus variáveis, alterando a taxa de mineralização e o teor da matéria orgânica. O decréscimo é acentuado nos primeiros anos de cultivo (CRASWELL & WARING, 1972). Contudo, devido à complexidade dos efeitos sobre as propriedades físico-químicas do solo e das interações entre os sistemas biológicos envolvidos, tais processos são ainda poucos conhecidos (JONES et al., 1994). As populações encontradas nos dois sistemas de produção devem ser resultados do manejo adotado. Embora os dois sistemas sejam conduzidos como orgânico e convencional, as adubações utilizadas são semelhantes.

Em ambos os sistemas, é utilizado adubação orgânica com cama de aviário na proporção de 2 Kg/m². A diferença reside no fato de a

propriedade convencional, utilizar-se de adubação de cobertura com KNO_3 + Ca, Salitre de Chile (15% de Nitrogênio, 14% Potássio e porcentagens menores de Zn, Se e Ca).

5.2 Manutenção da característica solubilizadora durante o cultivo dos isolados em meio de cultivo GEL

Grande parte dos isolados perderam a capacidade de solubilizar durante o cultivo. Dos 165 isolados iniciais, após cinco transferências, o número foi reduzido a 33 (TABELA 2). A perda foi menor nos isolados procedentes de material com alta incidência de raízes (rizosfera e substrato com mudas), maior nos procedentes do solo e total nos de substrato.

A perda da capacidade de solubilização pelos isolados com o cultivo em meio de cultura tem sido observado por vários autores (EIRA, 1992). Este constitui-se em um grande problema na manutenção e na seleção de microrganismos solubilizadores de fosfatos.

5.3 - Capacidade e Potencial de solubilização de fosfatos

Dos 33 isolados que demonstraram capacidade de solubilizar fosfato de cálcio (P-Ca), nenhum solubilizou fosfato de alumínio (P-Al) (TABELA 3). A baixa incidência de microrganismos solubilizadores de fosfato de cálcio que solubilizam fosfato de alumínio, também foi verificado por SILVA FILHO

TABELA 2 – Procedência dos isolados e percentual de manutenção da característica de solubilização após cinco transferências consecutivas.

Procedência	Inicial		Final	
	Número	%	Número	%
Substrato	11	6,7	0	0
Substrato com mudas aos 30 dias				
Variedade Vera	30	18,2	4	12,1
Variedade Brisa	18	10,9	3	9,1
Solo no momento do plantio				
Sistema convencional	13	7,9	0	0
Sistema orgânico	20	12,1	0	0
Solo no momento da colheita				
Solo no sistema convencional	0	0	0	0
Solo no sistema orgânico	24	14,6	4	12,1
Rizosfera no sistema convencional	43	26,1	22	66,7
Rizosfera no sistema orgânico	6	3,6	0	0
TOTAL	165	100	33	100

Tabela 3 – Crescimento, capacidade e potencial de microrganismos solubilizadores de fosfatos isolados de cultivos de alface em meio de cultura GEL suplementado com fosfato de cálcio ou alumínio.

Isolado	Diâmetro em cm				halo/colônia
	colônia		halo		P-ca
	P-Ca	P-Al	P-Ca	P-Al	
46	0,27	1,47	0,47 gh ^(*)	0	1,7 bd
54	0,67	0,90	1,03 ad	0	1,6 bd
61	0,37	0,43	1,10 ad	0	3,1 ac
63	0,50	0	0,93 af	0	2,0 ad
66	0,57	0,70	1,07 ad	0	2,3 ad
86	0,37	0,67	0,80 bh	0	2,4 ad
89	0,27	0	0,80 bh	0	3,1 ac
93	0,37	0,77	1,03 ad	0	3,0 ad
99	0,33	0,53	0,73 dh	0	2,2 ad
101	0,33	0,70	0,73 dh	0	2,5 ad
102	0,53	0,77	0,70 dh	0	1,3 cd
104	0,40	0,73	0,40 h	0	1,0 d
115	0,37	0,27	0,70 dh	0	2,1 ad
118	0,27	0,60	0,80 bh	0	3,3 ab
123	0,33	0,80	0,83 ah	0	2,6 ad
124	0,23	0,80	0,70 dh	0	3,1 ac
132	0,33	0,73	1,00 ae	0	3,1 ac
133	0,30	0,83	0,80 bh	0	2,7 ad
136	0,47	1,10	1,27 a	0	2,8 ad
137	0,23	0,77	0,87 ah	0	3,8 a
138	0,67	0,60	1,23 ab	0	1,9 ad
142	0,20	0,80	0,53 fh	0	2,7 ad
145	0,30	0,93	1,00 ae	0	3,4 ab
146	0,30	0,73	0,80 bh	0	2,9 ad
147	0,40	0,77	0,80 bh	0	2,0 ad
150	0,33	0,90	0,83 ah	0	2,7 ad
154	0,47	0,67	0,57 eh	0	1,2 cd
155	0,30	0,60	0,77 ch	0	2,6 ad
156	0,30	0,80	0,87 ag	0	3,1 ac
157	0,40	0,83	0,77 ch	0	2,0 ad
160	0,37	0,83	1,20 ac	0	3,3 ab
163	0,43	0,27	0,93 af	0	2,3 ad
165	0,30	0,47	0,47 gh	0	1,6 bd

(*) – Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5%; ac, refere-se a abc; ad, refere-se a abcd, e assim sucessivamente.

(1998) e tem sido atribuída, em parte, ao procedimento utilizado. Os isolados são inicialmente isolados em fosfato de cálcio e após é que são avaliados no fosfato de alumínio. Isto pode induzir a uma seleção de microrganismos que solubilizam fosfato de cálcio em detrimento dos que solubilizam fosfato de alumínio.

Os isolados diferiram quanto a capacidade de solubilizar fosfato de cálcio, fato este observado por outros autores em relação a outros isolados (SILVA FILHO & VIDOR, 2000; NAHAS, 1996). Os maiores potenciais em relação ao diâmetro do halo são apresentados pelos isolados 54, 61, 66, 93, 132, 136, 138 e 160. Já para a relação halo/colônia, os maiores potenciais foram representados pelos isolados 61, 89, 118, 124, 132, 136, 137, 138, 145, 156 e 160.

Tanto o tamanho como a relação halo/colônia têm sido sugeridos como formas de avaliar o potencial de solubilização (SILVA FILHO & VIDOR, 2000), pois não se sabe qual delas se correlaciona melhor com o crescimento das plantas. O ideal seria utilizar as duas formas. Assim sendo, destacam-se os isolados 61 e 160, cujo diâmetro da área solubilizada é superior a 1,0 cm e a relação superior a 3,0, para serem utilizados em programas de seleção visando a produção de inoculante.

6 - CONCLUSÕES

Os sistemas de cultivo de alface, não afetam a população de microrganismos solubilizadores de fosfatos.

Há uma grande perda da capacidade de solubilizar fosfatos com o cultivo dos isolados em meio GEL.

Diversos isolados, destacando-se o 61 e 160 apresentam características que o qualificam a um programa de seleção visando a inoculação controlada.

7 - ANEXOS

Trabalho apresentado no:

“XXVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS DO SOLO”

Londrina - Paraná (PR) de 1 - 6 de julho de 2001.

MICROORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATOS EM CULTIVOS DE ALFACE

Elsa Aurora Mendoza de Arbieto, Luciano Alves, Germano Nunes Silva Filho. UFSC/MIP, Cx Postal 476, 88010-970, Florianópolis – SC, germano@ccb.ufsc.br.

INTRODUÇÃO

As exigências do mercado e as necessidades ambientais tem promovido alterações nos sistema de produção de alimentos, substituindo o sistema convencional por sistemas alternativos, menos agressivos ao meio ambiente, como o cultivo orgânico. Essa alteração implica em mudanças nos conceitos de nutrição de plantas e conseqüentemente nas fontes de fornecimento dos nutrientes, de forma a manter a produtividade.

Nos solos brasileiros o fósforo é o nutriente mais limitante na produção vegetal. Sua deficiência no sistema convencional de cultivo tem sido facilmente corrigido pelo uso de adubos em formas solúveis. Estas formas, no entanto, não podem ser utilizadas em cultivos orgânicos. O uso de fosfatos naturais e pó de rochas tem sido sugeridas como alternativas a essa adubação. No entanto a disponibilidade do elemento nesses materiais é baixa.

Diversos microrganismos do solo, denominados de microrganismos solubilizadores de fosfatos, possuem a capacidade de disponibilizar o fósforo de fontes insolúveis presentes no solo ou em pó de rochas contendo fosfatos (DOYLE et al., 1990; SILVA FILHO & VIDOR, 2000).

O processo de seleção destes microrganismos visando a produção de inoculantes ou o manejo dessas populações no campo, dependem do

conhecimento da presença destes organismos, sua quantificação e potencialidade em solubilizar fosfatos.

MATERIAL E MÉTODOS

A população de microrganismos solubilizadores de fosfatos foi avaliada em amostras de substrato, substrato cultivado com mudas e solo de duas propriedades que utilizam diferentes sistemas de cultivo (convencional e orgânico) de alface. As amostras de solo foram coletadas no plantio e na colheita. Nas amostras coletadas no momento da colheita, procedeu-se a separação do solo e do solo aderente as raízes e raízes. Essa última fração foi utilizada na avaliação da população rizosférica.

No laboratório, as amostras foram passadas em peneira de 2 mm de abertura. Diluições decimais em série (10^1 a 10^6) foram preparadas a partir de 10 g de material e 95 mL de água destilada esterilizada em três repetições. Das diluições de 10^4 a 10^6 foi transferido 1 mL para placa de Petri (três placas por diluição) e em seguida foi vertido 10 mL do meio GEL (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982) contendo 1 mL de K_2HPO_4 (5%) e 1 mL de $CaCl_2$ (10%). Após o período de 72 horas a $25^\circ C$ foi realizada a contagem das colônias que apresentavam halo transparente.

Culturas puras foram obtidas de colônias que apresentavam características de solubilização nas placas de contagens. As culturas que mantiveram suas

características de solubilização após a realização de cinco transferências foram avaliadas quanto a sua capacidade e potencial de solubilização em meio GEL contendo fosfato de cálcio (idem procedimento anterior) e fosfato de alumínio (3,5 g L⁻¹). Após o período de incubação foi verificada a presença de área solubilizada e feitas as medidas do diâmetro da colônia, assim como, da parte translúcida (halo). Com essas medidas foi obtido a relação halo/colônia.

RESULTADOS

A população de microrganismos solubilizadores de fosfatos variou de 10⁷ a 10³ unidades formadoras de colônias por grama de material (UFC g⁻¹) (Tabela 1). As maiores populações foram verificadas no substrato com mudas e as menores no solo no momento da colheita. Não foi verificada diferenças na população em relação aos sistemas de produção de alface.

Grande parte dos isolados perdem a capacidade de solubilizar durante o cultivo em meio de cultura (Tabela 2). Esta perda é menor nos isolados procedentes de material com alta incidência de raízes (rizosfera e substrato com mudas), maior nos procedentes de solo e total no de substrato.

Dos isolados que solubilizam fosfatos de cálcio, nenhum demonstrou capacidade em solubilizar fosfato de alumínio (Tabela 3). Os isolados diferem quanto ao potencial de solubilizar fosfato de cálcio, tanto em diâmetro da área solubilizada quanto em relação halo/colônia. Os maiores potenciais são apresentados pelos isolados 61, 89, 118, 124, 132, 136, 137, 138, 145 e, 156 e

160; destacando-se entre eles o 61 e o 160 por apresentarem diâmetro da área solubilizada superior a 1,10 cm e relação superior a 3,0.

CONCLUSÕES

- 1 – Os sistemas de cultivo de alface não afetam a população de microrganismos solubilizadores de fosfatos.
- 2 – Há uma grande perda da capacidade de solubilizar fosfato com o cultivo dos isolados em meio GEL.
- 3 – Diversos isolados, destacando-se o 61 e o 160 apresentam característica que os qualificam a um programa de seleção visando a inoculação controlada.

BIBLIOGRAFIA

- DOYLE, L.M.G. de; SCHARF, R. & SILVA FILHO, G.N. Avaliação da população e do potencial de microrganismos solubilizadores de fosfatos de solos cultivados com fruteiras temperadas em Santa Catarina. *Biotemas*, Florianópolis, 2:59-76, 1990.
- SILVA FILHO, G.N. & VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. *R. Bras. Ci. Solo*, 24:311-319, 2000.
- SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHÃES, F.M.M.; OLIVEIRA, L. A. & PEREIRA, R.M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amazon.*, 12:15-22, 1982.

TABELA 1 – População de microrganismos solubilizadores de fosfatos em substrato e solo de diferentes sistemas de produção de alface.

Procedência	População UFC g ⁻¹
Substrato	2,8 x 10 ⁶ ab ^(*)
Substrato com mudas aos 30 dias	
Variedade Vera	7,6 x 10 ⁶ a
Variedade Brisa	7,3 x 10 ⁶ a
Solo no momento do plantio	
Sistema convencional	3,8 x 10 ⁶ ab
Sistema orgânico	4,7 x 10 ⁶ ab
Solo no momento da colheita	
Solo no sistema convencional	1,0 x 10 ³ b
Solo no sistema orgânico	4,1 x 10 ³ b
Rizosfera no sistema convencional	2,4 x 10 ⁵ b
Rizosfera no sistema orgânico	1,6 x 10 ⁴ b

(*) – Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

TABELA 2 – Procedência dos isolados e percentual de manutenção da característica de solubilização após cinco transferências consecutivas.

Procedência	Inicial		Final	
	Número	%	Número	%
Substrato	11	6,7	0	0
Substrato com mudas aos 30 dias				
Variedade Vera	30	18,2	4	12,1
Variedade Brisa	18	10,9	3	9,1
Solo no momento do plantio				
Sistema convencional	13	7,9	0	0
Sistema orgânico	20	12,1	0	0
Solo no momento da colheita				
Solo no sistema convencional	0	0	0	0
Solo no sistema orgânico	24	14,6	4	12,1
Rizosfera no sistema convencional	43	26,1	22	66,7
Rizosfera no sistema orgânico	6	3,6	0	0
TOTAL	165	100	33	100

Tabela 3 – Crescimento, capacidade e potencial de microrganismos solubilizadores de fosfatos isolados de cultivos de alface em meio de cultura GEL suplementado com fosfato de cálcio ou alumínio.

Isolado	Diâmetro em cm				halo/colônia
	colônia		halo		
	P-Ca	P-Al	P-Ca	P-Al	
46	0,27	1,47	0,47 gh ^(*)	0	1,7 bd
54	0,67	0,90	1,03 ad	0	1,6 bd
61	0,37	0,43	1,10 ad	0	3,1 ac
63	0,50	0	0,93 af	0	2,0 ad
66	0,57	0,70	1,07 ad	0	2,3 ad
86	0,37	0,67	0,80 bh	0	2,4 ad
89	0,27	0	0,80 bh	0	3,1 ac
93	0,37	0,77	1,03 ad	0	3,0 ad
99	0,33	0,53	0,73 dh	0	2,2 ad
101	0,33	0,70	0,73 dh	0	2,5 ad
102	0,53	0,77	0,70 dh	0	1,3 cd
104	0,40	0,73	0,40 h	0	1,0 d
115	0,37	0,27	0,70 dh	0	2,1 ad
118	0,27	0,60	0,80 bh	0	3,3 ab
123	0,33	0,80	0,83 ah	0	2,6 ad
124	0,23	0,80	0,70 dh	0	3,1 ac
132	0,33	0,73	1,00 ae	0	3,1 ac
133	0,30	0,83	0,80 bh	0	2,7 ad
136	0,47	1,10	1,27 a	0	2,8 ad
137	0,23	0,77	0,87 ah	0	3,8 a
138	0,67	0,60	1,23 ab	0	1,9 ad
142	0,20	0,80	0,53 fh	0	2,7 ad
145	0,30	0,93	1,00 ae	0	3,4 ab
146	0,30	0,73	0,80 bh	0	2,9 ad
147	0,40	0,77	0,80 bh	0	2,0 ad
150	0,33	0,90	0,83 ah	0	2,7 ad
154	0,47	0,67	0,57 eh	0	1,2 cd
155	0,30	0,60	0,77 ch	0	2,6 ad
156	0,30	0,80	0,87 ag	0	3,1 ac
157	0,40	0,83	0,77 ch	0	2,0 ad
160	0,37	0,83	1,20 ac	0	3,3 ab
163	0,43	0,27	0,93 af	0	2,3 ad
165	0,30	0,47	0,47 gh	0	1,6 bd

(*) – Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5%; ac, refere-se a abc; ad, refere-se a abcd, e assim sucessivamente.

Meio de cultura Glicose-Extrato de Solo
(SYLVESTER-BRADLEY et alii, 1982).

Reagentes	Concentração
Glicose	10,0 g
Extrato de solo ^{1/}	100 ml
Solução de MgSO ₄ . 7H ₂ O a 10%	2 ml
Solução de CaCl ₂ a 1%	2 ml
Solução de NaCl a 10%	1 ml
Solução de micronutrientes ^{2/}	2 ml
Fe - EDTA ^{3/}	4 ml
KNO ₃	0,1 g
Agar	15,0 g
Água destilada (para volume final)	1000 ml

1/ Para o preparo do extrato aqueceu-se, em autoclave por 30 minutos, 1 kg de solo de jardim acrescentado de uma pitada de carbonato de cálcio em 1000 ml de água destilada. Após a filtragem em algodão e decantação aproveitou-se o sobrenadante.

2/ Solução contendo: 0,2g de NaMoO₄ . 2H₂O; 0,235g de MnSO₄ . 2H₂O; 0,28g de H₃BO₃; 0,008g de CuSO₄ . 5H₂O e 0,024g de ZnSO₄ . 7H₂O em 200 ml de água destilada.

3/ Solução obtida pela dissolução de 6,07g de Na-EDTA a 6,17 g de FeSO₄ . 7H₂O em 900 ml de água destilada aquecida a 80°C até a dissolução completa seguida de ajustamento do volume para 1000 ml.

Após a dissolução dos reagentes e antes da adição do agar, o pH do meio foi corrigido para 7,0 pela adição de NaOH 0,1 N.

Anexo 1 – Resumo da análise estatística da população de microrganismos solubilizadores de fosfatos

Causas de Variância	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	8	$7,06165 \times 10^{14}$	$8,82706 \times 10^{13}$	$7,37686 \times 10^{13}$
Erro Experimental	18	$2,17152 \times 10^{14}$	$1,2064 \times 10^{13}$	
Erro Amostral	54	$1,93791 \times 10^9$		
Total	80	$1,4489 \times 10^5$		

Legenda: Grau de Liberdade (GL), Soma dos Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM) e Fator (F)

Anexo 2 – Análise estatística para os isolados solubilizadores

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	32	4.4165	0,138	8,63
Erro Experimental	66	1.0667	0,016	
TOTAL	98	5.4832		

Legenda: GL (Grau de liberdade), SQ (Soma de Quadrados), QM (Quadrado Médio) e F (Fator)

ANEXO 3 - Análise estatística para crescimento dos isolados em diferentes fosfatos (Ca, Al)

CAUSAS DE VARIÇÃO	GL	SQ	QM	F
A	164	110,02	0,6709	26,59
B	1	5,07	5,07	200,97
AB	164	32,01	0,195	7,73
Erro Axostrol	660	16,65	0,025	
TOTAL	989			

Legenda: A - isolados, B - fosfatos, AB correlação, GL (grau de liberdade), SQ (soma de quadrado, QM (quadrado médio), F (fator).

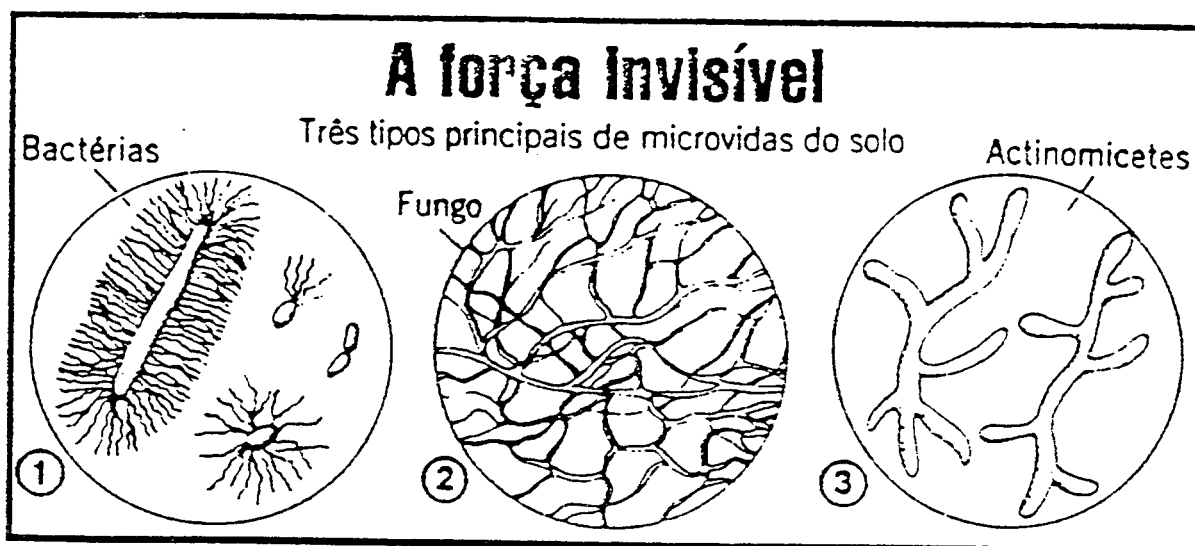
Quadro: Siglas do Tratamentos com as suas respectivas descrições

SIGLA DO TRATAMENTO	DESCRIÇÃO
S	Substrato
SC	Solo convencional
SO	Solo Orgânico
MCVB	Muda Convencional Variedade Brisa
MOVV	Muda Orgânica Variedade Vera
SCVB	Solo Convencional Variedade Brisa
SOVV	Solo Orgânico Variedade Vera
RCVB	Rizosfera Convencional Variedade Brisa
ROVV	Rizosfera Orgânica Variedade Vera

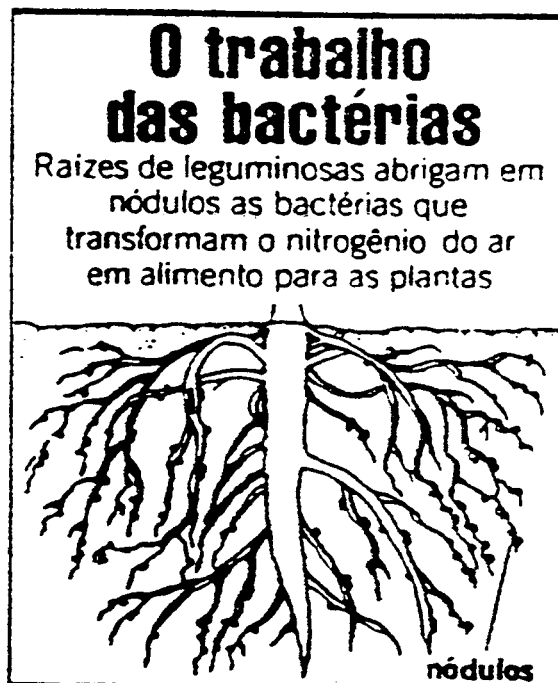
VARIETADES DE ALFACE

GRUPOS	VARIETADES
LISAS	ELISA REGINA BRASIL 303 FLORESTA ÁUREA AURÉLIA
CRESPA	GRANDE RÁPIDA VERÔNICA BRISA ELBA VERA VANESSA
AMERICANA	GRANDE LAGES MESA SALINAS TAINÁ LORCA

A FORÇA INVISÍVEL: O TRABALHO DOS MICROORGANISMOS



As bactérias são os mais ativos na decomposição da matéria orgânica. Mas, quando o solo fica ácido, elas são substituídas pelos fungos. E, quando fica seco, o trabalho é feito pelos actinomicetes.



8 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Santa Catarina é um estado que apresenta baixos teores de fósforo no solo. Há incentivo para a agricultura orgânica, fazendo-se necessário a pesquisa com microrganismos solubilizadores pois estes disponibilizariam fósforo para os vegetais e desta forma corrigindo a necessidade de adubações fosfatadas contribuindo para a sustentabilidade do sistema.

Se faz necessário colocar a relevante importância do estágio como disciplina pois proporciona experiência e maturidade profissional.

Devo dizer que o Departamento de Microbiologia me forneceu apoio e incentivo para a elaboração deste trabalho. Possui organização para o uso de suas instalações. Mas, o que me chamou a atenção foi a localização de algumas de suas instalações, na minha forma de ver não estão adequadamente colocadas, como por exemplo a capela está instalada logo a entrada do corredor, o que facilita contaminação na condução dos trabalhos.

Quanto ao curso de Agronomia é importante que reavalie o quadro de seus professores, pois a muitos deles falta-lhes metodologia de ensino importante para o incentivo do estudante e melhor formação acadêmica.

Assim como é urgente rever a carga horária do estágio curricular pois um mês é um tempo muito curto para realizar as atividades. Para trabalhos de laboratório por exemplo, é impossível realizá-los nesse intervalo de tempo.

A universidade apesar das limitações que enfrenta ainda possibilita desenvolver trabalhos de pesquisa com seriedade.

E, finalmente, concluo o meu trabalho levando a experiência de que se precisa de uma boa dose de inspiração para incluir-se no mundo da pesquisa.

9 - BIBLIOGRAFIA

- AGNIHOTRI, V. P. Solubilization of insoluble phosphates by some soil fungi isolated from nursery seedbeds. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v.16 n 9 p 877- 880, 1970.
- ALEXANDER, M. Introduction to Soil Microbiology, 2 ed. New York, John Wiley & Sons, 1977. 467p.
- ALEXANDER, M. **Introducción a la Microbiología** del suelo. México D.F. Libros y Editoriales, 1980. 491p.
- ALIMENTOS orgânicos: Selo para garantir origem e qualidade. In FNP Consultoria & Comercio. **Agriannual 2000** São Paulo; 2000 546p p 65-66.
- ALTIERI, M.A. **Agroecologia: As bases científicas da agricultura alternativa** Rio de Janeiro: 1989.
- AWAD, M.; CASTRO, P.R.C. **Introdução à fisiologia Vegetal**. Livraria Nobel S.A SP 1983.
- CERRI, C. O sabor do século 21. **Globo Rural**, n. 188 p. 47 - 49, 2 001.
- CHABOT, R.; ANTOUN, H.; CESCAS, M. P. Simulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v.39 n 10 p 941-947, 1993.
- CRASWELL, E.T. & WARING, S.A Effect of grinding on the decomposition of soil organic matter - II. Oxygen uptake and nitrogen mineralization in virgin and cultivate cracking clay soils. **Soil Biology and Biochem.** V 4 p 435 - 42. 1972.

- DOMSCH, K. H.; JAGNOW, G. & ANDERSON, T. H. An ecological concept for the assessment of side-effects of agrochemicals on soil microorganisms. **Residue Reviews**, v. 86 p 65-105, 1983.
- DOYLE, L.M.G. de; SCHARF, R.; SILVA FILHO, G. N. Avaliação da população e do potencial de microrganismos solubilizadores de fosfatos de solos cultivados com fruteiras temperadas em Santa Catarina. **Biotemas**, Florianópolis, v. 3, n. 2, p. 59 - 76, 1990.
- DREW, M.C. & LYNCH, J. M. Soil anaerobiosis microorganisms, and root function. **An Rev. Phytop.**, 18: 37 - 66, 1980.
- EIRA, F. A Solubilização Microbiana de Fosfatos. In. **Microbiologia de Solo**. Coord. ELKE J. B. N. Cardoso, Siu M. Tsai, SBCS Campinas SP. 1992.
- FASSBENDER, H. W. **Química de suelos** - com ênfasis em suelos da America Latina. Costa Rica, Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas de la OEA, 1977. 398p
- FERNANDEZ, P.D.; OLIVEIRA, G.D.; HAAG, H. P. Família *Cichoriaceae* ZINK & YAMAGUCHI: Absorção de macronutrientes pela cultura da alface. In. **Nutrição mineral de hortaliças**. Haag, H.P. e Minami, K. Fundação Cargill, 1981. 631 p.
- FILGUEIRA, F. A R. **Manual de Olericultura**: cultura e comercialização de hortaliças. V. II 2 ed. ver. E amp. São Paulo. Ceres, 1982. 357 p.
- FISCHER, G.R. **Menos veneno no prato**, alternativas aos agrotóxicos. Série Ecologia 1 - Florianópolis S.C., 1992.
- ILLMER, P. BARBATO, A; SCHINNER, F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. **Soil Biol.**

Biochem., Oxford, v 24 n 4, p 389 - 395, 1992.

JONES, C.G.; LAWTON, J.H. & SHACHAK, M. Organisms as ecosystem engineers **Oikos**, 69: 373 - 386 , 1994.

KATAYAMA, M. Nutrição e adubação de alface, chicória e almeirão. In: SIMPOSIO SOBRE NUTRIÇÃO e ADUBAÇÃO de HORTALIÇAS, 1990. Piracicaba. **Nutrição de Hortaliças. Anais.** Piracicaba: Potafos 1993, 487p. p: 141 - 146.

KHRISTEWA, L. A The participation of humic acids and their practical use in the Ukraine. **INTERNATIONAL PEAT CONGRESS, 2**, Proceedings..1953. Leningrad: Soviet Union Academy of Sciences International Society, 1953, Edinburgh: R. A Robertson. p. 543 - 558, 1953.

KIM, K.Y.; Mc DONALD, G. A; JORDAN, D. Solubilization of hydroxy apatite by Enterobacteragglomerans and cloned Escherichia coli in culture medium. **Biology and Fertility of Soils**, v.24 p. 347 - 352, 1997.

KUCEY, R.M.N. Phosphate-Solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta Soils. **Can. J. Soil Sci.**, Ottawa v.63 n 4 p. 671 - 678 , 1983.

KUCEY, R.M.N. Increased phosphorus uptake by wheat and field beans inoculated with a phosphorus-solubilizing *Penicillium biliji* strain and with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Appl. Environ Microbiol** Washington, v.53, n.12; p. 2699 - 2703, 1987.

LOUW, H. A & WEBLEY, D. M. A study of soil bacteria dissolving certain mineral phosphate fertilizers and related compounds. **J. Appl. Bact.**,

22:2 p.227 - 233, 1959.

MALAVOLTA, E. **Desordens Nutricinais no cerrado**. Piracicaba: Instituto da Potassa e Fosfato, 1985. 136 p.

METTING B. The systematics and ecology of soil algae. **Botanical Review**, 47, 195 - 312. 1981.

NAHAS, E. Factores determining rock phosphate solubization by microorganics isolated from soil. *World J. Microbiol.Biotechnol.*, 12: p 567 - 572, 1996.

PARR, J. F. et al. Sustainable Agricultural in the united States. In:ED WARDS, C.A; LAL, R. ; MADDEN, P. et al. (ed.). **Sustainable agricultural systems**. Flórida: Soil and Conservation Society. p. 50-67 1990.

PASCHOAL, A D. Agricultura Orgânica. **Rer Univ. Bras.**, São Paulo.2 n 1 p 41 - 44, 1991

PRIMAVESI, A M.: **Agricultura sustentável**, Nobel, São Paulo, 1992

RAIJ, B. V. fósforo: Dinâmica e disponibilidade no solo. **In curso de atualização em fertilidade do solo**. Coord.Francisco Maxinino Fernandez e Vinicio Martins do Nascimento. Campinas, Fundação Cargill, p 161 - 179, 1987.

RALSTON, D.B.; Mc.BRIDE, R.P. Interaction of mineral phosphate-dissolving microbes with red pine seedlings. **Plant Soil**, The Hague, 45: 1-3 p 493 - 507, 1976.

RITZ, K.; DIGHTON, J. & GILLER, K. E. **Beyond the biomass**. Chichester: Jonh Wiley & Sons, 1994. 225 p

SILVA FILHO, G.N. Solubilização de fosfatos pela microbiota do solo.Porto

Alegre, Universidade Federal do rio grande do sul, 1998. 140p. (Tese de Doutorado).

SILVA FILHO, G.N. & VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Rev Bras. Ci. Solo**, 24 p. 311-319, 2000.

SILVA, R.H.; MENDONÇA, E.S.; JUCKSCH, I. Agricultura alternativa, além de uma opção! **Opinião** v.25 n.4 out/dez. 2000.

SILVA, J. E.; LEMAINSKI, J.; RESK, D. V. S. Perdas da matéria orgânica e suas relações com a capacidade de troca catiônica em solos da região dos cerrados do oeste baiano. **Revista brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.18, p. 541 - 547, 1994.

SIQUEIRA, J, O & FRANCO, A A **Biotecnologia do solo** - Fundamentos perspectivas. Brasília, MEC - FAEPE - ABEAS, 236 p. 1988.

SIQUEIRA, J.O; MOREIRA, F.M.de S.; GRISE, B.M.et al. Microrganismos e processos biológicos do solo. **Perspectiva Ambiental**. Brasília; EMBRAPA - CNPAF , Documentos, 45. 1994.

SOANE, B. D. The role of organic matter in soil compactibility: a review of some practical aspects. **Soil & Tillage Res.**, 16: 179 - 201, 1990.

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

SRIVASTAVA, S.C.; SINGH, J.S. Microbial C, N and P in dry tropical forest soil: effects of alternative land-uses and nutrient flux. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford v.23, n. 2, p.117 - 124, 1991.

SYLVESTER-BRADLEY, R. ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S.;

MAGALHÃES, F.M.M.; OLIVEIRA, L.A & PEREIRA, R.M.

Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazon.**, 12: 15 - 22 1982.

TATE, K. R. The biological transformations of P in soil. **Plant and Soil** Dordrech, v.76, p 245 - 256, 1984.

TISDALL, J. M. & OADES, J.M. Organic matter and water-stable agregates in soils **Journal of soil science**, Edinburgh-England, 33: 141 - 163, 1982.

TSAI, S. M. & ROSSETO, R. Transformações microbianas do fósforo In: **Microbiologia do solo**. Coord. Elky Jurandy B> Nogueira Cardoso, Siu M. Tsai e Maria Cristina P. Neves. Campinas, SBCS, p 231 - 242, 1992

VOSS, M. & SIDIRAS, N. Nodulação da soja em plantio direto em coparação com plantio convencional. **Pesq. Agropec. Bras.** 20, 775 - 782, 1985.