

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**GISELA DALCIN**

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PROMOTORES DA DISPONIBILIDADE DE  
NUTRIENTES CONTIDOS EM ROCHAS, PRODUTOS E REJEITOS DE  
MINERAÇÃO**

**Florianópolis-SC  
2008**

**GISELA DALCIN**

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PROMOTORES DA DISPONIBILIDADE DE  
NUTRIENTES CONTIDOS EM ROCHAS, PRODUTOS E REJEITOS DE  
MINERAÇÃO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Santa Catarina para  
obtenção do título de  
Mestre em Biotecnologia

**Orientadores: Prof. Dr. Germano Nunes Silva Filho  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vetúria Lopes de Oliveira.**

**Florianópolis-SC  
2008**

*Dedico este trabalho:*

*Aos meus maiores amores e  
incentivadores: minha mãe Carmela,  
meu pai Tarciso, meu marido Fabricio e  
meus irmãos, Ana e Eli.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Germano Nunes Silva Filho pela confiança, oportunidade e orientação.

À Prof. Dr<sup>a</sup> Vetúria Lopes de Oliveira pela correção da dissertação, amizade, e momentos de descontração.

À Cris por ser um anjo em minha vida, pela amizade, apoio em momentos difíceis e os momentos de descontração que pudemos passar juntas durante o desenvolvimento de nossos trabalhos.

À Karina pelo convívio, amizade e auxílio na correção e sugestões ao trabalho.

À Cristhiane Rohde que mesmo com a distância contribui para o desenvolvimento deste.

Aos amigos do laboratório Hellen, Rodrigo, Thiago, Paulo, Pedro, Bianca, Luciano, Elza, Camila e Bruna pela ajuda, amizade e pelos momentos de descontração na hora do café e valiosas “sabedorias” para passar com mais alegria os momentos difíceis. Em especial ao Técnico Luiz Borges pela dedicação, amizade e auxílio na montagem do experimento.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia – UFSC, por seus ensinamentos e contribuições.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, por sempre acreditarem em mim e sempre estarem ao meu lado em todas minhas decisões, dando suporte em todos os aspectos para a realização deste trabalho.

Ao meu marido, Fabrício, por tudo que representa pra mim, pela paciência e compreensão nos momentos difíceis, pela ajuda ao desmontar os experimentos e por ficar junto comigo nos finais de semana para realização das atividades do mestrado.

Aos meus irmãos e amigos Ana e Eli por sempre me motivarem e serem a união da família Dalcin. Amo Vocês!

À FAPESC (Fundação de Apoio a Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina) por parte dos recursos destinados a condução deste trabalho.

**OBRIGADA!**

Pouco conhecimento faz com que as criaturas se  
sintam orgulhosas.  
Muito conhecimento, que se sintam humildes. É  
assim que as espigas sem grãos erguem  
desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que as  
cheias a baixam para a terra, sua mãe.

Leonardo da Vinci

# SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PROMOTORES DA DISPONIBILIDADE DE NUTRIENTES CONTIDOS EM ROCHAS, PRODUTOS E REJEITOS DE MINERAÇÃO

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo selecionar microrganismos capazes de solubilizar fósforo (P) e potássio (K) a partir de pó de rochas e rejeitos de mineração e promover uma melhor produção de matéria seca e absorção desses elementos por plantas de alface. A seleção iniciou-se com o isolamento de microrganismos solubilizadores a partir de amostras de produtos e rejeitos de mineração. O potencial solubilizador desses isolados foi avaliado em meio de cultura GEL suplementado com pó de rochas, produtos e rejeitos de mineração. O experimento foi conduzido em delineamento completamente casualizado com 14 fontes de nutrientes (13 rochas e uma testemunha) e 24 tratamentos de inoculação (23 isolados microbianos e uma testemunha não inoculada). Após 15 dias de incubação, o teor de P e K foi determinado a partir de alíquotas do meio de cultura e as melhores combinações rocha e microrganismo foram estabelecidas. O potencial dos microrganismos em disponibilizar nutrientes para as plantas a partir dessas fontes, foram estudados em dois experimentos em casa de vegetação. Na avaliação da liberação de K foram utilizadas as rochas biotitito, flogopita olivina melilitito e fonólito. Para liberação de P, foram avaliadas as rochas fonólito e flogopita olivina melilitito. A unidade experimental foi constituída de uma planta em substrato composto de turfa e vermiculita (3:1, V/V), em tubo de PVC. Os microrganismos utilizados foram os selecionados no experimento em meio de cultura. As testemunhas TNP, TNK e TNPK receberam, respectivamente, nitrogênio (N) e P; N e K, e N, P e K, sem adição de nenhum tipo de pó de rocha. Após 35 dias de cultivo analisaram-se o peso da matéria seca e os teores de P e de K. Na etapa de isolamento, foram selecionados 24 microrganismos, mas após sucessivas repicagens restaram 10 isolados. A liberação de P e K variou de acordo com o microrganismo e o tipo de rocha. Os isolados apresentaram potencial para serem utilizados na inoculação de plantas visando à solubilização de K, a partir da flogopita olivina melilitito e do fonólito e o isolado MSF-360 para liberação de P a partir do biotitito. A inoculação de microrganismos solubilizadores de nutrientes tem potencial como insumo biológico para favorecer a produção agrícola e deve ser alvo de novos estudos visando o desenvolvimento de novas tecnologias que resultem na diminuição de insumos químicos na agricultura.

Palavras-chave: adubação, inoculantes, microrganismos solubilizadores, rochas, fósforo, potássio.

## **SELECTION OF MICROORGANISMS PROMOTERS OF AVAILABILITY OF NUTRIENTS FROM ROCKS AND MINING WASTES**

### **ABSTRACT**

The main aim of this study was to select microorganisms able to solubilize phosphorus (P) and potassium (K) from rocks and mining wastes and to promote a better biomass production and nutrient uptake by lettuce plants. The initial selection took place in solid culture medium (GEL) supplemented with rock powder. The assay was performed employing a design in a completely randomized design with 14 sources of nutrients (13 different rocks and one control) and 24 inoculation treatments (23 microbial isolates and one non-inoculated control). After 15 days of incubation, the concentration of P and K in the medium was determined and the better combinations of rock and microorganisms were established. The potential of the microorganisms to liberate nutrients to the plants from the rocks was studied in two experiments under greenhouse condition. In the experiment concerning the solubilization of K, the rocks biotite, phlogopite olivine melilitito and phonolite were employed, whereas in the experiment concerning P solubilization, were employed the rocks phonolite and phlogopite olivine melilitito. As experimental unity there was one seedling growing in a mixture of peat and vermiculite (3:1, W/W), in a plastic conical pot. Microorganisms were those selected in the culture medium study. Different controls were prepared: with nitrogen (N) and P (TNP); with N and K (TNK); and with N, P and K (TNPK), without any rock or mining wastes added. After 35 days cultivation, plant dry weight and P and K contents were determined. During microbial isolation 24 microorganisms were obtained. However, after several sub cultivation steps only 10 isolates were maintained. Solubilization of P and K varied according to the microorganism and the rock or waste material. Some of the microorganisms presented potential to be utilized on the inoculation of plants in order to achieve K solubilization from phlogopite olivine melilitito and phonolite. Others have presented potential to solubilize P from biotite. Inoculation of nutrient solubilizing microorganisms (NSM) has a good potential as a biological input to improve agriculture production and must be the target of new studies aiming to develop new technologies able to reduce the use of chemicals in agriculture.

Key-words: fertilization, inoculants, solubilizing microorganisms, rocks, phosphorus, potassium.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Origem dos rejeitos e produtos de mineração.....	41
Tabela 2.2. População de microrganismos solubilizadores de fosfato em produtos e rejeitos de mineração.....	45
Tabela 2.3. Isolados de MSF obtidos de produtos e rejeitos de mineração.....	46
Tabela 3.1. Procedência e classificação dos microrganismos solubilizadores de fosfato, pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia do Solo – UFSC.....	51
Tabela 3.2. Materiais e rochas utilizadas e teor de fósforo e potássio.....	52
Tabela 3.3. Teor de K ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) solubilizado no meio glicose extrato de levedura - GEL, suplementado com pó de rochas, rejeitos e produtos de mineração inoculado com microrganismos solubilizadores, após 15 dias de incubação.....	56
Tabela 3.4. Teor de P ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) solubilizado no meio glicose extrato de levedura - GEL, suplementado com pó de rochas, rejeitos e produtos de mineração, inoculado com microrganismos solubilizadores, após 15 dias de incubação.....	61
Tabela 3.5. Coeficiente de correlação entre os níveis de P e K solubilizados, presente no meio de cultura com as respectivas rochas.....	64
Tabela 4.1 Produção de matéria seca da parte aérea ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) de plantas de alface cultivadas em substrato suplementado com diferentes fontes de potássio e inoculado com microrganismos solubilizadores de nutrientes.....	73
Tabela 4.2 Potássio na parte aérea ( $\mu\text{g planta}^{-1}$ ) de plantas de alface cultivadas em substrato suplementado com diferentes fontes de potássio e inoculado com microrganismos solubilizadores de nutrientes.....	74
Tabela 4.3 Produção de matéria seca da parte aérea ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) de plantas de alface cultivadas em substrato suplementado com diferentes fontes de fósforo e inoculado com microrganismos solubilizadores de nutrientes.....	75
Tabela 4.4 Fósforo na parte aérea ( $\mu\text{g planta}^{-1}$ ) de plantas de alface cultivadas em substrato suplementado com diferentes fontes de fósforo e inoculado com microrganismos solubilizadores de nutrientes.....	76

## LISTA DE FIGURA

Figura 4.1. Procedimento de avaliação das plantas de alface ( <i>Latuca sativa</i> ), após 35 dias de crescimento em casa de vegetação.....	70
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

AndSJLA	Andesito
ATP	Adenosina trifosfato
BCARLA	Brecha Carbonatítica
BUNAB	Alterito de Biotito da empresa Bungüe
BUNARA	Alterito de rochas alcalinas da empresa Bungüe
BUNBIO	Biotito da empresa Bungüe
Ca	Cálcio
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Fe	Ferro
Flo	Flogopita
GEL	Meio Glicose Extrato de Levedura
IBRF	Resíduo com ferro da empresa Ibirama
IBRL	Resíduo Leve da empresa Ibirama
K	Potássio
Mg	Magnésio
MSF	Microrganismo solubilizador de fosfato
N	Nitrogênio
P	Fósforo
PBFono	Fonolito de Porto Belo
PEDPO	Pó de rocha da empresa Pedrita
RIOFono	Fonolito de Rio Deserto
RNA	Ácido ribonucléico
S	Enxofre
SBLA	Lama de lavagem da empresa Saibrita
SULLA	Lama de lavagem da empresa Sul Catarinense
UFC	Unidades Formadoras de Colônia

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	x
<b>LISTA DE FIGURA</b> .....	xi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xii
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16

### **CAPITULO 1**

#### **REVISÃO DE LITERATURA**

1.1. Nutrição Vegetal.....	18
1.1.1. Fósforo.....	20
1.1.2. Potássio.....	22
1.2. Consumo de fertilizantes.....	24
1.3. Uso de rochas na agricultura.....	27
1.4. Microrganismos solubilizadores.....	30
1.4.1. Mecanismos de solubilização.....	32
1.5. Seleção de Microrganismos e Produção de Inoculantes.....	35
<b>OBJETIVOS</b> .....	38

### **CAPITULO 2**

#### **MICRORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO EM PRODUTOS E REJEITOS DE MINERAÇÃO**

2.1. Introdução .....	39
2.2. Material e Métodos .....	41

2.2.1. Material utilizado.....	41
2.2.2. Avaliação da população de microrganismos solubilizadores.....	42
2.2.3. Obtenção dos isolados.....	43
2.3. Resultado e Discussão.....	43
2.3.1. População de microrganismos solubilizadores.....	43
2.3.2 Isolamento.....	46
<b>CONCLUSÕES</b>	47

### **CAPITULO 3**

#### **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MICRORGANISMOS EM PROMOVER A DISPONIBILIDADE DE NUTRIENTES CONTIDOS EM ROCHAS, REJEITOS E PRODUTOS DE MINERAÇÃO *IN VITRO***

3.1. Introdução.....	48
3.2. Material e Métodos .....	50
3.3. Resultado e Discussão.....	54
3.3.1. Potássio solubilizado no meio de cultura.....	55
3.3.2. Fósforo solubilizado no meio de cultura.....	60
<b>CONCLUSÕES</b>	65

### **CAPITULO 4**

#### **LIBERAÇÃO DE FÓSFORO E POTÁSSIO A PARTIR DE ROCHAS POR MICRORGANISMOS SOLUBILIZADORES E O CRESCIMENTO DE ALFACE**

4.1. Introdução.....	66
4.2. Material e Métodos .....	68
4.2.1. Produção do inóculo dos microrganismos solubilizadores.....	68
4.2.2. Inoculação e Cultivo.....	69
4.3. Resultados e Discussão.....	71
4.3.1. Liberação de potássio para as plantas a partir das rochas.....	71

4.3.2. Liberação de fósforo para as plantas a partir das rochas.....	74
<b>CONCLUSÕES</b>	80
<b>DESAFIOS E PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	81
<b>REFERÊNCIAS</b>	84
<b>ANEXOS</b>	94

## INTRODUÇÃO

A fertilidade natural da maioria dos solos brasileiros limita a produção agrícola, sendo necessário o uso de fertilizantes para corrigir as deficiências nutricionais e, com isso, aumentar o rendimento das culturas. Essa prática rotineira na agricultura torna o país altamente dependente dos fertilizantes, quer seja pela necessidade de fornecimento externo da matéria prima ou do produto final, quer seja pelas altas quantidades utilizadas e pelo alto custo, gerando problemas na produção e na economia do país.

Apesar da utilização de fertilizantes provocar problemas econômicos e ambientais, é preciso aumentar a produção de alimentos para atender a demanda crescente da população brasileira e mundial. A pressão econômica, social e ecológica para limitar o uso de insumos agrícolas tem impulsionado os sistemas de produção à busca de processos alternativos, que provoquem menor impacto ambiental e social. Desta forma, a busca por alternativas mais acessíveis e de baixo impacto ambiental é, sem dúvida, um caminho a seguir.

A redução da fertilização artificial nos plantios comerciais, através de técnicas alternativas, terá um grande impacto na economia do Brasil (LIMA et al., 2002). Além de contribuir para a agricultura tradicional, contribuirá para impulsionar outro setor de produção agrícola, a agricultura orgânica, na qual a reposição dos nutrientes do solo é limitada pela proibição do uso de adubos solúveis (BRASIL, 1999).

Na tentativa de se obter um fertilizante contendo macro e micro-nutrientes, e de baixo custo, muitos materiais têm sido testados. Dentre essas alternativas estão as rochas, os produtos e os rejeitos das atividades de mineração.

No entanto, são necessários muitos anos para a natureza fragmentar as rochas, para que, então, em contato com a água, ácidos e calor, ocorra a liberação dos minerais ali

presentes. Por essa razão, a baixa solubilidade desses materiais limita o fornecimento de nutrientes para as plantas.

Na busca de novas alternativas para uma agricultura sustentável, com vistas a uma maior economia ao setor agrícola, têm destaque os trabalhos sobre a utilização de microrganismos que auxiliam o desenvolvimento das plantas.

A utilização de microrganismos na agricultura pode proporcionar benefícios aos plantios comerciais tais como a redução da necessidade de fertilização artificial do solo, dos danos causados por doenças, do uso de defensivos agrícolas e da presença de compostos xenobióticos depositados no solo, com o conseqüente estímulo ao crescimento vegetal e ao aumento na produtividade agrícola (LIMA et al., 2002).

No entanto, para que essa tecnologia possa ser utilizada rotineiramente a campo, é necessária a seleção de microrganismos capazes de solubilizar os nutrientes contidos nesses materiais oriundos das rochas, de modo a permitir sua utilização na forma de inoculantes que, aliados ao uso de pó de rochas, produtos ou rejeitos de mineração adequados, proporcionarão o fornecimento de nutrientes para as plantas, garantindo uma agricultura econômica e ambientalmente viável.

# CAPITULO 1

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Nutrição Vegetal

A partir do século XIX, químicos e botânicos descobriram que as plantas requerem elementos químicos para o crescimento. O número de elementos químicos varia de acordo com o critério adotado por cada nutricionista de planta, mas, em geral, são citados 17, que, de acordo com as quantidades requeridas pelas plantas, podem ser classificados em: macronutrientes - como o nitrogênio (N), o fósforo (P), o potássio (K), o enxofre (S), o cálcio (Ca) e o magnésio (Mg) - e micro-nutrientes, como por exemplo, o ferro (Fe) (LONERAGAN, 1997). Na ausência de qualquer um desses elementos as plantas exibem sintomas de deficiência nutricional, anomalias de crescimento e, freqüentemente, não se reproduzem normalmente.

Essas informações que retratam resumidamente a teoria da nutrição de plantas referem-se, usualmente, a livros publicados pelo químico alemão Justus von Liebig (1803-1873). Seu trabalho levou a profundas transformações na agricultura, pois aplicando seus conhecimentos de química chegou à conclusão de que os alimentos poderiam ser produzidos em maior quantidade e com maior valor nutritivo se fossem adicionados ao solo elementos

químicos em quantidades adequadas. Liebig chegou, assim, à famosa fórmula NPK e deu início à era dos fertilizantes químicos (PINHEIRO, 2003; MAAR, 2006).

O legado de Liebig foi um dos maiores do século XIX e perdura até os dias atuais, principalmente no que diz respeito à importância dos elementos minerais para a vida das plantas, tema que graças a ele, tornou-se uma disciplina científica (FURLANI, 2004).

Iniciava-se assim, uma época de descobertas marcantes nas áreas de química e microbiologia do solo - descoberta dos nutrientes essenciais, do sistema de simbiose em legumes para fixação de N atmosférico, entre outras - que permitiram avanços substanciais nas diferentes áreas da ciência do solo e possibilitaram um aumento significativo na produção de alimentos (LONERAGAN, 1997).

Para ser absorvido pela planta, um nutriente deve encontrar-se disponível na solução do solo, em contato com a superfície ativa do sistema radicular. A forma com que os diferentes nutrientes se encontram disponíveis tem sido objeto de atenção dos químicos de solo, uma vez que os nutrientes são limitantes para o crescimento das plantas, sendo extensa a literatura sobre o assunto (FURLANI, 2004; REICHARDT; TIMM, 2004).

A solução do solo possui composição variável devido a uma série de processos dinâmicos entre as fases sólidas e líquidas do solo, à absorção de nutrientes pelas raízes e ao subsequente transporte para a parte aérea da planta. Se a velocidade com que determinado nutriente passa da fase sólida para solução for pequena em relação à absorção e à necessidade da planta, será gerada uma deficiência nutricional (REICHARDT; TIMM, 2004).

A nutrição de plantas tem papel chave no século XXI, principalmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil, considerando como pontos básicos de estudo: a diagnose da deficiência e da toxidez de nutrientes nas culturas, a correção dos solos inférteis com uma quantidade mínima de fertilizantes e o desenvolvimento de cultivares com alta eficiência de utilização de nutrientes e com uma alta tolerância aos elementos tóxicos naturais dos solos.

Uma das principais limitações para a agricultura, em mais da metade das terras aráveis dos trópicos, reside na baixa fertilidade dos solos, que são, em sua maioria, ácidos e com deficiências generalizadas de nutrientes, principalmente fósforo (SANCHES; SALINAS, 1981; GOEDERT, 1983). De acordo com Vose (1983) cerca de 25 % das áreas cultiváveis do mundo têm problemas químicos severos.

Nas pesquisas sobre nutrição de plantas destaca-se o estudo do fósforo (P), que é um nutriente de grande importância nos solos tropicais, pois leva a grandes limitações nos rendimentos das culturas. A disponibilidade de P para microrganismos e raízes se constitui, freqüentemente, um fator limitante para as transformações de outros nutrientes no ecossistema terrestre, como o carbono (C) e o nitrogênio (N) (GRANT; ROBERTSON, 1997), que são dependentes de P para serem fixados.

Muitos estudos apontam o P como o macro-nutriente mais limitante nos solos brasileiros (RAIJ, 1991) e pouco se menciona sobre o potássio (K), mesmo sendo um elemento de esgotamento rápido e com perdas significativas por lixiviação. Raij (1990) cita como exemplo a região dos cerrados do Brasil, que perde com a lixiviação de 37 a 48 % do potássio aplicado.

### **1.1.1 Fósforo**

O fósforo é considerado um dos principais nutrientes limitante para o crescimento dos vegetais (GYANESHWAR et al., 2002), sendo essencial aos mesmos, pois muitos processos metabólicos dependem da presença desse elemento. O P tem relevante papel como constituinte das membranas celulares, regulador de diversas vias metabólicas, faz parte das

moléculas do DNA e do RNA e as células utilizam-no para armazenar e transportar a energia na forma de fosfato de adenosina (ATP) (FURLANI, 2004).

Segundo Cromer et al. (1993) o P tem importância decisiva no crescimento da planta, estando relacionado ao surgimento das folhas, à expansão foliar e à taxa de fotossíntese por unidade de área foliar.

O fósforo é assimilado pelas plantas preferencialmente na forma iônica monovalente ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ), que é absorvido pelas raízes e rapidamente incorporado aos açúcares (FURLANI, 2004). O número de sistemas de absorção de P encontrados nas plantas é questionável, mas hoje é mais aceito a existência de dois sistemas, um de alta afinidade que é ativado sob condições de baixa disponibilidade de P, e outro com baixa afinidade (ALMEIDA, 2002). Evidências apontam que a concentração de fósforo no vacúolo celular, assim como a concentração de P no meio externo, contribui para ativar mecanismos de regulação gênica dos transportadores de alta e baixa afinidade (RAGHOTHAMA, 1999).

O fósforo existe no solo tanto na forma orgânica quanto inorgânica, estando a maior parte indisponível para a planta. O fósforo solúvel possui uma alta reatividade com cálcio, ferro e alumínio, ocorrendo a formação de complexos de alta insolubilidade conduzindo à precipitação do fósforo disponível (GYANESHWAR et al., 2002; REICHARDT; TIMM, 2004). O fosfato de cálcio é a forma inorgânica que predomina no solo, como apatitas, em solos básicos, e os fosfatos de ferro ou alumínio em solos ácidos (CLARK; PAUL, 1988), como no Brasil.

O fósforo orgânico do solo é proveniente de restos vegetais e animais e está presente principalmente na forma de fosfato de inositol (fitatos), nos fosfolipídios e nos ácidos nucleicos (ALEXANDER, 1980; TSAI; ROSSETTO, 1992). Essas formas são disponíveis para a maioria dos microrganismos, que apresentam a capacidade de produção de fosfatases, enzimas responsáveis pela mineralização do fósforo orgânico. Podemos citar, dentre as

principais fosfatases, as fitases, as nucleases e as fosfolipases (NAHAS; ASSIS, 1992; GYANESHWAR et al., 2002).

Devido à baixa solubilidade e à deficiência de fósforo no solo, fertilizantes químicos são adicionados para aumentar a produtividade das culturas. Porém, estudos revelam que 75 % a 90 % do fertilizante adicionado se precipitam na forma de fosfato de ferro, alumínio e cálcio (VIG; DEV, 1984).

A baixa disponibilidade de fósforo para as culturas agrícolas indica a importância da busca de um maior conhecimento sobre a atuação da população microbiana na dinâmica deste elemento. Também é de grande valor o desenvolvimento de cultivares mais eficientes na absorção e, ou, utilização do P, o que pode contribuir para minimizar a necessidade de adubação e, conseqüentemente, os custos de produção da cultura.

Uma alternativa viável ao uso da adubação convencional para o melhor aproveitamento do fósforo existente, ou do adicionado, no solo é representado pelo processo de solubilização realizado por diversos microrganismos (SILVA FILHO; VIDOR, 2001).

### **1.1.2 Potássio**

Nas plantas, o K é um elemento essencial aos processos metabólicos, pois exerce papel fundamental na fotossíntese, regula a entrada de dióxido de carbono (através da abertura e fechamento dos estômatos) e atua na ativação de sistemas enzimáticos.

O K<sup>+</sup> é o cátion mais abundante no citoplasma e, juntamente com os ânions que o acompanham, tem importantes funções nas células e tecidos das plantas. O K atua na regulação osmótica, no balanço de cátions-ânions, na relação hídrica nas plantas; no

movimento dos estômatos; no alongamento celular; na estabilização do pH do citoplasma, na neutralização de ânions orgânicos e inorgânicos; na ativação enzimática para um grande número de enzimas; na síntese de proteína; na fotossíntese e no transporte de açúcares no floema (FURLANI, 2004).

Nos sistemas biológicos, o K só existe no estado monovalente de pequeno raio iônico, cuja absorção é altamente seletiva e acoplada aos processos metabólicos, apresentando elevada mobilidade dentro da planta em todos os níveis: no interior da célula, entre as células individuais, entre os tecidos e no transporte de longa distância via xilema e floema.

Assim, as plantas requerem K em altas quantidades. Por esta razão, ele é considerado um dos três principais nutrientes vegetais. Suas funções não podem ser substituídas por nenhum outro cátion monovalente. A deficiência de K diminui o crescimento das plantas e as tornam sujeitas às doenças, à quebra de talos e à suscetibilidade a outras condições de estresse (RAIJ, 1990). Sintomas esses resultantes da redução da atividade de muitas enzimas regulatórias; diminuição na concentração de amido; acúmulo de carboidratos solúveis e de compostos nitrogenados solúveis; redução na atividade das ATPases ligadas à membrana plasmática, afetando o transporte iônico; redução na síntese e na atividade da redutase do nitrato (FURLANI, 2004).

O suprimento natural de K não é suficiente para sustentar altas produções e a deficiência desse nutriente reduz significativamente as colheitas e a qualidade dos produtos. Por esta razão, o fornecimento desse nutriente ao solo tem de ser suplementado pela adubação potássica (MIELNICZUK, 1978).

O potássio pode penetrar entre as lâminas de alguns aluminossilicatos, sendo essa forma praticamente indisponível às plantas. Mas assim como outros íons, pode ser “trocado” ou substituído por outros, podendo ficar adsorvido eletricamente. Esse fenômeno de substituição é denominado troca iônica e é um fenômeno de vital importância em físico-

química de solos, pois age na retenção ou na liberação dos nutrientes às plantas, e dos sais minerais do solo (REICHARDT; TIMM, 2004).

No solo o potássio é encontrado como componente estrutural de minerais, aprisionado temporariamente entre camadas de argila, como K-trocável retido eletrostaticamente pelos colóides do solo carregados negativamente e, em uma pequena quantidade, como K-solúvel na solução do solo (RAIJ, 1990). O K-trocável e o K-solução representam a reserva imediata de potássio no solo. Quando essas formas chegam a valores baixos, os minerais primários iniciam a liberação de K para a solução (MIELNICZUK, 1978).

Em vista disso, os minerais são recursos importantes e de grande interesse na substituição da fertilização potássica. Particularmente os feldspatos que constituem a principal reserva de K do solo (MIELNICZUK, 1978).

A microbiota tem papel especial na disponibilidade de K, particularmente em solos pobres, podendo competir com as plantas pelo nutriente. Essa imobilização é temporária, pois com a morte dos microrganismos, o K é liberado das células por mineralização. A microbiota também pode contribuir na liberação de K pela decomposição de minerais silicatos (HUNGRIA; URQUIAGA, 1992).

Em vista do exposto, e sendo o K um recurso não renovável, necessita-se de um melhor aproveitamento para aumentar sua vida útil, pois o custo da fertilização potássica para o Brasil é muito alto, e o país depende da importação da quase totalidade do K que é consumido no país.

## **1.2 Consumo de fertilizantes**

A "Revolução Verde" implantada na América Latina, em meados da década de 1960, defendeu a idéia da produção de alimentos em massa por meio da manipulação do solo,

baseada na intensa utilização de insumos industrializados, irrigação e mecanização agrícola. Esse movimento foi fomentado pelo risco de uma crise mundial na produção de grãos alimentícios, o aumento da população mundial e uma perspectiva pessimista quanto à disponibilidade de alimentos no mundo (ALMEIDA, 1998).

Essa revolução influenciou o consumo de insumos agrícolas, como os fertilizantes, que cresceu exponencialmente nos últimos anos, representando 25 % da importação do setor agrícola, o que equivale a um investimento de US\$ 1,2 bilhões, constituindo-se numa desvantagem econômica para o país. Em três anos, as importações de fertilizantes aumentaram em 49 %, passando de 9,7 milhões de toneladas em 2001 para 15,4 milhões em 2004. No mesmo período, a produção nacional aumentou apenas 18 %, passando de 7,5 milhões para 8,9 milhões de toneladas. Da quantidade consumida no ano de 2003, importaram-se 91 % dos adubos nitrogenados, 64 % dos fosfatados e 95 % dos potássicos. Além disso, para a produção de fertilizantes nacionais, o país necessita importar parte da matéria prima (ANDA, 2007; BRASIL, 2005).

No ano de 2004, o Brasil atingiu um recorde de importação, mas nos anos seguintes, de 2005 a 2006, o setor agrícola brasileiro passou por uma pequena crise e viu a produção agrícola diminuir, junto com a importação de fertilizantes. O ano de 2007 já mostra, porém, uma certa recuperação. No mesmo período de janeiro a abril a importação de fertilizantes já foi maior que a do mesmo período de 2004 que foi de 945 mil e agora já chega a 1,1 milhão de toneladas, representando um aumento de 18 % na importação de fertilizantes (ANDA, 2007).

A adoção de novas tecnologias em qualquer área sempre terá conseqüências econômicas e sociais imprevisíveis. Em locais onde o sistema fundiário é desigual (muita terra na mão de poucos), como é o caso do Brasil, a necessidade de capital para os insumos químicos concentra-se na mão dos mais ricos. Assim, o pequeno produtor é o mais

prejudicado, necessitando de subsídios do governo para os insumos e sua utilização representa um alto custo para a produção (THEODORO, 2000).

A realidade observada hoje é a da desigualdade social com o aparecimento de problemas irreversíveis no tocante à sustentabilidade econômica e ecológica da produção agrícola a longo prazo (NAHAS, 1999).

Porém, a mudança na produção foi imediatista, por não considerar os componentes bióticos do ecossistema, os processos e funções ecológicas por ele mediados. Essa maneira de produzir tem-se mostrado pouco sustentável, tanto do ponto de vista econômico quanto do ecológico. De fato, esse modelo considera o solo simplesmente como meio de produção, ajustando-o às exigências das plantas e ignorando suas funções como mediador de processos globais essenciais à vida (NAHAS, 1999).

Para reverter o cenário dessa degradação progressiva é necessária a incorporação constante de avanços científicos e tecnológicos na produção agrícola, assim como de mudanças nos aspectos conceituais, regulatórios e políticos da relação atual, entre a produção e a ecologia (HUANG et al., 2002). É necessário buscar um novo modelo, capaz de garantir produção estável e viável do ponto de vista econômico, social e ecológico. Esse novo modelo deve atender a certos princípios básicos de sustentabilidade, como apresentar uma elevada eficiência biológica e econômica; um reduzido impacto ambiental; equidade social e alimentos com qualidade nutricional e seguros (TILMAN et al., 2002).

Várias práticas e tecnologias agrícolas, como o sistema de plantio direto, a rotação de culturas, os sistemas modernos e eficientes de irrigação, a agricultura de precisão, as variedades geneticamente modificadas e os cultivos orgânicos, oferecem opções e soluções para alguns dos desafios atuais e futuros da agricultura, pois viabilizam a exploração de agrossistemas produtivos, com uso reduzido de insumos químicos e cultivos conservacionistas (NAHAS, 1999).

Essas tecnologias contribuem para manter ou aumentar a produção, sem promover o avanço da agricultura para áreas que são reservas da biodiversidade, o que aumentaria os impactos negativos já tão evidentes (URQUIAGA; BOODEY; NEVES, 1999).

A “Revolução Verde” impulsionou, de fato, a produção agrícola, mas se mostra pouco sustentável, tanto do ponto de vista econômico quanto do ecológico. Uma mudança radical na agrotecnologia seria catastrófica, no atual sistema de produção e em suas necessidades, mas há necessidade em uma modificação tecnológica para tornar a produção mais segura e harmônica em termos ambientais, mudanças essas que devem ser graduais e fundamentadas no conhecimento científico.

### **1.3 Uso de rochas na agricultura**

No mesmo período que Justus von Liebig apareceu com seus experimentos sobre nutrição vegetal, Julius Hensel propunha que pó de rochas faria o mesmo efeito sem desequilibrar o meio ambiente e, ainda, com baixos custos. Julius Hensel obteve o reconhecimento do seu trabalho por apenas algumas dezenas de camponeses, além de ser processado e seu livro, *Pães de Pedra*, censurado. Somente em 1997 seu livro foi reeditado, aproveitando-se a preocupação com a qualidade nutricional e segurança dos alimentos (PINHEIRO, 2003).

O aproveitamento das rochas, como fontes restituidoras de nutrientes para as plantas, recuperadora e renovadora do solo, pode configurar uma tecnologia alternativa capaz de auxiliar na redução do uso de produtos químicos, especialmente aqueles incorporados em

formas altamente solúveis, como é o caso dos adubos em formulações NPK (PINHEIRO; BARRETO, 1996; THEODORO, 2000).

As farinhas de rochas e outros produtos foram os primeiros fertilizantes usados na agricultura: Salitre do Chile, Salitre de Bengala, Guano, Farinha de Ostras, Fosforitas, Apatitas, Basálticas, Micaxisto (PINHEIRO; BARRETO, 1996).

Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de substituir totalmente ou parcialmente os fertilizantes potássicos e fosfáticos solúveis, principalmente pelo alto custo deste insumo.

Experimentos realizados no Sri Lanka com mica flogopita e feldspato potássico, em culturas de chá e arroz, mostraram que a aplicação das rochas promoveu aumentos de cerca de 10 % da produção em duas safras seguidas, quando comparada à fertilização convencional (WEERASURYA; THILAKARATHNA; COORAY, 1996). Estudos realizados em casa de vegetação por Lôbo (1988), utilizando gnaisse como fonte alternativa de potássio, evidenciaram a importância desse elemento na nutrição vegetal e sua influência no equilíbrio sobre os teores de nitrogênio e fósforo. Em Santa Catarina, Arbieto (2005) estudando o efeito da aplicação de pó de rocha como fonte de K para alface, em casa de vegetação, observou que o granito supriu 40 % enquanto que o fonolito e a flogopita foram capazes de suprir 66 % das necessidades de K.

As jazidas de fosfatos naturais presentes em nosso país permitem que sejam conduzidos vários estudos com o objetivo de utilizar esse material em sua forma natural ou semi-industrial como fonte alternativa de fósforo para as plantas.

A eficiência dos fosfatos naturais em relação ao super-fosfato triplo tem sido considerada baixa. Além das características próprias do fosfato, como diferenças na solubilidade e na granulometria, sua eficiência é afetada por características do solo (OLIVERIA et al., 1984).

Os mesmos autores citados anteriormente relatam em seu experimento uma grande variação na eficiência dos fosfatos naturais dentro do mesmo cultivo, mas observam que com o passar do tempo há um aumento da eficiência, sugerindo uma liberação gradativa do fósforo fornecido pelos fosfatos. Braga et al. (1991) também relatam uma baixa eficiência dos fosfatos naturais de Araxá, Patos de Minas e Catalão.

Em experimento utilizando pó de basalto, Escosteguy e Klamt (1998), observaram pequenos acréscimos nos teores de nutrientes disponíveis no solo, com doses que variaram de 0 a 100 ton ha<sup>-1</sup>, e concluíram que altas dosagens poderiam atingir o resultado esperado a campo.

Trabalhos realizados com rochas como fontes de nutrientes têm apresentado resultados variados, mas Osterroht (2003) analisando esses resultados encontrou um padrão entre eles. Ele viu que os estudos que não chegavam a um resultado positivo eram ensaios conduzidos em vasos, em solo estéril ou com baixa atividade biológica, com pequenas quantidades de substrato ou realizados por um curto período, em condições de clima temperado. Dentre os resultados que apontavam para resultados positivos, as condições eram contrárias, ou seja, clima tropical, experimentos de longa duração, solos com alta atividade biológica e o material finamente moído.

O pó de rocha pode ser facilmente encontrado ou obtido em certas regiões do país. Por exemplo, no estado de Santa Catarina existem várias reservas de minerais que contêm nutrientes necessários às plantas. Na região de Lages há várias rochas alcalinas contendo fonolitos, olivina melilitita e carbonatitos ricos em K e P (SCHEIBE, 1986). No município de Anitápolis também há rochas alcalinas, como o carbonatito, e nas serras da região leste há abundância de granitos ricos em potássio (COMIN-CHIARAMONTI et al., 2002). Existem, ainda nessa região, inúmeras pedreiras que produzem brita e subprodutos, como o pó de brita, que garantem uma fonte de material a ser trabalhado.

Devido à baixa eficiência das rochas ou de seus sub-produtos, esse material tem sido pouco utilizado como fertilizante para as plantas. Sua maior desvantagem reside na dificuldade de liberação dos nutrientes que, geralmente, estão temporariamente indisponíveis para os vegetais (ESCOSTEGUY; KLAMT, 1998; BOLLAND; BAKER, 2000; HARLEY; GILKES, 2000).

Porém, pode ser vantajoso utilizar esses materiais na agricultura, pois além de permitir que pequenas reservas ou resíduos de exploração sejam aproveitados, constitui-se em adubação mais completa, com vários nutrientes, há uma menor estrutura de beneficiamento com menos danos ambientais. Entretanto, além da escolha da rocha adequada, é preciso que se estabeleça um sistema mais eficiente para promoção da disponibilidade dos nutrientes nela encontrados.

#### **1.4 Microrganismos solubilizadores**

Muitas revisões têm sido feitas sobre efeitos benéficos da inoculação de microrganismos na promoção do crescimento de plantas (GALLEGUILLLOS et al., 2000; LUGTENBERG et al., 2002; GRAY; SMITH, 2005). Os efeitos benéficos devem-se às atividades desenvolvidas pelos microrganismos, podendo ser citadas a fixação biológica de nitrogênio, a produção de metabólitos pelos microrganismos como fito-hormônios (WAISEL; ESHEL; KAFKAFI, 2002; VESSEY, 2003), o controle de organismos deletérios por antagonismo ou o estabelecimento de competição na rizosfera inibindo os fitopatógenos (SHARMA et al., 2003), a promover a disponibilidade de nutrientes, como o ferro, o fósforo

(MASALHA et al., 2000; SHARMA; JOHRI, 2003; SILVA FILHO; VIDOR, 2001; NARLOCH, 2002), e o potássio (HUNGRIA; URQUIAGA, 1992), dentre outros ainda em investigação.

A promoção do crescimento vegetal pela atividade de microrganismos que solubilizam fosfatos existentes ou adicionados ao solo vem sendo explorada desde 1903 (SPERBER, 1958; KUCEY; JENZEN; LEGGETT, 1989), quando Sackett detectou a “ação solvente” de bactérias no solo. Desde então, extensivos estudos são realizados com esses microrganismos e com minerais fosfatados que possam ser solubilizados (GOLDSTEIN, 1986, NAHAS; ASSIS, 1992, SILVA FILHO; VIDOR, 2001), dentre outros.

Os microrganismos solubilizadores são encontrados em geral no solo (KIM; JORDAN; KRISHNAN, 1997; SILVA FILHO, 1998, SILVA FILHO; NARLOCH; SCHARF, 2002), na superfície das sementes (KATZNELSON; PETERSON; ROUATT, 1962) e, também, em rochas e materiais oriundos de minas (ARBIETO, 2005).

No estudo de Narloch (2002), pode-se encontrar uma extensa revisão dos microrganismos solubilizadores de fosfato, onde citam-se vários gêneros de bactérias e fungos, incluindo fungos micorrízicos. Como exemplo de algumas bactérias, citam-se *Pseudomonas*, *Erwinia herbicola* (GOLDSTEIN, 1986), *Bacillus*, e membros da família *Enterobacteriaceae* (SILVA FILHO; VIDOR, 2001). Dentre os fungos, merecem destaque os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (KUCEY, 1987; SILVA FILHO; VIDOR, 2001). Citam-se, ainda os gêneros *Paecilomyces*, *Rhizopus* e *Fusarium* (AGNIHORTRI, 1970; CHABOT; ANTOUN; CESCAS, 1996; SILVA FILHO; VIDOR, 2001).

Os fungos micorrízicos formam uma categoria bem conhecida e de grande importância na agricultura, já foram relatados casos onde os fungos ectomicorrízicos atuam na solubilização de fosfatos inorgânicos (LEYVAL; BERTHELIN, 1986; GOMES; OLIVEIRA; SILVA FILHO, 1992).

A eficiência de solubilização difere entre gêneros e famílias de microrganismos, tendo sido observados muitos casos em que a eficiência dos fungos é mais evidente, apesar de bactérias solubilizadoras serem encontrados em maior número (ALEXANDER, 1980; EIRA, 1992).

Os microrganismos envolvidos na solubilização de fosfatos também podem auxiliar o crescimento da planta por outros mecanismos, além daquele advindo da solubilização, como por exemplo, pelo aumento da eficiência da fixação biológica de nitrogênio. Sabe-se que o fósforo é o fator limitante para fixação de nitrogênio pela simbiose rizóbio-leguminosas, aumentando a disponibilidade de outros elementos ou produzindo substâncias promotoras de crescimento de plantas (CHABOT et al., 1998; GYANESHWAR et al., 2002), como substâncias promotoras do crescimento de plantas (citocinas, giberelinas, ácidos indol-3-acético) (GONZALES-EGUIARTE; BAREA, 1975; LEINHOS; VACEK, 1994) e vitaminas (riboflavina, niacina e vitamina B12) (STRZELCZYK; ROZYCKI, 1985).

#### **1.4.1 Mecanismos de solubilização**

Existem dois mecanismos de ação exercida pelos microrganismos sobre o meio, que contribuem para a solubilização do fósforo insolúvel. O primeiro é através da atividade enzimática específica das enzimas fosfatases que hidrolisam o P-orgânico, como fitatos, fosfolipídios e ácidos nucleicos, liberando o fósforo em formas de assimilação fácil e imediata, conhecido como **mineralização** (NAHAS; TEREZI; ROSSI; 1982).

Essa atividade, porém, é limitada pela capacidade dos microrganismos de absorver fósforo, isto é, ela tende a diminuir ou cessar no momento em que esses seres estão “saturados” desse elemento essencial. Assim, a solubilização de fósforo estaria condicionada às necessidades microbianas, não se podendo esperar que a sua contribuição para o solo seja ilimitada, ou proporcional meramente à quantidade de fósforo insolúvel existente no meio (NELSON et al., 1976).

Os mecanismos de solubilização que tem grande importância, por colocar à disposição das plantas fósforo disponível, ocorrem principalmente pela **produção de ácidos inorgânicos, orgânicos e/ou pela diminuição do valor do pH** pelos microrganismos solubilizadores de fósforo (GYANESHWAR et al., 2002; NARLOCH, 2002).

Bolan et al. (1994) verificaram que a aplicação de vários ácidos orgânicos de ocorrência normal em solos, tais como: málico, láctico, fórmico, acético, oxálico, tartárico e cítrico, a amostras de solos de diferentes composições mineralógicas e teores de carbono diversos promoveu um aumento da solubilização do fosfato monocálcico e rocha fosfática. Esses ácidos podem ser produzidos pelo próprio metabolismo microbiano (CUNNINGHAM; KUIACK, 1992; KIM; MCDONALD; JORDAN, 1997) e, também, ser encontrados nos exsudatos das raízes das plantas.

Os ácidos orgânicos podem agir como acidificante do meio ou podem funcionar como agente quelante ou complexante, formando compostos com cálcio, ferro e alumínio (SPERBER, 1958; WHITELAW, 2000).

Illmer e Schinner (1992) concluíram que a produção de ácidos orgânicos não é o principal mecanismo envolvido na solubilização de fosfatos, ao encontrar apenas três ácidos produzidos por bactérias solubilizadoras, dentre as 24 testadas. Esses autores consideram a possibilidade de acidificação do meio através da **liberação de prótons  $H^+$** , em um processo de troca catiônica ou a partir da cadeia respiratória.

Outro mecanismo, inespecífico, resulta da **acidificação do meio pela presença de gás carbônico**, resultante da atividade respiratória e da decomposição da matéria orgânica, resultando na presença de  $H_2CO_3$  (MARSCHNER, 1995). Neste caso, a solubilização dos fosfatos se dá independentemente da demanda específica de fósforo e passa a ser proporcional às quantidades disponíveis de matéria orgânica a ser degradada, como fonte de carbono e de energia (BRANCO; MURGEL; CAVINATTO, 2001).

Além dos mecanismos citados acima, pode-se citar, ainda, o consumo de cálcio e ferro pelos microrganismos. Ao consumir esses compostos acompanhantes dos fosfatos, os microrganismos tornam o fósforo disponível às plantas (NARLOCH, 2002).

A habilidade da solubilização do fósforo depende de vários fatores, como a natureza da fonte de nitrogênio, a fonte de carbono presente, e o tipo do fosfato (SILVA FILHO; VIDOR, 2000), pois a maioria dos microrganismos solubiliza fosfato de cálcio, sendo raros aqueles que conseguem solubilizar fosfato de ferro ou de alumínio (GYANESHWAR et al., 2002).

Com relação ao aspecto genético da solubilização, Goldstein (1986) acredita ser razoável a existência de um sistema genético nas bactérias que auxiliaria o acesso aos minerais disponíveis no meio externo. Portanto, ferramentas de genética moleculares têm sido utilizados para se entender a base genética da solubilização de fosfato; característica fenotípica conferida pelo gene *mps* (mineral phosphate solubilization) (BABU-KHAN et al., 1995).

Chabot et al. (1998) introduziram a capacidade de solubilização em microrganismos que não expressavam essa característica, obtendo resultados positivos em relação ao crescimento vegetal. Mas, não se pode esperar que a solubilização de fosfatos seja expressa por um único gene ou por um grupo de genes e que seja comum a todos os microrganismos solubilizadores (NARLOCH, 2002).

Diversos microrganismos conseguem solubilizar o K através da decomposição de minerais silicados. Hungria e Urquiaga (1992) relatam em sua revisão o crescimento de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus* e *Penicillium* em meio de cultura deficiente em K, ao qual se adicionou uma rocha. Os mesmos autores relatam que o K pode ser liberado de minerais como biotita, muscovita, ortoclásio entre outros. Wallander e Wickman (1999) relatam a utilização de K de biotita e microclínio por ectomicorrizas em *Pinus* e Yuan et al. (2004) relatam utilização de flogopita e vermiculita em eucalipto por fungos ectomicorrízicos.

A liberação do K desses minerais ocorre principalmente pela ação de ácidos orgânicos e inorgânicos produzidos pela atividade biológica (WALLANDER; WICKMAN, 1999; HARLEY; GILKES, 2000; YUAN et al., 2004) que agem pela liberação de H<sup>+</sup> ou como complexantes. Por outro lado, a própria remoção do K solúvel pela assimilação microbiana favorece a liberação do K dos minerais, aumentando o gradiente de concentração durante a reação de hidrólise dos minerais (ALEXANDER, 1980; HARLEY; GILKES, 2000).

## 1.5 Seleção de Microrganismos e Produção de Inoculantes

Duas estratégias têm sido aplicadas para a utilização dos microrganismos solubilizadores: (1) o isolamento e cultivo de microrganismos a partir do solo, ou de locais de interesse, por exemplo, de rochas, e (2) a manipulação das condições de cultivo dos microrganismos.

A atividade de solubilização dos organismos tem despertado o interesse de pesquisadores e produtores, para o desenvolvimento e aplicação de inoculantes microbianos,

como forma de favorecer a disponibilidade de nutrientes existentes no solo ou adicionados na forma de fertilizantes pouco solúveis como, por exemplo, o pó de rocha.

Recentemente, um conceito alternativo tem surgido, sendo denominado de “manipulação biológica”, o qual reconhece o papel regulatório da população biológica em vários processos no ambiente. Sob essa nova concepção, o aumento da manipulação de atividades da biota no solo se tornou um componente adicional na prática de manipulação dos solos (SWIFT, 1999).

A base biológica do solo vem sendo explorada incessantemente, para o conhecimento da genética, fisiologia, bioquímica e ecologia dos organismos presentes no solo, para propósitos práticos. Muitas tecnologias biológicas para o solo têm sido eficientes, como a inoculação de micro-simbiontes e organismos rizosféricos, o controle biológico, a manipulação de processos de compostagem, entre outros.

O uso da inoculação microbiana na agricultura, como forma de “manipulação biológica”, teve início com as leguminosas, devido a sua associação com bactérias fixadoras de nitrogênio. A inoculação já ocorria no princípio do século XIX, na Inglaterra, quando o transporte de terra era realizado de um local para outro, com o objetivo de enriquecer uma nova área para agricultura. O início de sua produção ocorreu na primeira metade do século XX, sendo o primeiro inoculante produzido em ágar, mas devido à fragilidade da embalagem, à necessidade de manutenção em baixa temperatura e a pouca durabilidade, sua difusão e utilização foi limitada (ARAUJO; HUNGRIA, 1994).

Somente no final da década de 20, com o uso da turfa como veículo para o inoculante, houve um incremento na utilização desse insumo. Outros veículos de inoculação foram testados, como óleo diesel, óleo mineral e querosene, mas Araújo e Hungria (1994) relatam que não foram eficientes. Atualmente os tipos de veiculação de inoculante mais conhecidos são as formas líquidas e em substrato sólido, em geral turfa. No caso de fungos micorrízicos

está se testando a forma encapsulada, pois demonstram maior viabilidade do inóculo, facilidade de manuseio e armazenamento e menor volume a ser utilizado (MAUPÉRIN et al., 1987; ROSSI; OLIVEIRA; SOUZA, 2002; ROSSI; OLIVEIRA; FURIGO JUNIOR, 2007).

Para que a inoculação seja bem sucedida, além de um bom veículo de inoculação, é necessário que o inoculante apresente um número de células viáveis que tenham condições para colonizar o solo (CLARK; PAUL, 1988), mesmo na presença das populações nativas de microrganismos. Portanto, deve-se pensar em estratégias que permitam o estabelecimento do número de uma população desejada.

A produção de inoculante requer rigor nos estágios de seleção, propagação e manipulação de isolados eficientes. O rigor tem que ser estendido ao estágio onde o uso controlado possa ser previsto como a aplicação em larga escala. Entretanto, isto requer que a produção do inóculo seja economicamente viável, tenha qualidade constante, e forma de armazenamento por longos períodos sem a perda da capacidade de infecção (MAUPÉRIN et al., 1987).

Assim, a busca por isolados que apresentem alto potencial de solubilização e colonização do solo, é uma tarefa constante.

# OBJETIVOS

## Objetivo geral

✓ Obter microrganismos capazes de liberar potássio e fósforo presentes em rochas, produtos e rejeitos de mineração.

## Objetivos específicos

✓ Quantificar e isolar microrganismos solubilizadores de nutrientes presentes em produtos e rejeitos de mineração;

✓ Selecionar e avaliar o potencial de isolados microbianos na promoção da disponibilidade de potássio e fósforo em pó de rochas, produtos e rejeitos de mineração, em teste *in vitro*; em meio de cultura líquido;

✓ Selecionar rochas e microrganismos no suprimento de fósforo e potássio no cultivo de alface em condições de substrato estéril.

## **CAPÍTULO 2**

### **MICROORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO EM PRODUTOS E REJEITOS DE MINERAÇÃO**

#### **2.1 INTRODUÇÃO**

Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e estão associados a diversos processos ecológicos, desempenhando funções cruciais na manutenção do ecossistema. São, assim, componentes fundamentais da cadeia alimentar e dos ciclos biogeoquímicos (SCHIMEL, 1995; MYERS, 1996; ZILLI et al., 2003).

A diversidade genética e metabólica dos microrganismos tem sido explorada há muitos anos visando à obtenção de produtos biotecnológicos, como antibióticos (estreptomicina, penicilina etc.), alimentos naturais (cogumelos) e processados (queijo, iogurte, vinagre, molho de soja, vinho, cerveja etc.), ácidos orgânicos (cítrico e fumárico), álcoois (etanol), e de processos tais como tratamento e/ou remediação de resíduos (esgotos domésticos, lixo), controle biológico de pragas e doenças de plantas e a fertilização do solo (fixação biológica do nitrogênio) (CARDOSO; TSAI; NEVES, 1992).

A descoberta de microrganismos com potencial para participar de processos biotecnológicos traz benefícios econômicos, como a descoberta de novos antibióticos e agentes terapêuticos; probióticos; produtos químicos; enzimas e polímeros para aplicações industriais e tecnológicas; biorremediação de poluentes; e biolixiviação e recuperação de

minérios. Pode-se citar, ainda, a otimização da capacidade microbiana para a despoluição das águas e a fertilização dos solos, dentre outras buscas (LIMA, 2002).

Apesar de sua grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 10 % dos microrganismos existentes no planeta tenham sido descritos e caracterizados (STALEY; GOSINK, 1999). Com o desenvolvimento da pesquisa básica, espera-se uma maior compreensão da diversidade microbiana e de suas interações com componentes da natureza, como as plantas, por exemplo.

O valor biotecnológico dos microrganismos, avaliado pelo potencial de aplicação direta em processos ou pelo valor de mercado dos produtos obtidos das atividades microbianas. O valor indireto das biotecnologias baseadas em processos microbianos, contudo, é raramente contemplado, tais como os benefícios ambientais e sociais oriundos dessa atividade (SCHIMMEL, 1995).

O uso de microrganismos capazes de liberar nutrientes de formas minerais insolúveis, aliado ao uso de pó de rochas, constitui uma alternativa viável à utilização de adubos solúveis na nutrição de plantas, promovendo o aumento da produção e a redução de custos de produção e de danos ambientais (PINHEIRO; BARRETO, 1996; THEODORO, 2000).

O trabalho de seleção de microrganismos disponibilizadores de nutrientes vem sendo realizado pelo Laboratório de Microbiologia do Solo (UFSC) há vários anos, na busca de bons isolados microbianos e tendo em vista a produção de inoculante. Para se atingir esse objetivo, as pesquisas iniciam-se com a avaliação das populações de microrganismos presentes nos materiais de interesse, seguindo-se do isolamento para obtenção de culturas puras e da posterior avaliação de sua capacidade solubilizadora.

Nesse âmbito, esse trabalho teve como objetivo avaliar populações microbianas presentes em produtos e rejeitos de mineração, isolar e selecionar microrganismos

solubilizadores dessas populações e avaliar o efeito da inoculação desses microrganismos, em plantas crescendo sob condições de casa de vegetação.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Material utilizado

Amostras de rejeito e produtos de mineração foram coletados no Estado de Santa Catarina com auxílio e orientação do Prof. Edison Tomazzoli do Departamento de Geografia da Universidade Federal de Santa Catarina. A descrição dos materiais e seus respectivos locais de coleta são apresentados na tabela 2.1.

Tabela 2.1. Origem dos rejeitos e produtos de mineração.

Amostras	Empresa	Local
Alterito de rochas alcalinas	BUNGÜE	Rio Pinheiro/Anitápolis - SC
Alterito de biotitito	BUNGÜE	Rio Pinheiro/Anitápolis - SC
Rejeito de mineração	IBIRAMA	Águas Mornas - SC
Material separado do rejeito	IBIRAMA	Águas Mornas - SC
Lama da lavagem da areia artificial	SAIBRITA	Forquilhas/São José - SC
Pó de granito	SAIBRITA	Forquilhas/São José - SC
Lama da lavagem da areia artificial	SUL CATARINENSE	Sorocaba/Biguaçu - SC
Areia não lavada	SUL CATARINENSE	Sorocaba/Biguaçu - SC
Pó de rocha	PEDRITA	São Miguel/Biguaçu - SC
Fonólito moído	PORTO BELO	Lages - SC

### 2.2.2 Avaliação da população de microrganismos solubilizadores

A população de microrganismos solubilizadores de fosfato presentes nas amostras foi avaliada pela técnica de diluição decimal e cultivo em meio de cultura. De cada amostra, foram separados 10 g de material que foram colocados em frascos contendo 95 ml de água destilada estéril. Esse procedimento foi realizado em triplicata para cada amostra analisada.

As unidades experimentais (frascos contendo água destilada estéril e amostra) foram colocadas sob agitação constante para homogeneização, por 30 minutos, em uma mesa agitadora.

A partir da suspensão, transferiu-se 1 ml para tubo de ensaio contendo 9 ml de água destilada esterilizada, obtendo-se, após agitação manual, a diluição  $10^1$ . Um ml dessa diluição foi transferido para outro tubo contendo 9 ml de água destilada esterilizada, obtendo-se a diluição  $10^2$ , e assim sucessivamente até obtenção da diluição  $10^7$ .

De cada diluição transferiu-se 1 ml para uma placa de Petri esterilizada. Em seguida, foram adicionados à placa 10 ml de meio de cultura glicose extrato de levedura - GEL (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982; modificado por SILVA FILHO, 1998) (Anexo A) fundido e resfriado a  $\pm 50$  °C, ao qual tinha sido adicionados 1 ml de  $K_2HPO_4$  a 5 % e 1 ml de  $CaCl_2$  a 10 %. A mistura foi homogeneizada com a diluição, seguindo o procedimento da técnica Pour Plate. Após a solidificação do meio, as placas foram invertidas e incubadas em incubadora BOD a  $25 \pm 1$  °C por 72 h. Para cada diluição foram preparadas três placas.

Após esse período de incubação, realizou-se a contagem das colônias que apresentavam um halo transparente em volta, caracterizando a presença de microrganismos solubilizadores de fosfato (KUCEY, 1983). Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia por grama de amostra (UFC  $g^{-1}$ ).

Os dados foram submetidos à análise de variância de acordo com o delineamento completamente casualizado com três repetições e três determinações para cada repetição e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 %. Para a realização da análise, os dados foram transformados pela fórmula  $\sqrt{x+1}$ , onde x corresponde ao número de UFC.

### **2.2.3 Obtenção dos isolados**

Das placas de contagem foram selecionadas as colônias com características que indicavam solubilização do fosfato, definidas pelo tamanho do halo em relação ao diâmetro da colônia. Após a seleção das colônias, procedeu-se ao isolamento, utilizando-se o método de esgotamento por estrias compostas, com o auxílio de uma alça de platina esterilizada para espalhar o inóculo na superfície de 10 ml de meio GEL suplementado com fosfato de cálcio, em placa de Petri. O processo foi repetido até obtenção de colônias puras, homogêneas a olho nu. Esse procedimento foi realizado por, no mínimo, cinco vezes.

Os isolados que mantiveram a capacidade de solubilização após os repiques foram mantidos e cultivados continuamente no meio GEL em tubos e armazenados a 4 °C.

## **2.3 RESULTADO E DISCUSSÃO**

### **2.3.1 Populações de microrganismos solubilizadores**

O material foi inoculado no meio de cultura em que a única fonte de fósforo era constituída por fosfato insolúvel, composto este que forma um precipitado branco tornando o meio opaco. Ao crescerem, as colônias que dissolveram o fosfato, formaram um nítido halo

transparente em torno de cada colônia, o que foi suficiente para que a espécie em questão fosse considerada solubilizadora de fosfato (EIRA, 1992).

Partindo-se do princípio de que os materiais (rejeito de minas ou rochas) semeados foram obtidos de ambientes pobres em formas solúveis de fosfatos, havia grande possibilidade de existir nesses locais microrganismos capazes de obter o fósforo necessário a partir das fontes insolúveis presentes. Assim, foi observado que população de microrganismos solubilizadores de fosfato variou de 0 a  $3 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup>, e que o número de microrganismos diferiu entre as diferentes amostras (Tabela 2.2). Tal diferença pode estar relacionada com o teor de nutriente presente em cada material.

Esses valores são menores que os encontrados em solos e podem estar relacionados às características do material utilizado, que apresenta baixo teor de matéria orgânica. Resultados semelhantes foram observados por Arbiato (2005).

Não houve relação entre os resultados e a origem das amostras, pois materiais coletados no mesmo local, como o alterito de rochas alcalinas e o alterito de biotitito, apresentaram valores diferentes. O primeiro apresentou o maior número de microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF), enquanto que no outro material não foi detectado presença desses microrganismos. O alterito de biotitito apresentou abundância de um único tipo de microrganismo, que foi selecionado para avaliação da capacidade de solubilização, mesmo não tendo apresentado essa capacidade na etapa de isolamento (MSF-366).

Comparando-se esses resultados com os de Arbiato (2005), observa-se um número semelhante de microrganismos na maioria dos materiais. Em alguns casos, porém, esse número foi maior, fato este que está relacionado ao tratamento diferenciado a que foi submetido o material de análise. No presente estudo, o material não foi moído ou seco, e a origem do material (rejeito de rocha) apresentava certo grau de matéria orgânica.

Tabela 2.2. Populações de microrganismos solubilizadores de fosfato em produtos e rejeitos de mineração.

Amostras	UFC g <sup>-1</sup>
Alterito de rochas alcalinas – Bungüe	3,0 x 10 <sup>3</sup> a <sup>(1)</sup>
Rejeito de mineração – Ibirama	2,3x10 <sup>3</sup> a
Material separado do rejeito – Ibirama	1,5 x 10 <sup>3</sup> ab
Lama da lavagem da areia artificial – Saibrita	2,4 x 10 <sup>2</sup> ab
Pó de granito – Saibrita	1,4 x 10 <sup>2</sup> ab
Fonólito moído – Porto Belo	1,2 x 10 <sup>2</sup> ab
Areia não lavada – Sul Catarinense	6,1 x 10 <sup>1</sup> b
Pó de rocha – Pedrita	5,6 x 10 <sup>0</sup> b
Lama da lavagem da areia – Sul Catarinense	2,2 x 10 <sup>0</sup> b
Alterito de biotitito – Bungüe	0 b

<sup>(1)</sup> Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05\%$ ).

Os números de microrganismos encontrados em produtos e rejeitos de mineração são inferiores àqueles de microrganismos solubilizadores de fosfato de vida livre encontrados em solos. Neste último caso, os números de microrganismos que têm sido relatados encontram-se entre 10<sup>4</sup> a 10<sup>7</sup> propágulos por g<sup>-1</sup>, dependendo das condições de fertilidade, do pH, da temperatura, do manejo do solo e do método de avaliação (SILVA FILHO; VIDOR, 2001; DOYLE; SCHARF; SILVA FILHO, 1990; EIRA, 1992; SILVA FILHO et al., 1993). Esse número elevado, presente no solo e na rizosfera, comparado ao encontrado nos materiais e rejeitos de rochas, pode estar relacionado principalmente às diferenças nos teores de matéria orgânica e à presença de exsudatos das plantas no caso do solo (SPERBER, 1958; AGNIHOTRI, 1970).

### 2.3.2 Isolamento

Das 24 colônias de microrganismos selecionadas, a maior parte era de bactérias (15) e 9 fungos, assim caracterizados pela observação de suas estruturas em microscópio óptico. Estudo semelhante conduzido por Kucey (1983), em solo, também indicou o predomínio no isolamento de bactérias solubilizadoras.

Quatorze isolados que mostraram habilidade de solubilizar fosfato deixaram de apresentar essa característica após as sucessivas repicagens. Observação também relatada por Kucey (1983), Illmer e Schinner (1992), principalmente em relação aos isolados de bactérias. De forma semelhante, todos os microrganismos que apresentaram esse comportamento no presente estudo foram isolados de bactérias, e destes apenas um manteve a habilidade solubilizadora, tendo sido incluído na coleção de culturas de MSF do Laboratório de Microbiologia do Solo (Tabela 2.3).

Das dez amostras de produtos e rejeitos de mineração avaliadas, cinco contribuíram com isolados. A amostra da empresa Saibrita contribuiu com quatro isolados, a Sul Catarinense e a Ibirama (rejeito de mina) com dois isolados cada e o material Ibirama (material separado) e Bungüe (alterito de biotitito) contribuíram com um isolado cada (Tabela 2.3).

Tabela 2.3. Isolados de MSF obtidos de produtos e rejeitos de mineração.

Isolados	Grupo	Origem
<b>MSF 357</b>	Fungo	Pó de granito – Saibrita
<b>MSF 358</b>	Fungo	Areia não lavada – Sul Catarinense
<b>MSF 359</b>	Bactéria	Material separado do rejeito – Ibirama
<b>MSF 360</b>	Fungo	Pó de granito – Saibrita
<b>MSF 361</b>	Fungo	Areia não lavada – Sul Catarinense
<b>MSF 362</b>	Fungo	Rejeito de mineração – Ibirama
<b>MSF 363</b>	Fungo	Rejeito de mineração – Ibirama
<b>MSF 364</b>	Fungo	Pó de granito – Saibrita
<b>MSF 365</b>	Fungo	Pó de granito – Saibrita
<b>MSF 366</b>	Fungo	Alterito de biotitito – Bungüe

## CONCLUSÕES

O número de microrganismos solubilizadores de fosfatos em produtos e rejeitos de mineração é inferior aos números encontrados em amostras de solo.

A maior parte dos microrganismos, particularmente as bactérias, perde a capacidade de solubilizar fosfatos após sucessivas sub-culturas.

## **CAPÍTULO 3**

### **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MICRORGANISMOS EM PROMOVER A DISPONIBILIDADE DE NUTRIENTES CONTIDOS EM ROCHAS, REJEITOS E PRODUTOS DE MINERAÇÃO *IN VITRO***

#### **3.1 INTRODUÇÃO**

Os microrganismos são componentes vitais de todos os ecossistemas. No solo, cumprem papel importante no fluxo energético, na produção de metabólitos, na estruturação do solo e na ciclagem de nutrientes essenciais ao crescimento das plantas (CLARK; PAUL, 1988). Entretanto, têm sido, até o presente, freqüentemente negligenciados na agricultura convencional.

Uma das etapas clássica do processo de busca e descoberta de microrganismos com potencial de uso biotecnológico passa pela coleta do material biológico, seguida da seleção e triagem das características desejadas, seleção final do(s) melhor(es) candidato(s) a partir de uma lista reduzida de opções. Esse processo culmina com o desenvolvimento de um produto comercial ou processo industrial (BULL; WARD; GOODFELLOW, 2000).

Para serem utilizados em um programa de inoculação controlada visando a promoção de nutrientes para as plantas, os microrganismos devem apresentar capacidade ou potencial de solubilização de diferentes fontes de nutrientes e com alta eficiência. O processo de seleção

deve levar em conta o grande número de diferenças ecológicas e fisiológicas apresentada pelos microrganismos, utilizando-se, para isto, o maior número de isolados possíveis e de diferentes locais coletados.

Diferenças na capacidade e no potencial dos microrganismos na solubilização de nutrientes contidos em rochas são afetadas por vários fatores (BANIK; DEY, 1982; DOYLE; SCHARF; SILVA FILHO, 1990), dentre eles o tipo de mineral presente em sua composição (BIGARELA; BECKER; dos SANTOS, 1994). Sendo assim, é essencial testar os microrganismos quanto a esse potencial, a partir de diferentes rochas disponíveis na região.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial dos microrganismos em solubilizar fósforo e potássio em meio de cultura, a partir de rochas, produtos e rejeitos de mina, provenientes do Estado de Santa Catarina.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Vinte e três isolados pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina (Tabela 3.1), foram avaliados quanto ao potencial em liberar fósforo e potássio em meio de cultura GEL líquido (SYLVESTER–BRADLEY et al., 1982) modificado (Anexo A), suplementado com diferentes tipos de rochas, rejeitos ou produtos de mineração (Tabela 3.2) previamente moídos em moinho de bolas de porcelana.

As rochas e materiais utilizados compreenderam **fonólitos** das empresas **Porto Belo** e **Rio Deserto** (PBFono e RIOFono), que apresentavam em sua constituição feldspato de K (75 %), piroxênio (15 %) e nefelina (10 %); **resíduos com ferro** e **resíduo leve** da empresa **Ibirama** (IBRF e IBRL), resultantes do processamento de monzogranítico, pegmatito granítico, gnaiss granodiorítico, gnaiss monzogranítico, que são constituídos de quartzo (30 a 40 %), feldspato de K (14 a 40 %), plagioclásio (10 a 35 %), microclínio (10 %), biotita (5 a 20 %), sericita (0 a 5 %) e muscovita (0 a 5 %); **pó de rocha da britagem** de monzogranito da empresa **Pedrita** (PEDPO), com quartzo (30 a 40 %), feldspato de K (30 a 35 %) e plagioclásio (20 a 35 %); **lama da lavagem de pó de monzogranito e monzogranito grosso da empresa Saibrita** (SBLA) com quartzo (25 %), plagioclásio (20 a 30 %), feldspato de K (30 %), microclínio (10 a 15 %) e biotita (4 a 5 %); **flogopita** (Flo) (olivina flogopita melititito) com flogopita (40 %), olivina (22 %), melilitita (25 %); **lama da lavagem de pó de rocha de monzogranito da empresa Sul Catarinense** (SULLA) com quartzo (35 %), feldspato de K (20 a 30 %), plagioclásio (30 a 40 %) e biotita (2 a 3 %); **Andesito** (AndSJLA) (Quartzo latito) com plagioclásio 25 %, feldspato de K (15 %); **alterito de rochas alcalinas e de biotito da empresa Bungüe** (BUNARA e BUNAB); **biotito** (apatita biotita peroxenito)

da empresa Bungüe (BUNBIO) com biotita (50 %), clinopiroxênio (45 a 54 %), apatita (10 a 19 %) e brecha carbonatítica com silito/argelito (30 %), carbonato (50 %) e barito (10 %).

Com a finalidade de diminuir a quantidade de potássio (K) no meio de cultura, realizou-se a troca do  $\text{KNO}_3$  por  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e utilizou-se uma menor quantidade de extrato de levedura (1g por 1000 ml de meio de cultura GEL).

Dos isolados que foram utilizados, dez (10) foram obtidos da etapa de contagem e isolamento de microrganismos solubilizadores nas diferentes amostras de rejeitos e produtos de mineração (Capítulo 2). Os outros isolados foram selecionados a partir dos resultados obtidos por Arbiato (2005), Narloch (2002) e Silva Filho (1998).

Tabela 3.1. Procedência e classificação dos microrganismos solubilizadores de fosfato, pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia do Solo – UFSC.

Isolados	Procedência	Classificação
MSF 62	<i>Prunus persica</i>	<i>Penicillium</i> sp.
MSF 85	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
MSF 249	<i>Eucalyptus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.
MSF 293	<i>Eucalyptus</i> sp.	<i>Paecilomyces</i> sp.
MSF 305	<i>Pinus taeda</i>	<i>Aspergillus</i> sp.
MSF 331	<i>Lactuca sativa</i>	– (1, 3)
MSF 341	<i>Lactuca sativa</i>	– (2, 3)
MSF 344	Pó de Rocha	– (2, 3)
MSF 345	Pó de Rocha	– (2, 3)
MSF 348	Pó de Rocha	– (2, 3)
MSF 351	Pó de Rocha	– (2, 3)
MSF 352	Pó de Rocha	– (2, 3)
MSF 353	Pó de Rocha	– (2, 3)
<b>MSF 357</b>	<b>Produtos e Rejeitos</b>	– (1, 3, 4)
<b>MSF 358</b>	<b>Produtos e Rejeitos</b>	– (1, 3, 4)
<b>MSF 359</b>	<b>Produtos e Rejeitos</b>	– (2, 3, 4)
<b>MSF 360</b>	<b>Produtos e Rejeitos</b>	– (1, 3, 4)
<b>MSF 361</b>	<b>Produtos e Rejeitos</b>	– (1, 3, 4)
<b>MSF 362</b>	<b>Produtos e Rejeitos</b>	– (1, 3, 4)
<b>MSF 363</b>	<b>Produtos e Rejeitos</b>	– (1, 3, 4)
<b>MSF 364</b>	<b>Produtos e Rejeitos</b>	– (1, 3, 4)
<b>MSF 365</b>	<b>Produtos e Rejeitos</b>	– (1, 3, 4)
<b>MSF 366</b>	<b>Produtos e Rejeitos</b>	– (1, 3, 4)

(1) Fungo

(2) Bactéria

(3) Microrganismos não submetidos ao processo de identificação.

(4) Microrganismos procedentes do estudo descrito no capítulo 2.

Tabela 3.2. Materiais e rochas utilizadas e teor de fósforo e potássio.

<b>Amostras</b>	<b>Siglas</b>	<b>% K</b>	<b>%P</b>
Fonólito – Porto Belo	PBFono	5,4	< 0,1
Fonólito – Rio Deserto	RIOFono	5,4	< 0,1
Ibirama – Resíduo com Ferro	IBRF	4,2	0,1
Ibirama – Resíduo Leve	IBRL	4,1	0,1
Pedrita - Pó de rocha	PEDPO	4,1	< 0,1
Saibrita – Lama de lavagem	SBLA	4,0	0,1
Flogopita	Flo	3,7	0,3
Sul Catarinense – Lama de lavagem	SULLA	3,7	< 0,1
Andesito	AndSJLA	3,0	0,2
Bungüe – Alterito de Rochas alcalina	BUNARA	1,8	3,6
Bungüe – Alterito de Biotito	BUNAB	1,2	3,8
Bungüe – Biotito	BUNBIO	3,9*	4,3*
Brecha Carbonatítica	BCARLA	3,7*	0,3*

- Análises realizadas por SGS Geosol Laboratório LTDA;

-\* Segundo Scheibe (1986);

O experimento foi conduzido em delineamento fatorial completamente casualizado com 14 fontes de nutrientes (13 rochas e uma testemunha, não suplementada com pó de rocha, rejeitos ou produtos) e 24 tratamentos de inoculação (23 isolados microbianos e uma testemunha não inoculada), com três repetições por cada combinação.

A unidade experimental foi constituída por frascos de cor âmbar com capacidade de 100 ml, previamente lavados com ácido clorídrico (1N) e enxaguados várias vezes com água destilada. Em cada frasco foram adicionados 50 ml de meio GEL, suplementado ou não com 0,5 g de pó dos materiais ou rochas, de acordo com o tratamento. Os frascos foram fechados com rolhas de algodão, identificados e esterilizados a 121 °C por 20 minutos.

Antes de serem adicionados aos frascos com o meio e as rochas, os isolados foram repicados para 3 ml de meio GEL inclinado em tubos, incubando-se a  $25 \pm 1$  °C durante 72 h. Após a incubação, adicionaram-se a cada tubo, 3 ml de água esterilizada, seguindo-se de agitação manual até obter-se uma suspensão microbiana homogênea. Dessa suspensão, utilizou-se 0,1 ml para inocular o meio contido nos frascos.

Após inoculação, as culturas foram incubadas em incubadora BOD a  $25 \pm 1$  °C durante 15 dias. Após esse período de incubação, o meio foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos

(Centrifuge PLC serie), utilizando-se para determinação do teor de fósforo e potássio, de acordo com metodologia descrita por Tedesco et al. (1995), relatada a seguir.

Para determinação do teor de fósforo, alíquotas de 1 ml do sobrenadante foram transferidas para copos plásticos descartáveis, adicionando-se 2 ml de água destilada, 3 ml da solução de molibdato de amônio (Anexo B) e três gotas de uma solução ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico (Anexo C). Essa mistura permaneceu em repouso por aproximadamente 15 minutos, seguindo-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro da marca Jenway®, modelo 6100, em comprimento de onda de 660 nm. Os valores foram transformados em  $\mu\text{g}$  de P por litro de meio de cultura ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ), através de equação de regressão, obtida a partir de uma curva padrão obtida com o uso de soluções com concentrações de P conhecidas.

A determinação do teor de potássio no meio de cultura foi realizada transferindo-se igualmente 1 ml do meio sobrenadante para copos plásticos descartáveis, adicionando-se, em seguida, 10 ml de água destilada. Realizou-se então a determinação da emissão de luz em fotômetro de chama da marca Analyser, modelo 910. Os valores foram transformados em  $\mu\text{g}$  de K por litro de meio de cultura ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ), através da equação de regressão, obtido a partir de uma curva padrão, obtida por concentrações de K conhecidas.

As curvas padrões de fósforo e potássio foram obtidas através da leitura de alíquotas de solução padrão que continham 0,0 – 1,0 – 2,0 – 3,5 – 5,0 – 7,0 – 8,5 e 10,0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de P e 0,0 – 2,0 – 4,0 – 6,0 – 8,0 – 10,0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de K (Anexo D).

O teor de fósforo e potássio solubilizado foi obtido subtraindo-se, respectivamente do valor determinado de cada tratamento, o teor de nutriente determinado no tratamento testemunha sem inoculação e sem a presença de rocha (apenas meio de cultura); o valor do tratamento testemunha com rocha (tratamento com rocha e sem inoculação) subtraído do valor da testemunha (tratamento inoculado sem a rocha) e o valor da respectiva testemunha inoculada (tratamento inoculado sem rocha), subtraído do valor da testemunha (tratamento

sem rocha e sem inoculação); conforme fórmula a baixo usada para quantificar o teor de P e K solubilizados no meio de cultura.

$$NSI_aR_a = NMI_aR_a - NM00 - (NMI_a0 - NM00) - (NMOR_a - NM00)$$

Onde:

$NSI_aR_a$  = Teor do nutriente solubilizado no meio de cultura pelo isolado A na presença da rocha A.

$NMI_aR_a$  = teor do nutriente no meio de cultura do isolado A na presença da rocha A.

$NM00$  = teor do nutriente no meio de cultura não inoculado e sem rocha.

$NMI_a0$  = teor do nutriente no meio de cultura do isolado A sem rocha.

$NMOR_a$  = teor do nutriente no meio de cultura com a rocha A sem inoculação.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) com auxílio do programa SISVAR, versão 4.6, desenvolvido pela Universidade Federal de Lavras. Análise de correlação foi aplicada entre as médias de fósforo e potássio solubilizados pelos MSF, utilizando-se o programa Microsoft Excel<sup>®</sup> e a significância do coeficiente de correlação foi verificada através de método descrito por Steel e Torrie (1960).

### 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de potássio e fósforo foram influenciados pela presença de microrganismos solubilizadores de fosfato e do tipo de rochas, ocorrendo interações significativas entre microrganismos e rocha (Tabelas 3.3 e 3.4).

### 3.3.1 Potássio solubilizado no meio de cultura

Considerando-se as médias gerais obtidas com as rochas e materiais, observou-se efeito positivo de liberação de potássio em nove das treze avaliações. As maiores quantidades de potássio solubilizado foram verificadas nos meios contendo os dois fonólitos (PBFono e RIOFono) com 57 e 56  $\mu\text{g ml}^{-1}$  respectivamente, seguidos pelo meio com biotito (BUNBIO) com 38  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (Tabela 3.3).

Embora Arbieto (2005) tenha verificado efeito positivo do teor de K com relação ao mineral presente nas rochas, o mesmo não foi observado neste estudo. Apesar de os tratamentos com maior quantidade de potássio solubilizado terem sido aqueles com as rochas que apresentavam os maiores teores de K (5,4 %), outros tratamentos contendo materiais com 3,7 a 4,2 % desse elemento, como PEDPO, BCARLA, IBRT e IBRF não apresentaram solubilização detectável, mesmo que o mineral constituinte como fonte de K presente em maior quantidade fosse o mesmo contido nos primeiros (feldspato).

Comparando-se os valores de K solubilizados pelos microrganismos, onze dos isolados promoveram um aumento da solubilização em relação à testemunha sem inoculação. Desses, oito isolados se destacaram (MSF-357, MSF-365, MSF-331, MSF-364, MSF-305, MSF-360, MSF-362, MSF-363) com variação do teor de potássio de 45 a 36  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (Tabela 3.3). Doze isolados, representando 52 % do total, apresentaram teores de potássio no meio GEL estatisticamente semelhantes aos da testemunha não inoculada.

Tabela 3.3. Teor de K ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) solubilizado no meio glicose extrato de levedura - GEL, suplementado com pó de rochas, rejeitos e produtos de mineração inoculado com microrganismos solubilizadores, após 15 dias de incubação.

Isolado	Rochas <sup>(1)</sup>														Média
	PBFono	RIOFono	BUNBIO	AndSJLA	BUNAB	Flo	BUNARA	SULLA	SBLA	PEDPO	BCARLA	IBRF	IBRL	Test.	
<b>MSF 357</b>	140 ab A <sup>(2)</sup>	133 ab A	134 a A	29 ac C	24 ab CD	81 a B	24 a CD	22 ad CD	18 ab CD	11 a CD	1 a D	5 a CD	1 a D	0 a D	45 a
<b>MSF 365</b>	131 b A	135 ab A	122 ab A	32 a C	24 ab CD	76 ab B	22 ab D	26 ab D	21 a CD	13 a CD	5 a D	6 a CD	4 a D	0 a D	44 ab
<b>MSF 331</b>	142 ab A	156 a A	110 ac B	28 ac D	23 ab DE	66 ac C	24 aDE	21 ae DE	14 ab DE	13 a DE	3 a DE	5 a DE	3 a DE	0 a E	43 ab
<b>MSF 364</b>	135 ab A	129 ab A	117 ac A	26,8 ad CD	27 a C	71 ab B	23 a CD	23 ad CD	19 ab CD	11 a CD	1 a CD	2 a CD	2 a CD	0 a D	42 ab
<b>MSF 305</b>	164 a A	123 b B	89 c C	23 ae DE	23 ab DF	40 cd D	22 ab DF	20 ae DF	22 a DF	8 a EF	-4 a EF	2 a EF	1 a EF	0 a F	38 ab
<b>MSF 360</b>	128 b A	127 ab A	89 c B	30 ab CD	21 ab DE	54 ad C	18 ab DE	27 a DE	17 ab DE	9 a DE	2 a E	0 a E	1 a E	0 a E	37 ab
<b>MSF 362</b>	125 b A	106 b A	105 bc A	26 ad BC	24 ab BD	47 bd B	20 ab CD	25 ac BD	22 a BD	13 a CD	-2 a D	5 a CD	3 a CD	0 a CD	37 ab
<b>MSF 363</b>	117 b AB	131 ab A	92 c B	27 ad CD	23 ab CE	35 c C	19 ab CE	27 a CD	18 ab CE	14 a CE	-2 a E	4 a DE	4 a DE	0 a DE	36 b
<b>MSF 293</b>	62 cd A	43 cd AB	55 d A	17 ae BC	11 ab C	-18 ef D	10 ab C	10 af C	-3 ab CD	3 a CD	5 a CD	2 a CD	0 a CD	0 a CD	14 c
<b>MSF 358</b>	76 c A	59 c A	28 de B	13 ae BC	15 ab C	3 e BC	8 ab BC	-3 cf C	-4 ab C	3 a BC	0 a C	-7 a C	-3 a C	0 a C	13 cd
<b>MSF 62</b>	67 cd A	46 c A	42 d A	14 ae AB	11 ab AB	-19 ef C	7 ab AB	2 af AB	0 ab AB	2 a AB	1 a AB	1 a AB	-2 a AB	0 a AB	12 cd
<b>MSF 366</b>	18 ef AD	39 de A	37 d AB	11 ae BE	21 ab AC	-11 ef E	19 ab AD	-8 ef DE	-8 b DE	-2 a CE	-1 a CE	-8 a DE	-4 a CE	0 a CE	7 ce
<b>MSF 249</b>	40 de A	41 cd A	-5 fh B	12 ae B	9 ab B	-15 ef B	0 ab B	1 af B	-3 ab B	4 a B	-4 a B	1 aB	-2 a B	0 a B	6 df
<b>MSF 351</b>	6 f A	8 f A	2 eg A	7 ae A	3 ab A	-15 ef A	2 ab A	0 af A	8 ab A	7 a A	8 a A	4 a A	5 a A	0 a A	3 eg
<b>MSF 85</b>	3 f A	11 f A	6 ef A	3 ae A	2 ab A	-11 ef A	0 ab A	-2 af A	4 ab A	2 a A	3 a A	1 a A	0 aA	0 a A	2 eg
<b>MSF 341</b>	13 ef A	4 f A	-1 eh AB	5 ae A	4 ab A	-26 f B	3 ab A	-3 bf AB	-3 ab AB	4 a A	3 a A	1 a AB	-8 a AB	0 a AB	0 eg
<b>MSF 345</b>	5 f A	10 f A	-2 fh AB	6 ae A	0 b AB	-23 ef B	-3 ab AB	-2 af AB	2 ab AB	4 a AB	6 a A	3 a AB	1 a AB	0 a AB	0 eg
<b>MSF 352</b>	2 f AB	14 ef A	-7 fh AB	1 be AB	1 ab AB	-21 ef B	0 ab AB	0 af AB	-1 ab AB	2 a AB	1 a AB	0 a AB	3 a AB	0 a AB	0 eg
<b>MSF 361</b>	0 f AB	16 ef A	-12 fh B	-5 e AB	1 ab AB	-14 ef B	-2 ab AB	-5 df AB	0 ab AB	-1 a AB	0 a AB	-1 a AB	-2 a AB	0 a AB	-2 fg
<b>MSF 359</b>	2 f A	0 f A	-28 h B	-2 de AB	0 b A	-9 ef AB	-3 ab AB	0 af A	-3 ab AB	0 a A	0 a A	-3 a AB	2 a A	0 a A	-3 g
<b>MSF 348</b>	1 f A	3 f A	-26 gh B	5 ae A	-3 b AB	-18 ef AB	-3 ab AB	-3 bf AB	0 ab AB	3 a A	0 a AB	-6 a AB	-1 a AB	0 a AB	-3 g
<b>MSF 353</b>	-3 f A	5 f A	-19 fh A	1 be A	-4 b A	-12 ef A	-7 b A	-4 cf A	-1 ab A	3 a A	-1 a A	-1 a A	-2 a A	0 a A	-3 g
<b>MSF 344</b>	-2 f AB	11 f A	-4 fh AB	0,4 be AB	-2 b AB	-21 ef B	-2 ab AB	-12 f AB	-3 ab AB	-1 a AB	-3 a AB	-12 a B	-4 a AB	0 a AB	-4 g
<b>Test.</b>	0 f	0 f	0 eh	0 ce	0 b	0 ef	0 ab	0 af	0 ab	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 eg
<b>Média</b>	57 A	56 A	38 B	13 C	11 CD	10 CE	8 CE	7 DE	6 DE	5 EG	1 FG	0 G	0 G	0 G	

<sup>(1)</sup> PBFono – fonólito Porto Belo; RIOFono – fonólito Rio Deserto; BUNBIO – biotito; AndSJLA – andesito; BUNAB – Alterito de Biotito; Flo – Flogopita; BUNARA – alterito de rochas alcalinas; SULLA – Lama Sul Catarinense; SBLA- Lama Saibrita; PEDPO- Pó de rocha Pedrita; BCARLA- Brecha Carbonatítica; IBRF – Ibirama resíduo com Ferro; IBRL – Ibirama resíduo leve.

<sup>(2)</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Arbieto (2005) observou imobilização de potássio pela maioria dos microrganismos utilizados (80 %), e atribuiu esse fato à constituição do meio GEL. Provavelmente a alta concentração de potássio no meio utilizado por essa autora inibiu determinados mecanismos de solubilização, fato esse já relatado por outros autores como Nahas e Assis (1992) e Silva Filho e Vidor (2001). No presente estudo, a redução do teor de extrato de levedura no meio de cultura GEL reduziu em 60 % o teor de potássio no meio que era de  $127 \mu\text{g ml}^{-1}$  (ARBIETO, 2005) para  $77 \mu\text{g ml}^{-1}$  (ANEXO E). Essa alteração resultou, provavelmente, em maior estímulo à solubilização pelos microrganismos. Segundo Silva Filho (1998), o mecanismo de solubilização de alguns microrganismos é regulado pelo teor de nutrientes disponível.

Os microrganismos MSF-357, MSF-365, MSF-364, MSF-360, MSF-362 e MSF-363, foram isolados de rejeitos e produtos de mineração (Capítulo 2) e mostraram bom potencial de solubilização em meio de cultura líquido. O microrganismo MSF-331, isolado da rizosfera de alface por Arbieto (2005), já tinha se revelado um bom solubilizador no referido estudo. Já o MSF-305, que apresentou uma ótima capacidade de solubilização no presente estudo, com um teor de  $38 \mu\text{g ml}^{-1}$  de potássio solubilizado, não tinha demonstrado capacidade solubilizadora no estudo de Arbieto (2005). Nesse estudo, ao invés de solubilização o isolado tinha apresentado capacidade de imobilização. Já os isolados MSF-293 e MSF-62 apresentaram neste estudo o mesmo comportamento de solubilização observado por Arbieto (2005).

Em relação à interação das rochas com os microrganismos, foram observadas 48 combinações com efeitos significativos de solubilização de K, num total de 299 combinações (Tabela 3.3).

Os microrganismos MSF-357, MSF-365, MSF-331, MSF-305, MSF-360 e MSF-364 solubilizaram K a partir de cinco rochas. Os 5 primeiros citados solubilizaram a partir das rochas PBFono, RIOFono, BUNBIO, AndSJLA e Flo, enquanto que o último solubilizou a

partir de PBFono, RIOFono, BUNBIO, BUNAB e Flo. Os isolados MSF-362 e MSF-363 solubilizaram a partir de quatro (4) rochas (PBFono, RIOFono, BUNBIO e Flo). Já os isolados MSF-293 e MSF-358 apresentaram resultados positivos de solubilização de K em três rochas, (PBFono, RIOFono e BUNBIO). Por fim, os microrganismos MSF- 366 e MSF-249 apresentaram resultados positivos em apenas duas rochas, (RIOFono e BUNBIO) e (PBFono e RIOFono), respectivamente.

Não houve interação significativa entre dez (10) isolados (MSF-351, MSF-85, MSF-341, MSF-345, MSF-352, MSF-361, MSF-359, MSF-348, MSF-353 e MSF-344) e as rochas testadas. Entre esses microrganismos, dois estavam sendo testados (MSF-361 e MSF-359) pela primeira vez neste trabalho, mas os outros tinham sido avaliados por Arbieto (2005), na presença de diferentes fontes minerais, e onde apresentaram médio a alto potencial de solubilização. Essa observação pode estar associada à perda da habilidade de solubilização após longos períodos de sub-cultura, já relatada em outros trabalhos (KUCEY, 1983; ILLMER; SCHINNER, 1992, SILVA FILHO, 1998).

Analisando-se as interações de solubilização dos isolados dentro de cada fonte de rocha, verifica-se que 47 das 299 combinações apresentaram teores de K significativos no meio de cultura (Tabela 3.3).

Observou-se que na presença do fonólito, tanto da Porto Belo (PBFono) quanto do Rio Deserto (RIOFono), houve efeito significativo de solubilização de K em tratamentos com doze (12) isolados (MSF-357, MSF-365, MSF-331, MSF-364, MSF-305, MSF-360, MSF-362, MSF-363, MSF-293, MSF-358, MSF-62 e MSF-249). Além destes, o isolado MSF-366 também interagiu com a rocha RIOFono.

Observou-se interação significativa entre o biotito (BUNBIO) e onze (11) dos microrganismos, MSF-357, MSF-365, MSF-331, MSF-364, MSF-305, MSF-360, MSF-362, MSF-363, MSF-293, MSF-62 e MSF-366. Oito microrganismos (MSF-357, MSF-365, MSF-

331, MSF-364, MSF-305, MSF-360, MSF-362 e MSF-363) contribuíram para uma solubilização de potássio significativa a partir da flogopita.

Os isolados MSF-365 e MSF-360 aumentaram o teor de K no meio com RIOFono e o MSF-364 no meio com alterito de biotito. Não houve interação significativa em combinações envolvendo sete rochas, sendo elas BUNARA, SULLA, SBLA, PEDPO, BCARLA, IBRF e IBRL.

O maior valor de K solubilizado foi observado na combinação da rocha, PBFono e o microrganismo solubilizador de fosfato MSF-305, com  $164 \mu\text{g ml}^{-1}$ , seguido do MSF-331 que solubilizou  $156$  e  $142 \mu\text{g ml}^{-1}$  a partir do RIOFono e do PBFono, respectivamente. O isolado MSF-357 destacou-se na liberação de potássio a partir do PBFono com  $140 \mu\text{g ml}^{-1}$  e a partir da BUNBIO com  $134 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Outros isolados que se destacaram foram: MSF-364 na presença do fonólito de Porto Belo, com teor de  $135 \mu\text{g ml}^{-1}$ , e MSF-363 em fonólito do Rio Deserto com  $131 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

Diferenças de potencial de solubilização de K nas interações entre microrganismos e rochas também foram observadas em estudos com fungos micorrízicos (YUAN et al., 2004) e com bactérias e fungos de vida livre (ARBIETO, 2005). Tais diferenças podem ser atribuídas aos diferentes mecanismos de solubilização e aos minerais presentes nos materiais utilizados nos diferentes estudos.

Diante das médias obtidas e das interações observadas, os isolados MSF-357, MSF-365, MSF-331 e MSF-364 foram considerados de interesse para utilização em um programa de inoculação de plantas visando o aproveitamento de fontes alternativas de potássio, particularmente na utilização das rochas do tipo fonólito, biotito (apatita biotita piroxenito) e flogopita (olivina flogopita melilitito).

### 3.3.2. Fósforo solubilizado no meio de cultura

Dos 13 materiais avaliados, três (PEDPO, IBRF e IBRL) não diferiram da testemunha não suplementada com pó de rocha, produtos ou rejeitos de mineração. Nas demais fontes, as quantidades solubilizadas variaram de 9,5 a 1,6  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , destacando-se a fonte biotito, com 9,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , seguido pelo alterito de rochas alcalinas, com 6,2  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (Tabela 3.4). Estes resultados podem estar relacionados com os teores de fósforo presentes nas amostras (Tabela 3.2), assim como observado por Arbieto (2005).

O alterito de biotito, que apresentava o segundo maior teor de fósforo das amostras, com 8,6 %, não proporcionou teores significativos de nutriente solubilizados, o que pode estar relacionado à composição mineral da amostra. A flogopita, contendo 0,3 % de P em sua constituição foi a terceira rocha que mais liberou P para o meio, com 4,1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , representando 13,6 % do total de fósforo solubilizado (Tabela 3.2).

Estudos visando a solubilização de fosfatos por via microbiana têm mostrado resultados bem acima dos que foram encontrados no presente trabalho. Nahas, Banzatto e Assis (1990), empregando o fungo *Aspergillus niger* e utilizando vinhaça como fonte de carbono, obtiveram 79 % de solubilização do fósforo total a partir da fluorapatita.

Dos vinte e três (23) microrganismos testados no presente estudo, nove (9) proporcionaram valores de P solubilizado superiores à testemunha não inoculada (MSF-363, MSF-360, MSF-331, MSF-357, MSF-364, MSF-305, MSF-362, MSF-365 e MSF-293) com teores variando de 8,7 a 2,7  $\mu\text{g de P ml}^{-1}$ . Os maiores valores foram observados nos tratamentos envolvendo os isolados MSF-363, MSF-360, MSF-331 e MSF-357, com 8,6, 8,7, 5,9 e 5,7  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de P solubilizado, respectivamente. Quatorze isolados, representando 60 % do total, proporcionaram teores de P no meio GEL semelhantes aos da testemunha não inoculada.

Tabela 3.4. Teor de P ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) solubilizado no meio glicose extrato de levedura - GEL, suplementado com pó de rochas, rejeitos e produtos de mineração, inoculado com microrganismos solubilizadores, após 15 dias de incubação.

Isolado	Rocha <sup>(1)</sup>														Média
	BUNBIO	BUNARA	Flo	BUNAB	BCARLA	AndSJLA	RIOFono	PBFono	SBLA	SULLA	PEDPO	IBRL	IBRF	Test.	
<b>MSF 360</b>	49,3 a A	25,2 a B	10,5 a C	9,4 bd CD	3,6 a CE	5,2 a CE	3,1 a CE	2,5 a DE	3,8 a CE	3,8 a CE	1,5 a E	1,8 a E	1,9 a DE	0,0 a E	8,7 a
<b>MSF 363</b>	51,9 a A	20,1 a B	8,1 ac C	8,8 be C	3,9 a D	6,7 a D	2,8 a D	2,5 a D	4,0 a CD	3,9 a CD	2,4 a CD	2,4 a CD	2,4 a CD	0,0 a D	8,6 a
<b>MSF 331</b>	10,2 cf B	20,6 a A	6,4 ac BC	20,8 a A	3,4 a BC	4,2 a BC	2,8 a BC	2,7 a BC	2,7 a BC	3,3 a BC	1,7 a C	1,6 a C	1,7 a C	0,0 a C	5,9 bc
<b>MSF 357</b>	30,4 b A	5,9 bc BC	6,9 ac BC	10 bc B	3,3 a CE	5,3 a BC	3,7 a BC	3,0 a BC	3,4 a BC	3,3 a BC	1,6 a C	1,6 a C	1,7 a C	0,0 a C	5,7 bd
<b>MSF 362</b>	10,7 ce A	7,7 bc AC	9,3 ab AB	10,7 b A	3,8 a AD	6,3 a AD	2,8 a BD	2,5 a BD	3,1 a BD	3,7 a AD	1,6 a CD	2,5 a BD	2,4 a BD	0,0 a D	4,8 be
<b>MSF 305</b>	11,6 cd A	7,3 bc AD	9,2 ab AB	8,6 be AC	3,1 a BD	2,7 a BD	2,9 a BD	2,7 a BD	1,6 a CD	4,1 a AD	2,2 a BD	1,0 a D	1,1 a CD	0,0 a D	4,2 cf
<b>MSF 365</b>	5,8 cf B	20,0 a A	2,8 ac B	1,7 df B	3,1 a B	3,8 a B	2,6 a B	2,8 a B	1,5 a B	2,9 a B	1,4 a B	0,7 a B	0,8 a B	0,0 a B	3,6 df
<b>MSF 364</b>	12,5 c A	9,8 b AB	3,2 ac BC	1,7 df C	3,1 a BC	2,5 a BC	2,8 a BC	3,3 a BC	1,7 a C	3,8 a BC	1,7 a C	0,8 a C	0,9 a C	0,0 a C	3,4 dg
<b>MSF 293</b>	5,5cg A	3,3 bc A	3,8 ac A	2,8 bf A	3,7 a A	3,6 a A	3,8 a A	3,4 a A	1,3 a A	1,4 a A	1,4 a A	1,9 a A	2,0 a A	0,0 a A	2,7 eh
<b>MSF 358</b>	5,4 cg A	5,3 bc A	3,1 ac A	3,3 bf A	2,9 a A	4,3 a A	3,4 a A	2,7 a A	1,1 a A	0,7 a A	1,3 a A	0,9 a A	1,0 a A	0,0 a A	2,5 ei
<b>MSF 249</b>	3,9 dg A	3,6 bc A	3,0 ac A	2,8 bf A	3,1 a A	2,5 a A	3,1 a A	2,6 a A	1,2 a A	0,9 a A	1,5 a A	1,2 a A	1,3 a A	0,0 a A	2,2 ei
<b>MSF 62</b>	4,5 cg A	2,5 bc A	3,4 ac A	1,9 cf A	2,9 a A	2,3 a A	3,1 a A	2,7 a A	1,2 a A	0,9 a A	1,4 a A	0,9 a A	1,1 a A	0,0 a A	2,1 ei
<b>MSF 341</b>	3,3 eg A	2,3 bc A	4,1 ac A	2,0 cf A	3,9 a A	2,0 a A	2,9 a A	2,4 a A	1,8 a A	1,2 a A	1,4 a A	0,9 a A	1,0 a A	0,0 a A	2,1 ei
<b>MSF 352</b>	3,0 eg A	2,2 bc A	3,9 ac A	1,5 df A	4,7 a A	2,8 a A	2,9 a A	2,4 a A	2,7 a A	0,6 a A	1,3 a A	0,7 a A	0,7 a A	0,0 a A	2,1 ei
<b>MSF 345</b>	2,6 eg A	2,2 bc A	4,0 ac A	1,4 df A	4,4 a A	2,4 a A	2,6 a A	2,3 a A	3,2 a A	0,8 a A	1,7 a A	1,1 a A	1,1 a A	0,0 a A	2,1 ei
<b>MSF 366</b>	3,6 dg A	2,9 bc A	3,0 ac A	2,1 cf A	3,0 a A	2,3 a A	3,1 a A	2,6 a A	1,3 a A	1,0 a A	1,5 a A	1,0 a A	1,1 a A	0,0 a A	2,0 ei
<b>MSF 85</b>	2,9 eg A	2,0 bc A	3,4 ac A	1,5 df A	3,9 a A	2,1 a A	2,7 a A	2,1 a A	3,4 a A	0,6 a A	1,3 a A	0,9 a A	0,9 a A	0,0 a A	2,0 ei
<b>MSF 353</b>	2,6 eg A	2,1 bc A	3,6 ac A	1,4 df A	3,7 a A	1,9 a A	2,5 a A	2,0 a A	2,1 a A	0,6 a A	1,3 a A	1,1 a A	0,9 a A	0,0 a A	1,8 fi
<b>MSF 348</b>	2,6 eg A	2,0 bc A	2,4 ac A	1,4 df A	2,7 a A	2,1 a A	2,3 a A	1,8 a A	1,6 a A	1,0 a A	1,1 a A	0,9 a A	0,5 a A	0,0 a A	1,6 fi
<b>MSF 351</b>	2,3 fg A	1,6 bc A	2,2 bc A	1,0 ef A	2,2 a A	1,2 a A	1,7 a A	1,1 a A	1,0 a A	0,0 a A	0,4 a A	0,2 a A	0,2 a A	0,0 a A	1,1 gi
<b>MSF 344</b>	1,4 g A	0,5 c A	1,7 bc A	0,0 f A	2,1 a A	0,6 a A	1,3 a A	0,6 a A	0,2 a A	0,6 a A	0,6 a A	0,9 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,8 gi
<b>MSF 361</b>	1,0 g A	0,6 c A	0,8 c A	0,1 f A	1,5 a A	1,2 a A	0,8 a A	0,5 a A	0,1 a A	-0,1 a A	-0,1 a A	-0,3 a A	-0,1 a A	0,0 a A	0,4 hi
<b>MSF 359</b>	0,3 g A	0,2 c A	0,0 c A	-0,1 f A	0,0 a A	0,0 a A	0,1 a A	0,6 a A	0,2 a A	0,1 a A	-0,2 a A	0,0 a A	-0,4 a A	0,0 a A	0,1 i
<b>Test.</b>	0,0 g A	0,0 c A	0,0 c A	0,0 f A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 i
<b>Média</b>	9,5 A	6,2 B	4,1 C	4,0 CD	3,0 CE	2,8 CE	2,5 DF	2,2 EF	1,8 EF	1,6 EF	1,3 FG	1,0 FG	1,0 FG	0,0 G	

<sup>(1)</sup> PBFono – fonólito Porto Belo; RIOFono – fonólito Rio Deserto; BUNBIO – biotito; AndSJLA – andesito; BUNAB – Alterito de Biotito; Flo – Flogopita; BUNARA – alterito de rochas alcalinas; SULLA – Lama Sul Catarinense; SBLA – Lama Saibrita; PEDPO – Pó de rocha Pedrita; BCARLA- Brecha Carbonatítica; IBRF – Ibirama resíduo com Ferro; IBRL – Ibirama resíduo leve.

<sup>(2)</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Observou-se variação quanto à capacidade de solubilização entre os diferentes MSF. Outros autores também observaram ampla variação entre isolados de diferentes gêneros, sendo esta uma das principais características no processo de seleção (ARORA; GAUR, 1979, KUCEY, 1983; SILVA FILHO; NARLOCH; SCHARF, 2002).

Dos nove (9) microrganismos que solubilizaram, sete eram oriundos da etapa de isolamento das amostras de resíduos ou produtos, um foi isolado do solo de cultivo de alface (MSF-331) e outro isolado do solo de plantação de eucalipto (MSF-293). Não se observou predomínio de isolados mais eficientes entre os obtidos da rizosfera, como foi sugerido por Sperber (1958).

Entre os grupos de microrganismos utilizados, destacaram-se os isolados fúngicos no processo de solubilização, sendo estes relatados na literatura como os mais eficientes no papel de solubilização de fosfatos (BANIK; DEY, 1982; NAHAS, 1996).

Os isolados diferiram entre si, tanto na capacidade quanto na intensidade de solubilização; os microrganismos MSF-363 e MSF-360 participaram da solubilização das mesmas rochas, sendo elas: o biotito, o alterito, a flogopita e o alterito de biotito. Os isolados MSF-305 e MSF-362 interagiram com três rochas, biotito, flogopita e alterito de biotito. Já o MSF-331, interagiu com as rochas biotito, alterito e alterito de biotito; enquanto que o MSF-364 interagiu com biotito e alterito. Por fim, o isolado MSF-365 interagiu apenas com uma rocha, o alterito (Tabela 3.4).

Analisando-se as interações rochas e microrganismos, observou-se interação positiva em combinações envolvendo quatro rochas, biotito, alterito, flogopita e alterito de biotito. Os isolados MSF-363, MSF-360, MSF-357, MSF-364, MSF-305, MSF-362 e MSF-331 mostraram interações positivas na presença de biotito. O alterito de biotito apresentou interação significativa com os isolados MSF-363, MSF-360, MSF-357, MSF-305, MSF-362 e MSF-331; enquanto que o alterito interagiu significativamente com os isolados MSF-363,

MSF-360, MSF-364, MSF- 331 e MSF-365 e a flogopita com os isolados MSF-360, MSF-305, e MSF-362 (Tabela 3.4).

Os maiores teores de fósforo solubilizado foram observados no meio contendo biotito e inoculado com os isolados MSF-636 e MSF-360, apresentando 51,9 e 49,3  $\mu\text{g}$  de P  $\text{ml}^{-1}$ , seguido pelo tratamento envolvendo o isolado MSF-360 e o alterito de rochas alcalinas, com 25,2  $\mu\text{g}$  de P solubilizados por ml de meio.

O isolado MSF-305 também se destacou na solubilização de P a partir das fontes testadas. Esse comportamento por parte desse isolado já havia sido observado em estudos com as fontes de fosfato natural de Araxá e de Catalão (SILVA FILHO; NARLOCH; SCHARF, 2002) e com rochas como carbonatito, flogopita e arenito (ARBIETO, 2005).

Diferenças na solubilização entre diversos microrganismos, utilizando-se diferentes fontes de fósforo, também foram observadas por Agnihotri (1970). Esse autor verificou que o fosfato tricálcico foi solubilizado por *Aspergillus niger*, a fluoroapatita por *A. flavus* e *Fusarium oxysporum*, e a hidroxiapatita por *Sclerotium rolfsii*, *Cylindrocladium* sp. e *Penicillium* sp.

Treze microrganismos utilizados neste experimento já tinham sido avaliados em relação a sua capacidade de solubilização de fosfato na presença de outras fontes minerais e destes, sete apresentaram comportamento diferente dos trabalhos anteriores. Dentre os isolados, MSF-352, MSF-85, MSF-345, MSF-348, MSF-353, MSF-351, e MSF-344 apresentaram alto potencial em solubilizar fosfatos (ARBIETO, 2005), assim como o isolado MSF-62 (SILVA FILHO; VIDOR, 2001; ARBIETO, 2005), mas não apresentaram atividades significantes neste trabalho. Os microrganismos MSF-249 e MSF-341 não apresentaram efeitos positivos na solubilização, mesmo comportamento observado por Arbiето (2005).

Os resultados obtidos indicam que os isolados MSF-305, MSF-357, MSF-331, MSF-360 e MSF-363 apresentam um alto potencial para serem utilizados em programas de seleção

juntamente com as rochas biotito, alterito de rochas alcalinas e flogopita como fonte alternativa de P.

Entre os isolados testados, três (MSF-305, MSF-331 e MSF-357) se destacaram na solubilização de potássio.

A análise de correlação entre as médias dos teores de fósforo e potássio solubilizados pelos MSF em meio de cultura na presença de rochas foi significativa para a maioria dos tratamentos (Tabela 3.5). Isso indica que os microrganismos possuem mecanismos semelhantes de solubilização para fósforo e potássio. Assim, há possibilidade de um único microrganismo ser utilizado para solubilização de fósforo e potássio facilitando o uso de inoculantes.

Tabela 3.5. Coeficiente de correlação entre os níveis de P e K solubilizados, presente no meio de cultura com as respectivas rochas.

<b>Rochas X microrganismos</b>	<b>Coefficientes de Correlação (r)</b>
Média	+ 0,806 *
SULLA	+ 0,928 *
RioSJLA	+ 0,784 *
BUNARA	+ 0,705 *
BUNAB	+ 0,641 *
PBFono	+ 0,632 *
BUNBio	+ 0,591 *
Flo	+ 0,587 *
PEDPO	+ 0,580 *
SBLA	+ 0,519 **
IBRF	+ 0,483 **
Fono	+ 0,450 **
BCARLA	+ 0,173 ns
IBC	+ 0,188 ns

\* = Significativo ao nível de 0,01 de probabilidade;

\*\* = significativo ao nível de 0,05 de probabilidade;

ns = não significativo

## CONCLUSÕES

Os isolados MSF-357, MSF-365, MSF-331 e MSF-364 apresentam potencial para utilização em programas de seleção e produção de inoculante, visando a substituição de adubação potássica convencional pelas rochas do tipo fonólito, biotito (apatita biotita piroxenito) e flogopita (olivina flogopita melilitito).

Os isolados MSF-305, MSF-357, MSF-331, MSF-360 e MSF-363 apresentam potencial para serem utilizados em programa de seleção e produção de inoculante visando substituição da adubação fosfatada convencional pelas rochas do tipo biotito (apatita biotita piroxenito) e alterito de rochas alcalinas.

Os isolados MSF-357, MSF-331 e MSF-364 podem ser utilizados individualmente tanto para a liberação de fósforo quanto de potássio.

## **CAPÍTULO 4**

### **LIBERAÇÃO DE FÓSFORO E POTÁSSIO A PARTIR DE ROCHAS POR MICROORGANISMOS SOLUBILIZADORES E O CRESCIMENTO DE ALFACE**

#### **4.1 INTRODUÇÃO**

A produção agrícola é, muitas vezes, limitada pela fertilidade natural dos solos, sendo a utilização de fertilizantes um importante componente para se obter uma alta produtividade. Entretanto, a dependência de fertilizantes na agricultura resulta em um alto custo da produção agrícola e, também, traz conseqüências para o meio ambiente.

Além da problemática econômica, envolvendo a utilização de fertilizantes, há uma necessidade contínua de aumentar a produção de alimentos devido ao crescente aumento da população mundial, ao mesmo tempo em que há uma necessidade de diminuir os impactos ambientais provenientes da produção agrícola.

Diante disto, alternativas em relação aos fertilizantes solúveis devem ser pesquisadas. Uma delas seria o uso de rochas moídas contendo os elementos essenciais às plantas, principalmente o fósforo e o potássio.

Embora as rochas contenham menor teor de nutrientes, seu uso na agricultura apresenta várias vantagens, como a facilidade de encontrar esse material em certas regiões, a possibilidade de reduzir os danos ambientais e do uso de pequenas reservas, constituindo-se em uma adubação mais completa, com vários nutrientes.

A dificuldade de liberação dos nutrientes que estão temporariamente retidos nas rochas e indisponíveis para os vegetais é um dos problemas apresentados por essa fonte alternativa. Assim, é necessário estabelecer uma estratégia para solubilização dos nutrientes, além da escolha das rochas mais adequadas.

Diversos organismos são capazes de utilizar ou de solubilizar os nutrientes existentes nas rochas e em outros materiais (RHEINHEIMER et al., 1999). Um melhor aproveitamento dos fosfatos naturais existentes ou adicionados em formas solúveis pela inoculação de microrganismos solubilizadores de fosfatos ou pelo manejo de suas populações no solo têm sido sugeridos como forma de substituir ou diminuir o uso de fertilizantes fosfatados solúveis (GOLDSTEIN, 1986; SILVA FILHO; NARLOCH; SCHARF, 2002).

Assim, na busca de novas alternativas que visam economia no setor agrícola e de subsídios para a agricultura orgânica e sustentável, a utilização de microrganismos solubilizadores na forma de inoculantes e o uso de pó rochas adequados, constituem alternativas para a melhoria do suprimento de nutrientes para as plantas.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar o potencial dos microrganismos em solubilizar nutrientes para as plantas, foram conduzidos dois experimentos em casa de vegetação, em delineamento completamente casualizado, utilizando-se como tratamentos combinações das rochas e isolados microbianos selecionados nos experimentos anteriores (capítulos 2 e 3), com quatro repetições por tratamento.

Na avaliação da liberação de potássio foram utilizadas as rochas biotitito, flogopita olivina melilitito e fonólito e, como testemunhas, foram utilizados substrato suplementado com N e P (TNP) e substrato com adubação completa (NPK). Os microrganismos utilizados foram os isolados MSF-331, MSF-357, MSF-364 e MSF-365.

No experimento relativo à liberação de fósforo, foram avaliadas as rochas fonólito e flogopita olivina melilitito e, como testemunhas, substrato suplementado com N e K (TNK) e o substrato com adubação completa (NPK). Os microrganismos utilizados foram os isolados MSF-331, MSF-357, MSF-360 e MSF-363.

Os tratamentos e seus suplementos estão detalhados no Anexo G.

### 4.2.1 Produção do inóculo dos microrganismos solubilizadores

Para a produção do inoculante, utilizaram-se os isolados que se destacaram no experimento anterior em relação à liberação de K e P no meio de cultura (capítulo 3): MSF-331, MSF-357, MSF-360, MSF-363, MSF-364, MSF-365. Os isolados foram inicialmente repicados de forma individual para meio GEL sólido em tubos (3 ml por tubo), previamente

esterilizado e deixado solidificar na posição inclinada. Após a inoculação, as culturas foram incubadas a  $25 \pm 1$  °C por 72 h em incubadora BOD.

Após o período de incubação, foram adicionados 3 ml de água destilada e esterilizada a cada tubo, seguido de agitação manual e posterior transferência da suspensão para frascos Erlenmeyers, contendo 50 ml de meio GEL líquido, incubando-se novamente a  $25 \pm 1$  °C durante 72 h. Depois do período de incubação, o micélio dos fungos foi retirado com auxílio de uma pinça estéril e transferido para 400 ml de solução salina a 0,85 % estéril em frasco Erlenmeyer de 500 ml, sendo, em seguida, submetido a trituração a 24.000 rpm, utilizando-se um homogeneizador ULTRA-TURRAX.

A quantidade de propágulos fúngicos na suspensão miceliana foi avaliada pela técnica das diluições decimais em série com inoculação em meio de cultura sólido em placas de Petri (SILVA FILHO; OLIVEIRA, 2007). As placas foram incubadas a  $25 \pm 1$  °C durante 72 horas e, após esse período, contou-se as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por ml. De posse desses resultados, procedeu-se a padronização do inóculo para atingir a concentração de  $10^6$  UFC  $g^{-1}$  substrato. Durante as 72 h necessárias ao procedimento de contagem, o inóculo foi mantido sob refrigeração em geladeira a 4°C.

#### **4.2.2 Inoculação e Cultivo**

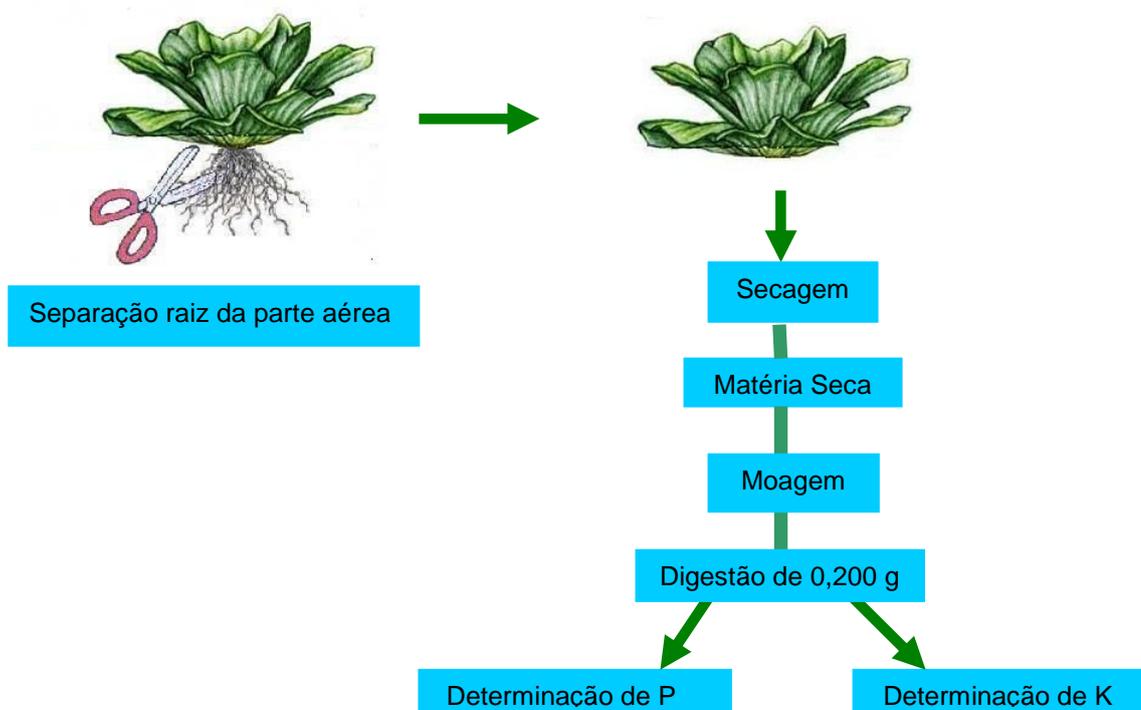
A unidade experimental foi constituída de 2 plantas em tubos de PVC com capacidade de 170 ml. Os tubos foram previamente desinfetados com solução de hipoclorito de sódio 2,5 % durante 72 h e secados ao ar. O substrato de plantio era constituído de uma mistura de turfa e vermiculita, na proporção 1:2 (V/V), fertilizada com solução nutritiva (BOUGHER; MALAJCZUK, 1990), (Anexo F) e 40 mg de P e 20 mg de K na forma solúvel ou em pó de

rocha, conforme o experimento. A adubação nitrogenada, 20 mg de nitrogênio por tubete, foi aplicada na forma de nitrato de amônio, sendo adicionada em 5 ocasiões, com a primeira aplicação feita no momento do plantio e as demais, a cada 5 dias.

O substrato foi autoclavado 3 vezes a 120 °C, durante 30 minutos em intervalos de 24 horas. No momento da semeadura, o substrato foi inoculado com a suspensão dos isolados. Cada tubete foi semeado com 10 sementes de alface da variedade “Babá de Verão”, previamente desinfectadas com hipoclorito de sódio por 20 minutos e álcool etílico a 70 % por 30 segundos, seguindo-se de lavagens sucessivas com água destilada esterilizada.

Após germinação, foi realizado o desbaste das plantas, permanecendo 2 plantas por tubete, sendo realizadas regas diárias para manter o substrato a 80 % da capacidade de campo.

Trinta e cinco dias após a germinação, a parte aérea das plantas foi colhida e seca a 75 °C, para avaliação do peso da matéria seca e determinação do teor dos nutrientes (potássio e fósforo) de acordo com o esquema da figura 4.1.



**Figura 4.1. Procedimento de avaliação das plantas de alface (*Lactuca sativa*), após 35 dias de crescimento em casa de vegetação.**

O tecido vegetal seco foi moído em moinho de facas de aço inoxidável e, em seguida, homogeneizado. Uma amostra de 0,200 g da matéria seca foi submetida a digestão em 1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 0,7 g de mistura para digestão, conforme técnica descrita por Tedesco et al. (1995).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

## **4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.3.1 Liberação de potássio para as plantas a partir das rochas**

Observou-se efeito positivo da adição de pó de rocha, em substituição ao potássio solúvel, na absorção do nutriente e no crescimento das plantas (Tabelas 4.1 e 4.2). O pó das rochas flogopita olivina melilitito, fonólito e biotitito proporcionaram crescimento superior ao observado na testemunha não fertilizada e fertilizada com potássio solúvel, com destaque para a flogopita olivina melilitito e o fonólito (Tabela 4.1), indicando o potencial dessas rochas como fonte alternativa de K em relação à adubação potássica solúvel.

Diferenças entre as rochas no suprimento de nutrientes têm sido atribuídas a sua mineralogia. No entanto outros fatores podem ter influência na solubilização, pois o principal mineral contendo K constituinte do fonólito é o feldspato, enquanto que as micas, flogopita e biotita, são constituintes da flogopita (Flogopita Olivina Melilitito) e biotitito (Apatita Biotita Peroxenito), nos quais o mecanismo de disponibilização deveria ser o mesmo, onde o K é removido das entrecamadas (WANG et al., 2000).

A inoculação com microrganismos solubilizadores não promoveu o crescimento das plantas em relação à testemunha não inoculada, mas observaram-se diferenças entre os microrganismos. O crescimento vegetal foi maior quando se utilizaram os isolados MSF-364 e MSF-357 quando comparado aos tratamentos com o isolado MSF-331. Isso indica que, embora esses tratamentos não tenham sido superiores à testemunha, pode ser preferível inocular os dois primeiros microrganismos a correr o risco de que haja a colonização do substrato pelo terceiro.

Na interação entre fonte e isolados, analisando-se os efeitos dos isolados dentro das diferentes fontes, observou-se que o isolado MSF-331 apresentou comportamento diferente dependendo da fonte considerada. Nos tratamentos com rochas foi o que proporcionou menor peso de matéria seca, comportamento esse que estatisticamente foi negativo na presença de fonólito (Tab. 4.1). Arbieto (2005) utilizou esse mesmo isolado e observou comportamento semelhante. As plantas inoculadas com esse microrganismo apresentaram absorção de K inferior à testemunha e não houve efeito na produção de matéria seca. Entretanto, o isolado promoveu o crescimento das plantas na presença de Carbonatito.

Lima et al. (2007) obtiveram resultados positivos com a inoculação das plantas com a bactéria *Acidithiobacillus* sp. conjuntamente com rochas potássicas (biotita xisto) e enxofre, em mistura com vermicomposto de minhoca. Como resultado, observaram maior crescimento e rendimento de alface, comparando-se com os fertilizantes minerais solúveis.

Não foram observadas semelhanças entre os resultados obtidos neste estudo no que diz respeito à aquisição de potássio e crescimento das plantas e os resultados obtido no estudo sobre a solubilização de potássio em meio de cultura descrito no capítulo 3. Por exemplo, o isolado MSF-331, que teve destaque na solubilização de K em meio de cultura foi o que teve pior desempenho no presente estudo em termos de promoção do crescimento das plantas.

Tabela 4.1. Produção de matéria seca da parte aérea ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) de plantas de alface cultivadas em substrato suplementado com diferentes fontes de potássio e inoculado com microrganismos solubilizadores de nutrientes.

Isolados	Fontes de Potássio					Média
	TNP <sup>(1)</sup>	TNPK	TNPBUNBIO	TNPFlo	TNPFono	
MSF 364	41 a B <sup>(2)</sup>	174 a B	713 a A	1.123 a A	1.211 a A	652 a
MSF 357	31 a B	178 a B	502 a AB	910 a A	885 a A	501 a
MSF 365	9 a B	64 a B	375 a B	952 a A	933 a A	467 ab
MSF 331	39 a B	109 a B	253 a AB	646 a A	174 b AB	244 b
Testemunha	13 a B	16 a B	488 a AB	901 a A	951 a A	474 ab
Média	26 C	108 C	466 B	906 A	831 A	

<sup>(1)</sup> TNP – testemunha NP; TNPK – testemunha NPK; BUNBIO – biotitito; Flo – flogopita olivina melilitito; Fono – fonólito.

<sup>(2)</sup> Valores seguidos pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Em relação ao teor de potássio presente nos tecidos das plantas, o padrão observado foi semelhante ao obtido na produção da matéria seca. Assim, a flogopita olivina melilitito e o fonólito proporcionaram um aumento na absorção de potássio, já o biotitito teve a mesma eficiência que a testemunha fertilizada (TNPK) (Tab. 4.2). Considerando-se as médias gerais das inoculações, não foi observado efeito em relação ao tratamento sem inoculação, mas uma comparação entre os isolados MSF-331 e MSF-364, mostra um efeito negativo do primeiro em relação ao segundo (Tab. 4.2). Não houve interação positiva entre os fatores: fonte e isolado, e o microrganismo MSF-331 se comportou da mesma maneira que nos resultados da produção de matéria seca (Tab. 4.2).

Tabela 4.2. Potássio na parte aérea ( $\mu\text{g planta}^{-1}$ ) de plantas de alface cultivadas em substrato suplementado com diferentes fontes de potássio e inoculado com microrganismos solubilizadores de nutrientes.

Isolados	Fontes de Potássio					Média
	TNP <sup>(1)</sup>	TNPK	TNPBUNBIO	TNPFlo	TNPFono	
MSF 364	130 a C <sup>(2)</sup>	179 a C	914 a BC	1620 a AB	2035 a A	976 a
MSF 357	27 a C	230 a BC	582 a BC	1098 a AB	1660 a A	719 ab
MSF 365	113 a C	132 a C	460 a BC	1258 a AB	1536 a A	700 ab
MSF 331	80 a A	402 a A	338 a A	840 a A	246 b A	382 b
Testemunha	10 a C	20 a C	525 a BC	1014 a AB	1937 a A	701 ab
Média	72 C	193 BC	564 B	1166 A	1483 A	

<sup>(1)</sup> TNP – testemunha NP; TNPK – testemunha NPK; BUNBIO – biotitito; Flo – flogopita olivina melilitito; Fono – fonólito.

<sup>(2)</sup> Valores seguidos pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )

#### 4.3.2 Liberação de fósforo para as plantas a partir das rochas

Os resultados obtidos neste estudo, sobre a liberação de fósforo a partir das rochas e a inoculação com microrganismos solubilizadores, foram submetidos às mesmas comparações do estudo anterior. Avaliou-se o efeito de isolado e de rochas em relação à produção de matéria seca e o teor de fósforo na parte aérea das plantas.

Considerando-se as médias gerais das fontes de fósforo, o biotitito foi a rocha que proporcionou maior crescimento das plantas, representando um aumento de 207 % no peso de matéria seca em relação à testemunha TNPK (Tab. 4.3). No estudo anterior, a mesma rocha também se mostrou eficiente na substituição da adubação potássica solúvel.

Arbieto (2005) obteve efeito positivo ao utilizar flogopita olivina melilitito, sendo o tratamento com essa rocha aquele que proporcionou maior produção de matéria seca. Esse tratamento foi, inclusive, superior ao tratamento fertilizado com fósforo solúvel.

Efeito de isolado foi observado em relação ao peso da matéria seca da parte aérea, quando se utilizou o isolado MSF-360 que acrescentou em 91 % ao peso de matéria seca das plantas, em relação à testemunha não inoculada. Os demais microrganismos não diferiram estatisticamente da testemunha não inoculada (Tabela 4.3).

A combinação do isolado MSF-360 com o biotitito proporcionou maior peso de matéria seca que as demais combinações. Na testemunha fertilizada com nitrogênio, fósforo e potássio solúvel (TNPK), a presença do microrganismo MSF- 357 auxiliou o crescimento das plantas (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Produção de matéria seca da parte aérea ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) de plantas de alface cultivadas em substrato suplementado com diferentes fontes de fósforo e inoculado com microrganismos solubilizadores de nutrientes.

Isolados	Fontes de fósforo				Média
	TNK <sup>(1)</sup>	TNPK	TNKBUNBIO	TNKFlo	
MSF 360	50 a B	77 ab B	420 a A	72 a B	155 a
MSF 357	59 a C	178 a AB	263 b A	65 a BC	141 ab
MSF 363	45 a B	67 ab B	286 b A	50 a B	112 ab
MSF 331	34 a B	109 ab AB	197 b A	38 a B	94 ab
Testemunha	11 a B	16 b B	204 b A	95 a AB	81 b
Média	40 B	89 B	274 A	89 B	

<sup>(1)</sup> TNP – testemunha NP; TNPK – testemunha NPK; BUNBIO – biotitito; Flo – flogopita olivina melilitito

<sup>(2)</sup> Valores seguidos pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

No estudo de determinação de teor de fósforo na parte aérea de plantas de alface, as fontes de rocha tiveram o mesmo comportamento que aquele observado na avaliação da produção de matéria seca. O biotitito foi a rocha que proporcionou a maior acumulação de

fósforo, com 57  $\mu\text{g}$  por planta, representando um aumento de 72 % em relação à testemunha TNPK (Tabela 4.4).

A inoculação não promoveu incremento no teor de fósforo nos tecidos das plantas quando comparada à testemunha não inoculada em relação a media geral. Porém, quando se observam as interações entre isolados e tratamentos de adubação, nota-se que no tratamento onde a fonte de fósforo era o biotitito, a inoculação do isolado MSF-331 proporcionou efeito negativo sobre nessa variável em comparação com os isolados MSF-363 e MSF-360. Tal comportamento também foi observado no estudo anterior sobre a liberação de potássio (cf. item 4.3.1).

Os isolados MSF-360, MSF-363 e o tratamento não inoculado promoveram maior aquisição de fósforo no tratamento com biotitito, enquanto que o isolado MSF-331, de alguma maneira ainda não determinada, promoveu aquisição desse nutriente pelas plantas no tratamento TNPK (Tabela 4.4).

Tabela 4.4. Fósforo na parte aérea ( $\mu\text{g planta}^{-1}$ ) de plantas de alface cultivadas em substrato suplementado com diferentes fontes de fósforo e inoculado com microrganismos solubilizadores de nutrientes.

Isolados	Fontes de fósforo				Média
	TNK <sup>(1)</sup>	TNPK	TNKBUNBIO	TNKFlo	
MSF 360	25,9 a B	22 a B	79 a A	22,7 a B	38 a
MSF 357	13,9 a A	37,6 a A	41,6 ab A	17,3 a A	28 a
MSF 363	31,9 a B	25,8 a B	78,9 a A	28 a B	41 a
MSF 331	16,6 a B	57,19 a A	37,8 b AB	12,7 a B	31 a
Testemunha	6,9 a B	22,9 a AB	44,8 ab A	18,3 a AB	23 a
Média	19 B	33 B	57 A	20 B	

<sup>(1)</sup> TNP – testemunha NP; TNPK – testemunha NPK; BUNBIO – biotitito; Flo – flogopita olivina melilitito

<sup>(2)</sup> Valores seguidos pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Estudos sobre a resposta de plantas à adição de super-fosfato triplo e à inoculação com MSF na cultura do rabanete mostram que a inoculação, quando analisada como fator isolado, não promoveu aumentos na quantidade total de P absorvido pelas plantas (NARLOCH et al., 2002). Esses autores sugerem que apesar da ausência de valores significativos nas quantidades de P absorvido, aliada à maior produção de matéria seca nos tratamentos inoculados e com baixas doses de P, os fungos inoculados foram capazes de produzir hormônios vegetais ou outras substâncias promotoras do crescimento das plantas que proporcionaram maior crescimento. Freitas; Banerjee e Germida (1997) também observaram maior crescimento e rendimento de plantas de canola (*Brassica napus*) com a inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfatos, embora sem qualquer efeito sobre a quantidade de P absorvido. Mas Stamford et al. (2005), em experimento com um Espodossolo da Zona da Mata de Pernambuco, cultivado com sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia*), relatam que a utilização de fosfato natural revestido com enxofre, e inoculado com *Acidithiobacillus* teve efeito significativo e com resposta mais evidenciada do que com aplicação de super-fosfato triplo.

Observa-se nesse breve relato da literatura a grande divergência entre os resultados dos diferentes autores. Assim, a inoculação de plantas com MSF, selecionados previamente em estudo *in vitro*, em meios de cultura, tem apresentado efeitos contraditórios quando se passa a estudos mais complexos ao nível de inoculação das plantas.

Com relação ao isolado MSF-331, que teve efeito negativo sobre o crescimento das plantas, é possível que esse fato esteja relacionado à produção e liberação de metabólitos deletérios ao crescimento das plantas. Muitos microrganismos do solo ou da rizosfera podem liberar substâncias, tais como cianetos e álcoois, por exemplo, que interferem com processos celulares da raiz e, como consequência, prejudicam o crescimento da planta (LYNCH, 1990).

Assim, alguns isolados podem apresentar efeitos negativos quando em presença das plantas, pois sua seleção foi baseada numa única característica, a solubilização de fosfato em

meio de cultura. Uma vez na presença das plantas, esses microrganismos selecionados podem expressar outras características, e algumas que podem ser prejudiciais ao desenvolvimento vegetal ou competir com a planta pelo nutriente em questão (Narloch et al., 2002).

Note-se que apesar da ausência de um efeito superior dos tratamentos de inoculação em relação ao tratamento não inoculado não se pode afirmar que a inoculação seja desnecessária. Em muitos casos, pode ser preferível fazer a inoculação do que deixar que um microrganismo deletério, como o isolado MSF-331, colonize a planta. Não se pode esquecer que os benefícios da introdução de microrganismos extrapolam os efeitos da solubilização de nutrientes para a planta, como a produção de reguladores de crescimento, dentre outros. Isso envolve uma complexa interação da planta com os microrganismos. Waisel, Eshel e Kafkafi (2002) afirmam que a colonização das raízes por microrganismos pode resultar na substituição de espécies deletérias na rizosfera por espécies benéficas.

Theodoro e Leonardos (2006) em um longo experimento de 4 anos afirmam que os resultados da pesquisa com uso da "Rochagem" apresentam vantagens econômicas, ambientais e produtivas significativas, em culturas de milho, arroz, mandioca, cana-de-açúcar e hortifrutigranjeiros, em comparação à adubação convencional. Os resultados demonstraram que essa tecnologia é uma alternativa de baixo custo e extremamente simples para fertilizar ou recuperar solos degradados, que pode conduzir à sustentabilidade e, também, a níveis de produção compatíveis com a manutenção dos agricultores em seus lotes.

A aplicação de fertilizantes em forma de rochas em ambientes tropicais tem muitas vantagens. Em primeiro lugar, a velocidade de dissolução das rochas e minerais e a reação entre a superfície mineral e a solução do solo são reforçadas pelas altas temperaturas e umidade encontradas nesse ambiente. Em segundo lugar, o potencial de aplicação de rochas e minerais aos solos é elevado, pois os solos nessas regiões são caracterizados por baixos

índices de nutrientes devidos às elevadas umidade e lixiviação, e, assim, altamente reativos à adição de nutrientes (STRAATEN, 2006).

## CONCLUSÕES

As rochas flogopita olivina melilitito, fonólito e biotitito, especialmente as duas primeiras, possuem potencial para serem utilizadas como fonte de potássio.

O biotitito possui potencial para ser utilizado como fonte de fósforo.

Os microrganismos MSF-364 e MSF-357 apresentam potencial para serem utilizados em programa de inoculação visando a solubilização de potássio e o microrganismo MSF-360 possui potencial para ser utilizado na solubilização de fósforo.

## **DESAFIOS E PERSPECTIVAS FUTURAS**

O uso de microrganismos na promoção do crescimento das plantas tem sido amplamente explorado na biotecnologia, sendo, assim, uma área em plena expansão em decorrência de seu grande potencial aplicativo. Entretanto, sua efetiva participação como insumo biológico a favor da produção agrícola é bastante restrito, apresentando limitações com relação à sensibilidade e à especificidade do microrganismo (ROSADO, 2000).

O breve relato mostra um panorama de desafios a ser superados para o desenvolvimento de estratégias e procedimentos inovadores a partir de estudos centrados em bases moleculares e celulares na promoção do crescimento e proteção vegetal e na prospecção da diversidade microbiana em escala estrutural e funcional.

As estratégias para uso de microrganismos a favor da produção vegetal envolvem a ativação de comunidades microbianas nativas pelo manejo do solo e do ambiente ou a inoculação das plantas ou do solo com microrganismos selecionados (geneticamente modificados ou não).

Os efeitos de uma possível interferência no ambiente (solo), provocados pela introdução de um microrganismo, podem ser avaliados pelos princípios gerais da teoria de ecossistemas e sucessão ecológica, relações mutualísticas que constituem estratégias promissoras para introdução e o estabelecimento destes microrganismos no ambiente de produção agrícola, gerando oportunidades para o desenvolvimento de tecnologias de inoculação efetivas (OLIVARES, 2007).

As pesquisas científicas voltadas para a investigação da biodiversidade microbiana realizadas no País são, em sua maioria, iniciativas isoladas de pesquisadores ou instituições de pesquisa. Muitas vezes, o mesmo problema em um mesmo bioma é estudado por vários

grupos de pesquisa, mas raramente de forma integrada. Em consequência, há dificuldades para comparar e integrar os diversos resultados das pesquisas devido à incompatibilidade de delineamentos experimentais, metodologias de coleta e de análise de dados.

As amostras coletadas, os microrganismos isolados e caracterizados não são preservados em coleções de referência permanentes impossibilitando, portanto, a continuidade dos estudos para atingir o desenvolvimento científico e tecnológico.

Faltam iniciativas integradas e interdisciplinares direcionadas a investigar as interações entre a microbiota e a biosfera, os efeitos das mudanças globais (de origem natural e antrópica) e as relações interespecíficas no ambiente. Esses estudos devem contemplar não apenas levantamentos taxonômicos da diversidade, mas também avaliar os aspectos de diversidade funcional e processos ecológicos associados à microbiota. Estudos dessa natureza contribuirão, decisivamente, para o conhecimento e o uso da diversidade microbiana para fins biotecnológicos (CANHOS; MANFIO, 2006).

Lugtenber et al. (2002) afirmam que o desafio da microbiologia nos últimos tempos foi entender o comportamento microbiano sob condições laboratoriais, mas o próximo desafio é entender seu comportamento no ambiente natural. Como sobrevivem sob condições hostis, quais as condições favoráveis para sua proliferação. Portanto, será necessário entender quais genes são expressos, quais suas funções, como os produtos desses genes interagem e como esses processos dependem das condições bióticas e abióticas do meio.

O modo pelo quais os microrganismos colonizam os tecidos da planta é um ponto importante para entender se a interação a ser estabelecida será benéfica ou não. A superfície da planta contém muitos microrganismos que não estão homogeneamente distribuídos, constituindo micro-colônias ou biofilmes, que são locais ideais para a comunicação bacteriana, conhecida como *quorum sensing*. Essa comunicação pode ocorrer entre

microrganismos na mesma população e com outras populações, através de sinais moleculares liberados no meio (LUGTENBER et al., 2002).

O entendimento da regulação desses sinais moleculares pode levar à manipulação de parâmetros da comunicação microbiana resultando em aumento no crescimento das plantas (GRAY; SMITH, 2005).

Existem propriedades do solo que são determinantes para a colonização e a sobrevivência dos microrganismos. Assim, nem todos os microrganismos que auxiliam no crescimento das plantas resultarão em bons inoculantes. Um fator relevante para o microrganismo ser um bom inoculante é que sua permanência no solo seja prolongada após a inoculação (WAISEL; ESHEL; KAFKAFI, 2002). Uma população que seja introduzida e tenha seu crescimento rapidamente inibido não possui habilidade competidora com a biota nativa do solo. Assim, a necessidade de se estabelecer uma alta densidade populacional com a introdução de um inoculante no ambiente rizosférico é visto como uma limitação ao sucesso à exploração agrônômica dos microrganismos promotores do crescimento de plantas (CHABOT et al., 1998).

Mas, acima de tudo, o desafio será a transferência de novas tecnologias ao pequeno produtor.

## REFERÊNCIAS

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

ALEXANDER, M. **Introducción a la Microbiología del suelo**. México: AGT, 1980. 491 p.

ALMEIDA, J. Da ideologia do progresso à idéia de desenvolvimento (rural) sustentável. *In*: ALMEIDA, J., NAVARRO Z., organizadores. **Reconstruindo a agricultura: idéias e ideais na perspectiva do desenvolvimento rural sustentável**. 2.ed. Porto Alegre: Universidade/UFRGS, 1998. p. 33-55.

ALMEIDA, R. S. **Identificação e caracterização de genes de transportadores de fosfato em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. Piracicaba-SP, 2002. 76 f. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura de Luiz de Queiroz.

ANDA – **Associação Nacional para Difusão de Adubos**. Disponível em: <<http://www.anda.org.br>>. Acesso em: 29 de abril 2007.

ARAÚJO, R.S.; HUNGRIA, M. **Microrganismos de Importância Agrícola**. EMBRAPA-CNPAF-Centro Nacional de Pesquisa de Soja. Brasília, 1994, 236 p.

ARBIETO, E. A. M. de. **Biodisponibilização de nutrientes de rochas por microorganismos do solo**. Florianópolis-SC, 2005. 81f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

ARORA, D.; GAUR, A. C. Microbial solubilization of different inorganic phosphates. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 17, p. 1258-1261, 1979.

BABU-KHAN, S. et al. Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 972-978, 1995.

BANIK, S.; DEY, B. K. Available phosphate content of an Alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphates-solubilizing microorganisms. **Plant and Soil**, v. 69, p.353-364, 1982.

BIGARELA, J.J.; BECKER, R. D.; dos SANTOS, G. F. **Estrutura e origem das paisagens tropicais e subtropicais**. Fundamentos geológicos-geográficos, alteração químicas e físicas das rochas, relevo córstico e dômico. Florianópolis, Editora da UFSC, 1994, v. 1, 425p.

BOLAN, N.S. et al. Influence of low molecular-weight organic acids on the solubilization of phosphates. **Biology and Fertility of Soils**. v. 18, p. 311-319, 1994.

BOLLAND, M.D.A.; BAKER M.J. Powdered granite is not an effective fertilizer for clover and wheat in sandy soils from Western Australia. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**. v. 56, p. 59–68. 2000.

BOUGHER, N. L.; MALAJCZUK, N. Effects of high soil moisture on formation of ectomycorrhizas and growth of karri (*Eucalyptus diversicolor*) seedlings inoculated with *Descolea maculata*, *Pisolithus tinctorius* and *Laccaria laccata*. **New Phytologist**, Cambridge. v. 114, p. 87-91, 1990.

BRAGA, N. R. et al. Eficiência agrônômica de nove fosfatos em quatro cultivos consecutivos de soja. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 15, p. 315- 319, 1991.

BRANCO, S.M.; MURGEL, P. H.; CAVINATTO, V. M. Compostagem: solubilização biológica de rocha fosfática na produção de fertilizante organomineral. **Engenharia sanitária e ambiental**, v. 6, n. 3 - jul/set 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 007**. Brasília, DF. 17/05/1999. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 05 de maio 2005.

BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery of strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 573–606. 2000

CANHOS, V. P.; MANFIO, G. P. **Recursos Microbiológicos para Biotecnologia**. Disponível em: < [http://www.anbio.org.br/pdf/2/mct\\_recursos\\_biologicos.pdf](http://www.anbio.org.br/pdf/2/mct_recursos_biologicos.pdf)>. Acesso em: abril de 2006.

CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. Campinas, SP: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. 360p.

CASSMAN, K.G. Ecological intensification of cereal production systems: yield potential, soil quality and precision agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 96, p. 5952-5959, 1999.

CHABOT, R. et al. Effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 12, p. 1615-1618, 1998.

CHABOT, R.; ANTOUN, H.; CESCAS, M. P. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Plant and Soil**, v. 184, p. 311-321, 1996.

CLARK, F. E.; PAUL, E. A. **Soil Microbiology and Biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1988. 275p.

COMIN-CHIARAMONTI, P. et al. Carbonatites from southeastern Brazil: Sr-Nd-Pb systematics. **Short Papers - IV South American Symposium on Isotope Geology**, p. 520-523, 2002.

CROMER, R.N. et al. Leaf growth and photosynthetic response to nitrogen and phosphorus in seedling trees of *Gmelia arborea*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 20, p. 83-98, 1993.

CUNNINGHAM, J. E.; KUIACK, C. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilajii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 1451-1458, 1992.

DOYLE, L. M. G.; SCHARF, R.; SILVA FILHO, G.N. Avaliação da população e do potencial de microrganismos solubilizadores de fosfato de solos cultivados com fruteiras temperadas em Santa Catarina. **Biotemas**. Florianópolis, v.3, n. 2, p. 59-76, 1990.

EIRA, A. Solubilização microbiana de fosfatos. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. Campinas, SP: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992, cap. 18, p.243-255.

ESCOSTEGUY, P. A. V. ; KLAMT, E. . Basalto moído como fonte de nutrientes. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 11-20, 1998.

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

FURLANI, A. M. C. Nutrição mineral. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 1ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 452p.

GALLEGUILLOS, C. et al. Growth promotion effect of two *Sinorhizobium meliloti* strains (a wild type and its genetically modified derivative) on a non-legume plant species in specific interaction with arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant Science**, v. 159, p. 57-63, 2000.

GOEDERT, W.J. Management of the Cerrado soils of Brazil: a review. **Journal of Soil Science**, v.34, p.405-428, 1983.

GOLDSTEIN, A. H. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. **American Journal Alternativa Agrícola**, Greenbelt, v. 1, n. 2, p. 51-57, 1986.

GOMES, N. C.; OLIVEIRA, V. L.; SILVA FILHO, G. N. Solubilization of natural phosphates by ectomycorrhizal fungi from *Eucalyptus* spp. In: THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MANAGEMENT OF MYCORRHIZAS IN AGRICULTURE,

HORTICULTURE AND FORESTRY, Perth, Western Australia, 1992. **Abstracts**. Perth, The Australia Institute of Agricultural Science, 1992. p.58.

GONZALES-EGUIARTE, D.; BAREA, J. M. Fertilization biológica con fosfobacterias produtoras de fitohormonas en suelos deficientes en fósforo. Influencia de la acidición de fósforo y materia orgánica. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 17, p. 227-232, 1975.

GRANT, R.F.; ROBERTSON, J.A. Phosphorus uptake by root systems: mathematical modelling in ecosys. **Plant and Soil**, v. 188, p. 279-297, 1997.

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, p. 395-412, 2005.

GYANESHWAR, P. et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.245, n.1, p.83-93, 2002.

HARLEY, A. D.; GILKES, R. J. Factors influencing the release of plant nutrient elements from silicate rock powders: a geochemical overview. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**. v.56, p. 11-36, 2000.

HUANG, J. et al. Plant biotechnology in China. **Science**, Washington, DC, v. 295, p. 674-676, 2002.

HUNGRIA, M.; URQUIAGA, S. Transformações microbianas de outros elementos (potássio, micronutrientes e metais pesados). In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. e NEVES, M.C.P. **Microbiologia do Solo**. Campinas – SP, 1992, cap. 23, p. 329-340.

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

KATZNELSON, H.; PETERSON, E. A.; ROUATT, J. W. Phosphate-dissolving microorganisms on seed and in the root zone of plants. **Canadian Journal of Botany**, Canadá, v. 40, n. 9, p. 1041-1180, 1962.

KIM, K. Y.; JORDAN, D.; KRISHNAN, H. B. *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite. **FEMS Microbiology Letters**, v. 153, p. 273-277, 1997.

KIM, K. Y.; MCDONALD, G. A.; JORDAN, D. Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. **Biology and Fertility Soils**, v. 24, p. 347-352, 1997.

KUCEY, R. M. N. Increased phosphorus uptake by wheat and field beans inoculated with a phosphorus-solubilizing *Penicillium bilaji* strain and with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied Environmental Microbiology**, v. 53, p. 2699-2703, 1987.

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

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

LEINHOS, V.; VACEK, O. Biosynthesis of auxins by phosphate-solubilizing rhizobacteria from wheat (*Triticum aestivum*) and rye (*Secale cereale*). **Microbiological Research**, Jena, v. 149, p. 31-35, 1994.

LEYVAL, C; BERTHELIN, J. Compararison between the utilization of phosphorus from insoluble phosphates by ectomycorrhizal fungi and rhizobacteria. In: EMS/1° SEM, 1, Dijon, 1985. **Mycorrhizae: Physiology and genetics/Les mycorrhizes: Physiologie et genétique**. Paris, INRA, 1986. p.345-349.

LIMA, R. C. M. et al. Rendimento da alface e atributos químicos de um Latossolo em função da aplicação de biofertilizantes de rochas com fósforo e potássio. **Horticultura Brasileira**, v.25, n.2, p.224-229, abr./jun. 2007.

LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia Industrial**. 1ª. edição. São Paulo, 2002. v. 3, cap. 12, p. 279.

LÔBO, A. E. M. **Aplicação de Gnaisse como fonte alternativa de potássio e sua relação com o vegetal**. Projeto de pesquisa – CNPq. Brasília, 1988.

LONERAGAN, J. F. Plant nutrition in the 20th and perspectives for the 21st century. **Plant and Soil**, v. 196, p. 163-174, 1997.

LUGTENBERG, B.J.J. et al. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 373-383, 2002.

LYNCH, J.M. **The Rhizosphere**. Chichester: John Wiley, 1990. 448p.

MAAR, J. R. Justus Von Liebig, 1803-1873. Parte 1: vida, personalidade, pensamento. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n.5, p. 1129-1137, Sept./Oct. 2006.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London, Academic Press, 1995. 889p.

MASALHA, J. et al. The central role of microbial activity form iron acquisition in maize and sunflower. **Biology and Fertility Soils**, v. 30, p. 433-439, 2000.

MAUPÉRIN, C.H. et al. Viability of an ectomycorrhizal inoculum produced in a liquid medium and entrapped in a calcium alginate gel. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 65, n.11, p. 2326-2329, 1987.

MIELNICZUK, J. **O Potássio no Solo**. Instituto da Potassa-Fosfato (EUA) e Instituto da Potassa (Suíça). Piracicaba – SP, 1978.

MYERS. Environmental services of biodiversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA, v. 93, n. 7, p. 2764-2769, 1996.

NAHAS, E. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 12, p. 567-572, 1996.

NAHAS, E. Solubilização Microbiana de fosfatos e de outros elementos. In: SIQUEIRA, J.O. et al (editores). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Lavras: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 1999. Organismos e processos biológicos do solo. Capítulo IV, p. 467-486.

NAHAS, E.; ASSIS, L. C. Efeito da concentração de fosfato na solubilização de fluorapatita por *Aspergillus niger*. **Revista Brasileira de Microbiologia**, São Paulo, v. 23, p. 37-42, 1992.

NAHAS, E.; BANZATTO, D. A.; ASSIS, L. C. Fluorapatite solubilization by *Aspergillus niger* in vinasse medium. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 22, p. 1097-1101, 1990.

NAHAS, E.; TERENCEZI, H. F.; ROSSI, A. Effect of carbon source and pH on the production and secretion of acid phosphatase (EC 3.1.3.2.) and alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1.) in *Neurospora crassa*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 128, p. 2017-2021, 1982.

NARLOCH, G. et al. Resposta da cultura do rabanete à inoculação de fungos solubilizadores de fosfato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 37, n. 6, p. 841-845, 2002.

NARLOCH, G. **Interações microrganismos solubilizadores de fosfatos - fungos ectomicorrízicos e o crescimento de *Pinus taeda* L.** Florianópolis, 2002. 153 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

NELSON, T. S. et al. Hydrolysis of natural phytate phosphorus in the digestive tract of calves. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 42, n. 6, p. 1509-1512, 1976.

OLIVARES, F. L. **Microrganismos promotores de crescimento vegetal: desafios e perspectivas na agricultura brasileira**. XXXI Congresso Brasileiro de Ciências do Solo, 2007. Disponível em: < <http://www6.ufrgs.br/cbcs/palestras/FabioOlivares.pdf> > . Acesso em: Setembro de 2007.

OLIVEIRA, E. L. et al. Avaliação da eficiência agronômica de fosfatos naturais. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.8, n. 1, p. 63-67, janeiro/abril, 1984.

OSTERROHT, M. Rochagem: Pra quê? *In*: Rochagem-I: adubação com rochas silicatadas moídas. **Revista Agroecologia Hoje**, ano IV, n. 20, Agosto/Setembro, 2003.

PINHEIRO, S. A exumação do cadáver no armário. In: Rochagem-I: adubação com rochas silicatadas moídas. **Revista Agroecologia Hoje**, ano IV, n., Agosto/Setembro, 2003.

PINHEIRO, S.; BARRETO, S. B. "**MB-4**": **agricultura sustentável, trofobiose e biofertilizantes**. 5. ed. corr. [s.l.]: Fundação Juquira Candiru, 1996. 273p.

RAGHOTHAMA, K. G. Phosphate acquisition. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 665-686, 1999.

RAIJ, B. **Fertilidade do solo e adubação**. São Paulo, Ceres, 1991. 343 p.

RAIJ, B. **Potássio: Necessidade e Uso na Agricultura moderna**. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. POTAFOS. Piracicaba- SP, 1990.

REICHARDT, K.; TIMM, L. C. Absorção de nutrientes pelas plantas. In:\_\_\_\_ **Solo, planta e atmosfera: conceitos, processos e aplicações**. São Paulo: Editora Manole, 2004. cap. 16, p. 341-362.

RHEINHEIMER, D. S. et al. Fósforo orgânico do solo. In: SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A O. (editores). **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre: Gênese, 1999. p. 139-158.

ROSADO, A. S. **Diversidade e ecologia de microrganismos do solo**. In: **Reunião Brasileira de Fertilidade e Nutrição de Plantas**, 23; Reunião Brasileira sobre Micorrizas, 7; Simpósio Brasileiro de Micro-Biologia do Solo, 5; Reunião Brasileira de Biologia do Solo, 2, 2000, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 2000. CD-ROM..

ROSSI, M. J. ; OLIVEIRA, V. ; FURIGO JR, A. Produção de inoculante de fungo ectomicorrízico pro processo submerso em biorreator airlift: efeito da pressão de operação na produtividade em biomassa. In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2007, Curitiba. **Anais do VXI SINAIFERM 2007** em CD-ROM. Curitiba-PR : UFPR, 2007.

ROSSI, M. J.; OLIVEIRA, V. L.; SOUZA, J. A. R. de. Inoculum production of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* in an airlift bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.59, n. 2-3, p. 175-181, 2002.

SANCHES, P.A.; SALINAS, J.G. Low-input technology for managing Oxisols and Ultisols in tropical America. **Advances in Agronomy**, v.34, p.279-406, 1981.

SCHEIBE, L. F. **Geologia e petrologia do maciço alcalino de Lages, SC, Brasil**. São Paulo. 1986, 224 f. Tese (Doutorado). Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SCHIMEL, J. Ecosystem consequences of microbial diversity and community structure. **Ecology Study**, v. 113, p. 239-254. 1995.

SHARMA, A. et al. Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP<sub>3</sub> influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, p. 887-894, 2003.

SHARMA, A.; JOHRI, B. N. Combat of iron-deprivation through a plant growth promoting fluorescent *Pseudomonas* strain GRP3A in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). **Microbiological Research**, v. 158, p. 77-81, 2003.

SILVA FILHO, G. N. et al. População de microrganismos solubilizadores de fosfatos em viveiros e florestas de *Pinus* spp. e *Eucalyptus* spp. em S.C.. In: XXIV Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 1993, Goiânia. **Resumos do XXIV Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**. Campinas : Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1993. p. 273-274.

SILVA FILHO, G. N. **Solubilização de fosfatos pela microbiota do solo**. 1998, 140f. Tese (Doutorado em Ciências do Solo). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SILVA FILHO, G. N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, p. 847-854, 2002.

SILVA FILHO, G. N.; OLIVEIRA, V. L. **Microbiologia**: manual de aulas práticas. 2. ed. rev. Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007. 157p.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 12, p. 1495-1508, 2001.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 24, p. 311 – 319, 2000.

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

STALEY, J. T.; GOSINK, J.J. Poles apart: biodiversity and biogeography of sea ice bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p 189–215, 1999.

STAMFORD N.P. et al. Effects of rock phosphate, sulphur with and without *Acidithiobacillus* and organic by-products on mimosa (*Mimosa caesalpinifolia*) grown in a Brazilian tableland soil. **Tropical Grasslands**, v. 39, p. 54-61, 2005.

STEEL, R. G. D.; TORRIE; J. H. **Principles and procedures of statistics**: with special reference to the biological sciences. 6<sup>a</sup> ed, New York: Mc Graw-Hill Book, 1960. 481 p.

STRAATEN, P. V. Farming with rocks and minerals: challenges and opportunities. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 4, p. 731-747, 2006.

STRZELCZYK, E.; ROZYCKI, H. Production of B-group vitamins by bacteria isolated from soil, rhizosphere, and mycorrhizosphere of Pine (*Pinus sylvestris* L.). **Zentralblatt Fur Mikrobiologie**, v. 140, p. 293-301, 1985.

SWIFT, M. J. Towards the second paradigm: integrated biological management of soil. In: Siqueira, J.O.; Moreira, F.M.S.; Lopes, A.S.; Guilherme, L.R. G.; Faquin, V.; Furtini Neto, A.E.; Carvalho, J.G. (eds.) **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas: Lavras**, SBCS; UFLA/DCS, 1999. Cap. I, p.11-24.

SYLVESTER-BRADLEY, R. et al. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 12, n. 1, p.15-22, 1982.

TEDESCO, M. J. et al. **Análise do solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 174p.

THEODORO, S. C. H. **A fertilização da terra pela terra: uma alternativa para a sustentabilidade do pequeno produtor rural**. Brasília/DF, 2000. 225 f. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília - Centro de Desenvolvimento Sustentável.

THEODORO, S. C. H., LEONARDOS, O. H. The use of rocks to improve family agriculture in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 4, p. 721-730, 2006.

TILMAN, D. et al. Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature**, London, v. 418, p. 671-677, 2002.

TSAI, S. M.; ROSSETTO, R. Transformações microbianas do fósforo. In: CARDOSO, Elke J. B. N.; TSAI, Sui M.; NEVES, Maria Cristina P. **Microbiologia do solo**. Campinas, SP: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. 360p.

URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.; NEVES, M. C. P. **A necessidade de uma revolução mais verde: FERTBIO 1999**, Lavras – MG. Lavras: UFLA, 1999.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers, **Plant and Soil**, v. 255, p. 571-586, 2003.

VIG, A. C.; DEV, G. Phosphorus adsorption characteristics of some acid and alkaline soils. **Journal of the Indian Society of Soil Science**, v. 32, p. 235-239, 1984.

VOSE, P.B. Rationale of selection for specific nutritional characters in crop improvement with *Phaseolus vulgaris* L. as a case of study. **Plant and Soil**, v.72, p.351-364, 1983.

WASEL, Y.; ESHEL, I.; KAFKAFI, A. **Plant Roots: The Hidden Half**. 3ª Edição, revisada e expandida. New York, USA: Marcel Dekker Incorporated, p. 897-909. 2002. Disponível em: < <http://site.ebrary.com/lib/buufsc/Doc?id=10051481&ppg=901>>. Acesso em: 29 de abril 2005.

WALLANDER, A. D.; WICKMAN, T. Biotite and microcline as potassium sources in ectomycorrhizal and non-ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings. **Mycorrhiza**, v.9, p. 25-32, 1999.

WANG, J.G. et al. Release of potassium from K-bearing mineral: Effect of plant roots under P deficiency. **Nutrient cycling in agroecosystems**. Kluwer Academic Publishers. v. 56, n. 1, p. 45 -52, 2000.

WEERASURIYA, T. J.; THILAKARATHNA P. K.; COORAY, P. I. Evaluation of phlogopite mica and K-feldspar as slow-release multinutrient fertilizers. **In:\_\_\_The dynamic geosphere**, Ed. Gupta & Kerrich, 1996, 237p.

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

YUAN, L.; HUANG, J.; LI, X.; CHRISTIE, P. Biological mobilization of potassium from clay minerals by ectomycorrhizal fungi and eucalypt seedling roots. **Plant and Soil**, v. 262, p. 351-361, 2004.

ZILLI, J. E. et al. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, set./dez. 2003.

## ANEXOS

### Anexo A

**MEIO GLICOSE-EXTRATO DE LEVEDURA (GEL)** Sylvester-Bradley et al. (1982);  
modificado por Silva Filho, (1998).

Reagentes	Quantidades
Glicose	10,0 g
Extrato de levedura	1,0 g
Solução de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ a 10 %	2 ml
Solução de $CaCl_2$ a 1 % (1)	2 ml
Solução de $NaCl$ a 1%	1 ml
Solução de micro-nutrientes (2)	2 ml
Solução de Fe-EDTA (3)	4 ml
$KNO_3$	0,1 g
Ágar-ágar	15,0 g
Água destilada	1.000 ml

- Corrigir o pH para 7,0;

(1) 1,33 g de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ /100 ml de água destilada;

(2) Dissolução de 0,2 g de  $NaMoO_4 \cdot 2 H_2O$ , 0,235 g de  $MnSO_4 \cdot 2 H_2O$ , 0,28 g de  $H_3BO_3$ , 0,008 g de  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ , 0,024 g de  $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$  em 200 ml de água destilada;

(3) Dissolução de 6,07 g de Na-EDTA e 6,17 g de  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$  em 900 ml de água destilada aquecida e depois ajustar o volume para 1.000 ml.

## Anexo B

### **Preparo de 1 l da solução P-B (molibdato de amônio) (TEDESCO et al., 1995).**

- a) Dissolver 3,8 g de molibdato de amônio ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) em 150 ml de água destilada previamente aquecida a 60 °C, em copo de Becker de 200 ml;
- b) Deixar esfriar, transferir para balão volumétrico de 200 ml e completar o volume com água destilada;
- c) Transferir para um frasco com capacidade para 1 L;
- d) Em outro balão, colocar 80 ml de água destilada;
- e) Adicionar 70,7 ml de HCl concentrado ( $d=1,191$ ; 37,7% e 12,31N) e agitar;
- f) Completar o volume com água destilada e agitar;
- g) Transferir para o frasco de 1 L, onde já se encontra a solução de molibdato de amônio e agitar;
- h) Adicionar 600 ml de água destilada, utilizando balão volumétrico de 200 ml, e agitar bem para perfeita homogeneização.

## Anexo C

**Preparo da solução P-C (ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico), (TEDESCO et al., 1995).**

a) Preparar um estoque de pó redutor, misturando e triturando em almofariz os seguintes reagentes;

- 2,50 g de ácido 1 amino 2 naftol 4 sulfônico;
- 5,0 g de sulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ),
- 146,0 g de metabissulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ );

b) Guardar o pó redutor em vidro fosco, envolto em folha de papel alumínio (validade de 40 dias);

c) Dissolver 32,0 g do pó redutor em 200 ml de água destilada morna (50-60 °C), em copo de Becker de 1000 ml;

d) Transferir para um vidro fosco escuro, após 3 a 6 dias ocorre cristalização, filtrar e utilizar (validade três semanas).

## Anexo D

### **Solução Padrão de fósforo e potássio (TEDESCO et al., 1995).**

Padrão misto concentrado (1.000 mg L<sup>-1</sup> de K e 500 mg L<sup>-1</sup> de P)

- a) Dissolver 0,704 g de KCl e 2,196 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (secos a 105 °C por 1 h) em 1 L de água destilada em balão volumétrico;

Padrão misto diluído

- b) Diluir 100 ml do padrão misto concentrado em 50 ml de água destilada em balão volumétrico;

Padrões de trabalho

- c) Pipetar alíquotas de 0, 10, 20, 35, 50, 75 e 100 ml dos padrões mistos diluídos para balões de volume de 1 L e completar com água. Estes padrões contem 0,0 - 2,0 - 4,0 - 7,0 - 10,0 - 15,0 e 20,0 mg L<sup>-1</sup> de K e 0,0 - 1,0 - 2,0 - 3,5 - 5,0 - 7,5 e 10,0 mg L<sup>-1</sup> de P.

## Anexo E

Teor de K ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) total no meio glicose extrato de levedura, suplementado com rochas, inoculado com microrganismos solubilizadores e incubado por 15 dias.

Isolados	Rochas														média
	Bio	Flo	FonoPB	Rio	SC	Fono	Sb	IBFe	Pe	IBL	BC	A	Abio	T0	
<b>365</b>	299,9	227,3	185,4	102,0	90,1	144,2	80,7	69,1	69,8	64,6	64,0	57,4	53,5	58,0	111,9
<b>305</b>	271,8	196,5	222,9	98,6	88,9	137,6	86,5	70,6	70,0	67,1	60,7	63,3	57,6	63,3	111,1
<b>360</b>	270,1	208,8	185,2	103,0	93,9	139,3	79,8	66,2	69,6	64,6	64,3	56,7	54,0	61,3	108,3
<b>357</b>	310,0	231,0	151,8	97,2	84,2	140,2	76,2	66,6	66,2	60,1	58,2	58,3	52,1	56,3	107,7
<b>362</b>	283,3	199,9	179,9	97,1	90,0	116,3	82,9	69,0	71,5	65,1	58,6	56,8	55,3	59,2	106,1
<b>331</b>	282,0	211,9	190,7	92,8	79,7	159,3	68,7	62,5	65,1	58,1	57,4	54,5	47,3	52,6	105,9
<b>363</b>	270,4	187,5	171,8	97,4	91,3	140,5	78,4	67,8	71,9	64,8	57,9	55,8	53,2	58,7	104,8
<b>364</b>	288,3	217,0	183,2	91,1	81,2	132,2	72,7	59,4	62,2	56,5	54,0	53,2	50,7	52,0	103,8
<b>293</b>	241,5	142,7	124,8	95,7	82,9	60,7	65,7	74,1	69,6	69,9	73,4	54,5	49,9	67,0	90,9
<b>85</b>	198,1	154,7	71,5	88,1	77,2	35,1	78,5	78,7	73,5	75,2	76,8	50,4	46,2	72,7	84,1
<b>62</b>	223,1	135,5	124,2	87,6	68,7	58,1	62,6	67,3	62,4	61,7	63,7	45,8	44,0	61,1	83,3
<b>345</b>	189,3	142,4	72,5	89,5	76,2	32,7	75,7	79,8	74,5	75,3	78,9	46,8	43,7	71,9	82,1
<b>353</b>	174,9	155,7	67,0	87,7	75,8	30,3	75,0	78,1	76,1	74,3	74,4	45,2	42,4	74,2	80,8
<b>359</b>	164,7	157,8	71,3	83,6	79,3	24,3	71,7	75,4	73,0	78,4	74,4	48,7	44,8	73,6	80,1
<b>351</b>	188,1	145,4	68,8	85,7	72,9	25,7	76,2	75,7	72,9	74,1	75,4	45,7	41,2	66,4	79,6
<b>344</b>	188,8	146,5	67,9	86,1	67,9	35,7	71,8	66,2	71,4	72,0	71,8	48,9	43,5	73,6	79,4
<b>348</b>	165,4	147,0	69,3	89,5	74,9	26,0	73,7	70,8	74,3	73,6	73,8	46,4	40,2	72,0	78,3
<b>341</b>	186,7	135,6	76,4	84,7	70,8	23,0	66,5	73,8	70,7	62,8	72,3	48,3	43,7	68,0	77,4
<b>352</b>	180,6	140,4	65,7	80,4	73,3	32,4	67,7	72,6	68,9	73,3	69,9	44,9	39,9	67,7	77,0
<b>361</b>	176,0	147,2	63,5	75,2	68,8	34,8	69,5	72,2	65,8	68,5	69,5	43,9	41,2	68,0	76,0
<b>249</b>	170,0	134,1	91,5	79,6	62,3	46,9	53,5	61,8	58,0	55,4	52,5	33,4	35,9	55,3	70,7
<b>358</b>	194,5	144,2	2,4	72,1	50,6	57,5	45,2	45,8	49,3	46,6	48,7	33,1	34,0	47,3	62,2
<b>366</b>	186,1	112,0	43,3	52,7	27,8	20,3	23,3	26,9	26,5	28,0	30,6	26,0	22,5	29,9	46,8
<b>T0</b>	196,6	170,5	72,9	89,1	83,0	28,1	78,6	82,1	76,1	79,6	78,3	54,7	48,7	<b>77,0</b>	86,8
média	220,8	166,3	109,3	87,8	75,5	70,0	70,0	68,0	67,1	65,4	65,0	48,9	45,2	62,8	

**Anexo F****SOLUÇÃO NUTRITIVA**

(BOUGHER; MALAJCZUK, 1990).

<b>Nutriente</b>	<b>Quantidade</b>
K	50 mg
Ca	29 mg
N	18 mg
Mn	4,2 mg
Mg	3,3mg
Zn	2,1 mg
Cu	2,1 mg
Mo	0,25 mg
B	0,12 mg
Co	0,08 mg

Obs: O potássio não foi adicionado à solução nutritiva.

## Anexo G

Experimento 1: Inoculação microrganismos solubilizadores e rochas como fonte de potássio.

Microrganismo	Material	Quantidade	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	KCl
MSF-357	Biotito	0,51 g	57 mg	174 mg	0
MSF-331		0,51 g	57 mg	174 mg	0
MSF-364		0,51 g	57 mg	174 mg	0
MSF-365		0,51 g	57 mg	174 mg	0
Sem m.o.		0,51 g	57 mg	174 mg	0
MSF-357	Flogopita	0,54 g	57 mg	174 mg	0
MSF-331		0,54 g	57 mg	174 mg	0
MSF-364		0,54 g	57 mg	174 mg	0
MSF-365		0,54 g	57 mg	174 mg	0
Sem m.o.		0,54 g	57 mg	174 mg	0
MSF-357	Fonólito	0,37	57 mg	174 mg	0
MSF-331		0,37	57 mg	174 mg	0
MSF-364		0,37	57 mg	174 mg	0
MSF-365		0,37	57 mg	174 mg	0
Sem m.o.		0,37	57 mg	174 mg	0
MSF-357	TNP	0	57 mg	174 mg	0
MSF-331		0	57 mg	174 mg	0
MSF-364		0	57 mg	174 mg	0
MSF-365		0	57 mg	174 mg	0
Sem m.o.		0	57 mg	174 mg	0
MSF-357	TNPK	0	57 mg	174 mg	38,1 mg
MSF-331		0	57 mg	174 mg	38,1 mg
MSF-364		0	57 mg	174 mg	38,1 mg
MSF-365		0	57 mg	174 mg	38,1 mg
Sem m.o.		0	57 mg	174 mg	38,1 mg

OBS: Cada tratamento foi realizado com 4 repetições.

Experimento 2: Inoculação microrganismos solubilizadores e rochas como fonte de fósforo.

Microrganismo	Material	Quantidade	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	KCl
MSF-357	Biotito	0,93 g	57 mg	0	38,1 mg
MSF-331		0,93 g	57 mg	0	38,1 mg
MSF-360		0,93 g	57 mg	0	38,1 mg
MSF-363		0,93 g	57 mg	0	38,1 mg
Sem m.o		0,93 g	57 mg	0	38,1 mg
MSF-357	Flogopita	13,3 g	57 mg	0	38,1 mg
MSF-331		13,3 g	57 mg	0	38,1 mg
MSF-360		13,3 g	57 mg	0	38,1 mg
MSF-363		13,3 g	57 mg	0	38,1 mg
Sem m.o		13,3 g	57 mg	0	38,1 mg
MSF-357	TNK	0	57 mg	0	38,1 mg
MSF-331		0	57 mg	0	38,1 mg
MSF-360		0	57 mg	0	38,1 mg
MSF-363		0	57 mg	0	38,1 mg
Sem m.o		0	57 mg	0	38,1 mg
MSF-357	TNPK	0	57 mg	174 mg	38,1 mg
MSF-331		0	57 mg	174 mg	38,1 mg
MSF-360		0	57 mg	174 mg	38,1 mg
MSF-363		0	57 mg	174 mg	38,1 mg
Sem m.o		0	57 mg	174 mg	38,1 mg

OBS: Cada tratamento foi realizado com 4 repetições.