

SOLOS E IRRIGAÇÃO

MICROORGANISMOS DO SOLO PRODUTORES DE FOSFATASES EM DIFERENTES SISTEMAS AGRÍCOLAS⁽¹⁾

ELY NAHAS^(2,3)

RESUMO

Considerando-se que uma forma de prover fosfato disponível para as plantas é através da atividade mineralizadora microbiana do fósforo orgânico, avaliou-se a influência da planta (braquiária, guandu e sem planta), dos fertilizantes (superfosfato simples, fosfato de rocha e sem adubo) e da calagem (com e sem calcário) nas populações de microrganismos produtores de fosfatases ácida e alcalina. Do total de bactérias, 70,6% apresentaram atividade de fosfatase alcalina e 58,2% de fosfatase ácida e dos fungos, 64,3% e 84,7% respectivamente. Esses dados mostram número significativo de microrganismos com habilidade de mineralização do fósforo orgânico. Observou-se efeito restritivo do guandu sobre as bactérias e fungos produtores de fosfatases alcalina e ácida, cujos números foram sempre inferiores aos obtidos com a cultura de braquiária ou com as parcelas sem cultivo. Maior número de bactérias produtoras de fosfatase alcalina foi obtido nos tratamentos com superfosfato e controle do que com fosfato de rocha. Ao contrário, para os fungos, encontrou-se maior número nas parcelas não fertilizadas que as adubadas com fosfato. O número de fungos com atividade de fosfatase ácida diminuiu por efeito da calagem, enquanto o das bactérias aumentou. Finalmente, o número de bactérias produtoras de fosfatase alcalina superou o de fungos. **Palavras-chave:** bactérias, fungos, fosfatase ácida, fosfatase alcalina, fosfato de rocha, superfosfato, braquiária, guandu, calagem.

ABSTRACT

SOIL MICROORGANISMS PHOSPHATASE PRODUCERS IN DIFFERENT AGRICULTURAL SYSTEMS

Considering that one way for providing available phosphate to plants is by the microbial activity for the mineralization of organic phosphorus, the influence of plants (*Brachiaria ruziziensis*, *Cajanus cajan* and control), fertilizers (superphosphate, rock phosphate and control) and liming (with and without lime) was evaluated in the microorganisms populations of the acid and alkaline phosphatase producers. Among bacteria, 70,6% showed alkaline phosphatase activity and 58,2% acid phosphatase activity and among fungi, 64,3% and 84,7%, respectively. These numbers show that a significant population of microorganisms shows ability for organic phosphorus mineralization. Restrictive effect of the *C. cajan* was observed on the bacteria and fungi producers of the alkaline and acid phosphatases whose numbers always were lower to those obtained with the *B. ruziziensis* or with the plots without cultivation. Larger number of alkaline phosphatase bacterial producers was obtained in the treatments with superphosphate and control than that with rock phosphate. On the opposite, for fungi, a larger number was found in the plots with no fertilizer compared to the ones with fertilizer. The population of fungi having acid phosphatase activity decreased in the limed plots whereas the bacterial population increased. Finally, the alkaline phosphatase bacterial producers showed higher enzymatic activity than those of the fungi.

Key words: bacteria, fungi, acid phosphatase, alkaline phosphatase, rock phosphate, superphosphate, *Brachiaria ruziziensis*, *Cajanus cajan*, liming.

⁽¹⁾ Recebido para publicação em 27 de novembro de 2001 e aceito em 17 de setembro de 2002.

⁽²⁾ Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agronômicas (UNESP). Via de acesso Professor Paulo Donato Castellane, s/n, 14884-900 Jaboticabal (SP). E-mail: enahas@fcav.unesp.br

⁽³⁾ Com bolsa de produtividade científica do CNPq.

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos são reconhecidos por sua habilidade em promover transformações bioquímicas dos nutrientes e por sua importância em prover os elementos nutritivos de interesse às plantas, principalmente N, P e S (PAUL e CLARK, 1989). Pode-se inferir essas transformações pela quantificação do número de microrganismos ou por sua atividade (NANNIPIERI et al., 1978; VIEIRA e NAHAS, 1998). Pelas transformações dos compostos fosfatados, por meio de reações de solubilização do fósforo inorgânico e de mineralização do fósforo orgânico, forma-se fosfato solúvel que pode ser utilizado pelas plantas para seu crescimento (BERTON et al., 1997). Contudo, pouca importância tem sido dada aos compostos orgânicos fosfatados uma vez que em inúmeros solos constituem a maior fração do fósforo, podendo contribuir para o crescimento de plantas.

Os compostos P-orgânicos do solo constituem-se, principalmente, por fitinas, ácidos nucléicos, fosfolipídeos e seus derivados (CASIDA, 1959) e são hidrolisados por enzimas dos grupos das fitases, nucleases e fosfolipases, podendo formar, no final do processo de hidrólise, fosfomonoésteres que são hidrolisados pelas fosfomonoesterases (PANG e KOLENKO, 1986). Essas enzimas são conhecidas genericamente pelo nome de fosfatases e catalisam a hidrólise de compostos fosfatados orgânicos com a produção de fósforo solúvel. Inúmeras fosfatases são reconhecidas por sua habilidade em hidrolisar mono ou diésteres fosfóricos (FEDER, 1973), tendo sido estudadas em vários microrganismos em seus aspectos bioquímicos e fisiológicos (HAN et al., 1987).

No solo, têm-se contemplado os estudos sobre o isolamento e a caracterização dos microrganismos, mas não com o objetivo de avaliar o potencial de mineralização do P orgânico pelas populações microbianas em diferentes ambientes. Mais de 2.000 culturas foram isoladas de 68 solos em meios enriquecidos, observando-se que a atividade de fitase extracelular foi encontrada nos fungos mas não em bactérias e leveduras (SHIEH e WARE, 1968).

GREAVES et al. (1970) demonstraram que a bactéria isolada de solo *Cytophaga johnsonii* produziu nucleases extracelulares que degradaram rapidamente DNA e RNA produzindo ortofosfato inorgânico. Microrganismos isolados de três espécies de gramíneas de pastagem mostraram habilidade em degradar fenolftaleína difosfato, glicerofosfato de sódio, fitato de sódio, lecitina e os ácidos nucléico e ribonucléico (GREAVES e WEBLEY, 1965).

Dentre as três bactérias isoladas de solo, uma, pertencente ao gênero *Pseudomonas*, apresentou alta atividade de fitase e as outras, atividade enzimática para degradação de penta-fosfatos e tetra-fosfatos (COSGROVE et al., 1970). A bactéria isolada do solo contaminado por chumbo, *Citrobacter* sp., mostrou habilidade em acumular fosfato de cádmio em decorrência da produção de ácido fosfórico liberado pela fosfatase secretada pela bactéria (MONTGOMERY et al., 1995).

Populações de microrganismos de solo produtores das fosfatases ácida e alcalina ou os fatores que influenciam seu crescimento têm sido pouco estudados. Linhagens de *Rhizobium* apresentaram altos níveis de fosfatase alcalina mas não as três linhagens de *Bradyrhizobium* (SMART et al., 1984). Inúmeras fosfatases têm sido observadas em fungos micorrízicos (TARAFDAR, 1995). Embora sem estabelecer uma relação significativa, TARAFDAR e JUNGK (1987) mostraram que o aumento da atividade das fosfatases ácida e alcalina correspondeu ao aumento da comunidade de fungos e bactérias na rizosfera de várias plantas. Tem-se relatado que a atividade das fosfatases de microrganismos foi reprimida por concentrações crescentes de fosfato (NAHAS, 1989).

Sugeriu-se que o aumento das populações de microrganismos solubilizadores decorreu da baixa disponibilidade de fósforo em solo adicionado de fosfato natural (MACHADO et al., 1983). Além disso, esse efeito solubilizador estaria sujeito a um mecanismo de controle pela concentração de fosfato (NAHAS e ASSIS, 1992). A velocidade de mineralização foi positivamente associada ao pH do solo (THOMPSON et al., 1954) e ao teor de matéria orgânica (BRAMS, 1973). A aplicação de diferentes materiais orgânicos acarretou aumento na liberação de fosfato solúvel em solo tratado com fosfato natural (MINHONI et al., 1991). McKERCHER e TOLLEFSON (1978) demonstraram que a mineralização de fosfolipídeos e ácidos nucléicos forneceu a quantidade de fosfato necessária ao desenvolvimento de cevada.

O objetivo deste estudo foi quantificar a comunidade de microrganismos mineralizadores do fósforo orgânico, produtores de fosfatases ácida e alcalina, bem como o efeito do manejo agrícola, caracterizado pela variação do tipo de planta, da fonte de fósforo e da calagem, sobre essas populações.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Realização do ensaio

A gramínea *Brachiaria ruziziensis* (braquiária) e a leguminosa *Cajanus cajan* (guandu) foram cultivadas

em parcelas de 18 m² de Latossolo Vermelho-Escuro, em Comendador Gomes (MG), contendo 1,5 g.kg⁻¹ de MO; 4 mg.dm⁻³ de P e pH em CaCl₂, 4,5. Nessas parcelas, aplicaram-se 400 kg.ha⁻¹ de P₂O₅ na forma de superfosfato simples ou fosfato natural de Araxá; 1,3 t.ha⁻¹ de calcário e, aos 30 dias, 60 kg.ha⁻¹ de N em cobertura. O ensaio de campo e a coleta das amostras foram descritos em trabalho anterior (BARROTI e NAHAS, 2000). Um total de 10 subamostras de cada parcela, coletadas na profundidade de 0 a 20 cm, foi reunido em amostras compostas, peneiradas em peneira de malha de 2 mm e conservadas em sacos plásticos à temperatura de 4 °C.

2.2. Contagem de microrganismos

Para a contagem de bactérias e fungos totais do solo utilizaram-se os meios de BUNT e ROVIRA (1955) e de MARTIN (1950) e os procedimentos utilizados foram descritos em BARROTI e NAHAS (2000). Das bactérias e fungos crescidos nesses meios, obteve-se um total de 900 e 720 isolados, respectivamente, selecionados com base em suas características morfológicas. Os isolados foram conservados em geladeira à temperatura de 4 °C (BARROTI, 1998).

Para as contagens de microrganismos produtores das fosfatases ácida e alcalina e a medida da atividade enzimática, os isolados foram inoculados no centro de placas contendo meio salino acrescido de 1,5% (p/v) de ágar, corrigindo-se o pH para 7,4 para as bactérias e 5,6 para os fungos (NAHAS et al., 1994b), e incubados por 2 a 3 dias à temperatura de 25 °C. Mediu-se o diâmetro das colônias e, a seguir, as placas foram inundadas com solução de p-nitrofenilfosfato 6 mmol.L⁻¹ acrescido de tampão-acetato 0,1 mol.L⁻¹, pH 5,4, para a fosfatase ácida e de tampão-glicina 0,3 mol.L⁻¹, pH 9,0 para a fosfatase alcalina e incubadas a 37 °C por 90 minutos. Mediu-se, também, o diâmetro do halo amarelo formado pela transformação do p-nitrofenilfosfato, resultante da atividade das fosfatases. A relação entre os dois diâmetros constituiu o índice adotado para avaliar a habilidade do microrganismo em produzir a enzima fosfatase. A proporção de isolados de cada tratamento, com atividade das enzimas estudadas, permitiu estimar as populações de microrganismos produtores das fosfatases.

2.3. Análise estatística

Os 18 tratamentos foram arrançados em um experimento em blocos ao acaso com fatorial, 3 x 3 x 2 (duas espécies vegetais e ausência de planta; dois

tipos de adubo fosfatado e ausência de adubo; e com e sem calagem) com duas repetições e as médias, analisadas pelo teste de Tukey (P < 0,05). Os resultados das contagens microbianas foram transformados em log x. Realizou-se a análise estatística dos dados utilizando-se o programa ESTAT. Análises de correlação foram efetuadas, calculando-se a equação de regressão e o coeficiente de correlação linear (r).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os números de bactérias com atividade da fosfatase ácida variaram de 2,64 a 7,95 x 10⁶ ufc.s.g⁻¹ de solo seco e apresentaram uma média de 4,54 x 10⁶ ufc.s.g⁻¹ de solo seco, que correspondeu a 58,2% do total de bactérias (Quadro 1). O maior número foi encontrado no solo cultivado com braquiária, 5,89 x 10⁶ ufc.s.g⁻¹ de solo seco, representando um acréscimo significativo de 19,8% em relação ao controle e de 38% em relação ao guandu. Ocorreu, também, aumento significativo de 15,9% do número encontrado em solo com calcário em relação ao solo que não se adicionou esse nutriente. A adubação com os fosfatos não influenciou no número de bactérias produtoras de fosfatase ácida, não se encontrando interação significativa entre os tratamentos.

Os números de bactérias com atividade de fosfatase alcalina variaram de 3,62 a 8,24 x 10⁶ ufc.s.g⁻¹ de solo seco dependendo do tratamento considerado (Quadro 1); apresentaram uma média de 5,52 x 10⁶ ufc.s.g⁻¹ de solo seco que correspondeu a 70,6% do total de bactérias. No solo cultivado com guandu, observou-se a menor contagem, constituindo redução significativa (P < 0,05) de 21,2% em relação ao controle e de 26,9% em relação ao solo cultivado com braquiária. A adição de superfosfato no solo aumentou significativamente o número de bactérias produtoras da fosfatase alcalina (média de 6,18 x 10⁶ ufc.s.g⁻¹ de solo seco) em relação à contagem observada em solo com adição de fosfato natural (média de 4,91 x 10⁶ ufc.s.g⁻¹ solo seco) mas não a do controle (média de 5,53 x 10⁶ ufc.s.g⁻¹ de solo seco). Não foi obtido efeito significativo da calagem ou da interação entre os tratamentos (P < 0,05) (Quadro 1).

O número de colônias de fungos com atividade da fosfatase ácida variou de 6,28 a 14,63 x 10⁴ ufc.s.g⁻¹ de solo seco, obtendo-se uma média de 10,47 x 10⁴ ufc.s.g⁻¹ de solo seco, que correspondeu a 84,7% do total de fungos (Quadro 2). Constatou-se efeito significativo da planta e da calagem mas não do adubo; as maiores contagens foram obtidas na ausência de planta. A média verificada no tratamento

Quadro 1. Contagem de bactérias produtoras de fosfatases alcalina e ácida em diferentes sistemas de cultivo

Tratamentos	Bactérias totais ⁽¹⁾	Bactérias produtoras de fosfatases	
		Ácida	Alcalina
ufcs x 10 ⁶ .g ⁻¹ solo seco			
Sem calagem			
Sem adubo			
Sem planta	6,94	3,96	5,97
Braquiária	7,53	4,86	6,12
Guandu	6,39	3,07	4,04
Superfosfato			
Sem planta	6,00	4,44	5,64
Braquiária	9,09	6,44	7,73
Guandu	7,77	5,13	5,44
Fosfato de rocha			
Sem planta	6,70	3,28	3,62
Braquiária	7,41	4,83	6,07
Guandu	6,70	2,99	4,42
Com calagem			
Sem adubo			
Sem planta	9,19	5,06	7,35
Braquiária	9,67	6,11	5,35
Guandu	6,96	4,32	5,43
Superfosfato			
Sem planta	11,65	6,18	7,13
Braquiária	11,45	7,95	8,24
Guandu	8,66	2,64	4,23
Fosfato de rocha			
Sem planta	8,07	5,54	6,49
Braquiária	7,06	5,15	5,15
Guandu	7,37	4,00	4,46
Teste F			
Planta (A)	1,94 ^{NS}	16,31 ^{**}	7,67 ^{**}
Adubo (B)	3,17 ^{NS}	3,23 ^{NS}	3,79 [*]
Calagem (C)	8,91 ^{**}	6,43 [*]	1,84 ^{NS}
A x B	0,46 ^{NS}	0,68 ^{NS}	1,38 ^{NS}
A x C	1,63 ^{NS}	2,55 ^{NS}	3,54 ^{NS}
B x C	1,14 ^{NS}	2,52 ^{NS}	0,35 ^{NS}
A x B x C	0,45 ^{NS}	2,92 ^{NS}	1,51 ^{NS}
CV (%)	1,29	1,34	1,32

(¹) Extraído de BARROTI e NAHAS (2000); NS: Não significativo; *: Significativo (P < 0,05); **: Significativo (P < 0,01).

sem planta, $10,99 \times 10^4$ ufcs.g⁻¹ de solo seco, diferiu significativamente do tratamento com guandu (média de $10,04 \times 10^4$ ufcs.g⁻¹ de solo seco) mas não do tratamento com braquiária (média de $10,39 \times 10^4$ ufcs.g⁻¹ de solo seco). Embora com uma diferença de apenas 5,6%, constatou-se diferença significativa entre os tratamentos com calagem (média de $10,77 \times 10^4$ ufcs.g⁻¹ de solo seco) e sem calagem (média de $10,17 \times 10^4$ ufcs.g⁻¹ de solo seco). Todas as interações entre os tratamentos foram significativas, observando-se aumento do número de colônias de fungos produtores da fosfatase ácida (Quadro 2) nas parcelas não adubadas e não cultivadas em relação aos demais tratamentos. Quando se fez a

adubação com superfosfato, obteve-se maior contagem de fungos no solo com braquiária que nas demais condições e quando se utilizou fosfato natural, a maior contagem ocorreu no solo de guandu com calagem.

O número de fungos com atividade da fosfatase alcalina em solo submetido a diferentes condições de cultivo variou de 4,77 a $11,86 \times 10^4$ ufcs.g⁻¹ de solo seco (Quadro 2), apresentando uma média de $7,94 \times 10^4$ ufcs.g⁻¹ de solo seco, que correspondeu a 64,3% do total de fungos; a maior contagem foi obtida nas parcelas sem planta e sem calagem. Observou-se efeito significativo da planta, do adubo mas não da calagem; todas as interações foram significativas.

Quadro 2. Contagem de fungos produtores de fosfatases em solo submetido a diferentes condições de cultivo

Tratamentos	Fungos totais ⁽¹⁾	Fungos produtores de fosfatases	
		Ácida	Alcalina
		ufcs x 10 ⁴ .g ⁻¹ solo seco	
Sem calagem			
Sem adubo			
Sem planta	14,40	12,22	11,86
Braquiária	10,24	7,85	6,83
Guandu	10,66	8,59	5,16
Superfosfato			
Sem planta	9,11	7,63	8,37
Braquiária	17,55	13,42	11,17
Guandu	12,03	9,88	6,64
Fosfato de rocha			
Sem planta	14,05	12,55	8,03
Braquiária	9,36	7,55	4,83
Guandu	12,14	9,44	6,74
Com calagem			
Sem adubo			
Sem planta	20,36	14,63	8,91
Braquiária	9,42	8,16	5,96
Guandu	14,11	9,56	9,10
Superfosfato			
Sem planta	14,67	11,25	8,80
Braquiária	19,04	13,13	11,82
Guandu	12,32	9,45	6,16
Fosfato de rocha			
Sem planta	9,27	6,28	5,21
Braquiária	10,12	8,09	8,09
Guandu	15,17	10,11	4,77
Teste F			
Planta (A)	1,44 ^{NS}	6,20*	71,44**
Adubo (B)	2,99 ^{NS}	0,12 ^{NS}	15,19**
Calagem (C)	3,82 ^{NS}	7,31*	0,35 ^{NS}
A x B	11,99**	44,42**	96,42**
A x C	0,63 ^{NS}	32,02**	32,21**
B x C	2,19 ^{NS}	55,87**	96,83**
A x B x C	4,53*	34,51**	15,33**
CV (%)	1,34	0,55	0,56

(¹) Extraído de BARROTI e NAHAS (2000); NS: Não significativo; *: Significativo (P < 0,05); **: Significativo (P < 0,01).

Com relação ao efeito da planta, os resultados obtidos no controle não diferiram do tratamento com braquiária, mas ambos diferiram do tratamento com guandu, cuja redução da contagem foi de 24,7% em relação ao controle. A maior comunidade de fungos produtores de fosfatase alcalina foi encontrada em solo fertilizado com superfosfato (média de 8,57 x 10⁴ ufcs.g⁻¹ de solo seco) e a menor em solo adubado com fosfato natural (média de 7,44 x 10⁴ ufcs.g⁻¹ de solo seco). Esse efeito foi mais pronunciado em solo cultivado com braquiária e fertilizado com superfosfato onde ocorreram as maiores contagens de fungos com atividade da fosfatase alcalina. Em geral, menor número de colônias de fungos com

atividade da fosfatase alcalina foi obtido na presença de guandu (Quadro 2).

Não se observou tendência consistente mostrando a influência dos diversos tratamentos sobre a atividade enzimática nas bactérias e fungos isolados. Do total de isolados bacterianos, 28,4% e 40,6%, em média, apresentaram atividade da fosfatase alcalina e da ácida respectivamente (Figuras 1 e 2). Portanto, 59% a 72% das bactérias isoladas e 60% a 78% dos fungos apresentaram atividade das fosfatases. Essa atividade aumentou das faixas menores para as maiores, respectivamente, 1,9% do total com atividade da fosfatase alcalina (faixa > 5,1) e de 0,7% do total com atividade da fosfatase ácida (faixa de 4,1 a 5,0) (Figura 1).

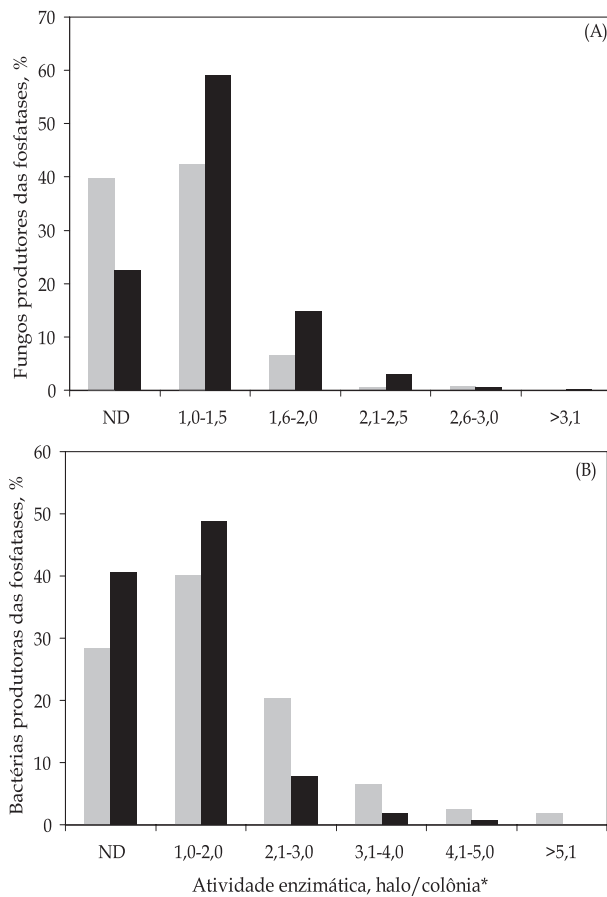


Figura 1. Distribuição dos fungos (A) e das bactérias (B) produtoras das fosfatases alcalina (■) e ácida (■) por intervalo de atividade enzimática. * Relação entre o diâmetro do halo da atividade enzimática e o da colônia.

Resultados semelhantes foram obtidos com os isolados dos fungos; as faixas de maior atividade foram de 2,6 a 3,0 (0,7 % do total) para a fosfatase alcalina e > 3,1 (0,2 % do total) para a fosfatase ácida (Figura 2).

O número de microrganismos produtores das fosfatases no presente estudo foi maior que o apresentado em 13 diferentes solos, incluindo pastos, florestas e área experimental para cultura anual (NAHAS et al., 1994b). Esse aumento deve-se, provavelmente, à influência das plantas e da adubação utilizadas neste estudo sobre a comunidade microbiana total e produtora das enzimas. Ao contrário do observado nas contagens dos microrganismos totais (BARROTI e NAHAS, 2000), o número das bactérias e de fungos produtores das fosfatases foi afetado significativamente pelos tratamentos. Ademais, obteve-se correlação significativa entre o número de bactérias totais e o número de bactérias produtoras da fosfatase alcalina

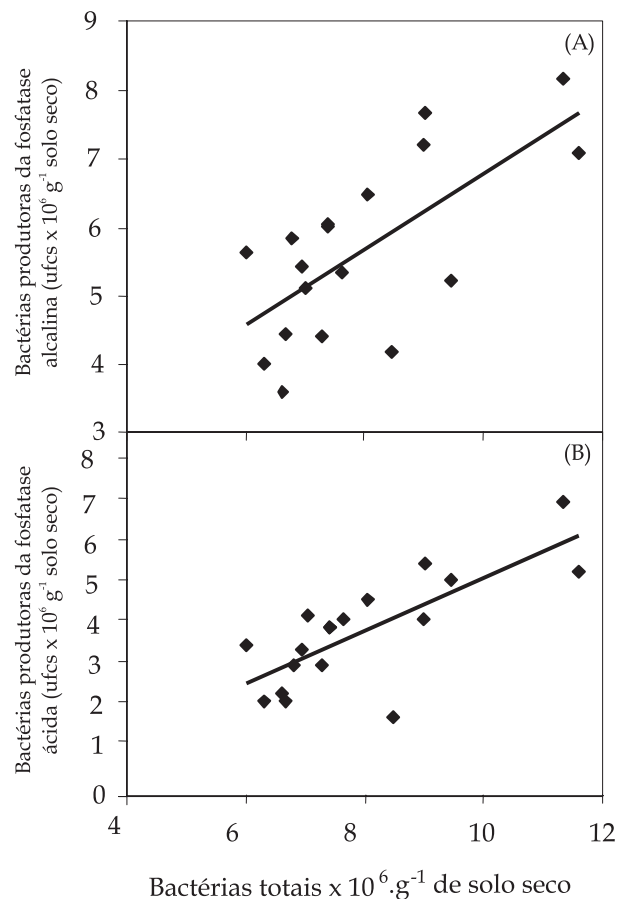


Figura 2. Relação entre o número de bactérias totais e o de bactérias produtoras da fosfatase alcalina (A) e da fosfatase ácida (B). Equações de regressão: A: $y = 0,7983x + 1,2392$, $R = 0,64^{**}$; B: $y = 1,0461x - 0,553$, $R = 0,67^{**}$.

($r = 0,64^{**}$) e da fosfatase ácida ($r = 0,67^{**}$) (Figura 3) mas não entre os fungos.

Como microrganismos heterotróficos, poderia se esperar que as bactérias e os fungos produtores de fosfatases respondessem a uma fonte de C e energia e aos outros nutrientes adicionados ou existentes no solo, em particular ao fósforo (HIGASHIDA e TAKAO, 1986). Portanto, independentemente de sua habilidade de secretar essas enzimas que seria regulada pelos teores de fosfato disponível, reprimindo ou desreprimindo sua atividade (NAHAS et al., 1982), a comunidade microbiana produtora de fosfatases tenderia a aumentar como resposta à adição de fertilizantes. Contudo, o efeito da fonte de fósforo ocorreu apenas sobre as bactérias produtoras da fosfatase alcalina cujas populações foram maiores nos tratamentos com superfosfato e controle que o tratamento fosfato natural, e para os fungos, de modo inverso, maior número foi encontrado na ausência que na presença de adubação fosfatada. Respostas à

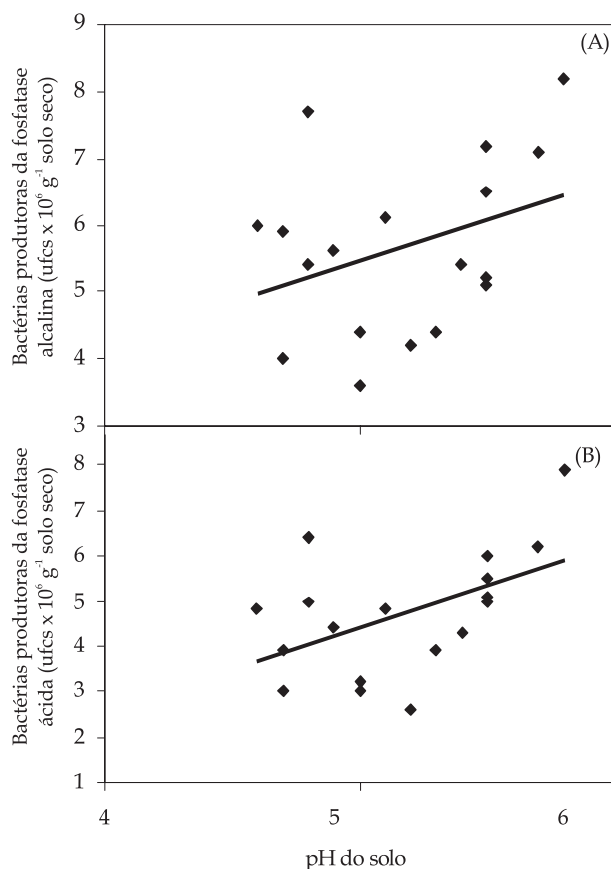


Figura 3. Relação entre o número de bactérias produtoras de fosfatase alcalina **(A)** e o de fosfatase ácida **(B)**. Equações de regressão: A: $y = 0,1092x + 6,1833$, $R = 0,49^*$; B: $y = 0,1457x + 5,9125$, $R = 0,51^*$.

adubação fosfatada nem sempre têm sido coerentes, principalmente com relação aos fungos.

KANAZAWA et al. (1988) obtiveram contagem menor de bactérias totais e maior de fungos que o controle em solo adubado com 12 a 300 kg.ha⁻¹.ano⁻¹ de fertilizante fosfatado. Aumento das populações de fungos também foi obtida por SAIVE et al. (1972). LIMA et al. (1996) verificaram aumento das populações de bactérias mas não das de fungos, corroborando os resultados obtidos neste trabalho, pela aplicação de 0 a 800 kg.ha⁻¹ de P₂O₅ em cultura de tomateiro.

A literatura tem apontado o efeito das plantas na variação da contagem de bactérias e grupos fisiológicos bacterianos na rizosfera e solo não rizosférico de plantas (MILLER et al., 1989). Tem sido assinalado que essa variação está relacionada à secreção de compostos químicos na rizosfera e à idade das plantas (ROVIRA e McDUGALL, 1967; MERCKX et al., 1987). Fora do âmbito da rizosfera, os relatos da literatura com referência ao efeito do solo

cultivado sobre os microrganismos são bastante genéricos e escassos. Por ser uma planta fixadora de N₂ atmosférico enriquecendo o ambiente, o gandu deveria propiciar maior crescimento microbiano, contudo, de modo geral, as populações de bactérias e fungos produtores de fosfatases diminuíram na presença dessa cultura quando se comparou com a de braquiária ou controle, sem planta. Nessa situação, pode-se depreender que o fator limitante para desenvolvimento microbiano foi o fósforo e não o nitrogênio. Efeito favorável da braquiária foi obtido com o aumento do número de bactérias solubilizadoras de fosfato de rocha (BARROTI e NAHAS, 2000), confirmando os resultados deste trabalho. Além disso, os fungos produtores de fosfatases tiveram aumento das populações no solo não cultivado quando se comparou com os demais tratamentos. O maior enraizamento da braquiária pode ter favorecido o crescimento das bactérias. Por outro lado, a produção de metabólitos como o ácido psicídico, composto fenólico ausente em outras plantas como soja e sorgo (AE et al., 1990), pode ter influenciado de algum modo o crescimento microbiano.

O efeito da calagem foi verificado apenas para as bactérias e fungos produtores da fosfatase ácida. Enquanto as populações de fungos com atividade fosfatásica diminuíram por efeito da calagem, as das bactérias aumentaram. Estes resultados estão de acordo com a análise de correlação que foi significativa entre o índice de pH ($P < 0,05$) e o número de bactérias produtoras da fosfatase alcalina ($r = 0,49^*$) e da fosfatase ácida ($r = 0,51^*$) (Figura 3), revelando que um aumento do valor do pH devido à calagem elevaria as populações de bactérias produtoras dessas enzimas. Os fungos apresentaram correlação não significativa. De acordo com estes resultados, IVARSON (1977) obteve aumento no número de bactérias com o aumento do pH, em decorrência de calagem, mas diminuição da contagem de fungos. HIGASHIDA e TAKAO (1986) obtiveram também correlação positiva e consideraram que o pH do solo é um fator que controla o número de bactérias. FLORES et al. (1988) mostraram que a produção de fósforo pelas populações mineralizadoras aumentou com o acréscimo do pH nos solos de savana; no solo de pinho, porém, aumentou até pH 5 e depois diminuiu. A participação dos fungos foi maior que as bactérias neste processo, diferentemente dos resultados deste trabalho.

Enquanto as bactérias apresentaram maior frequência de isolados com atividade da fosfatase alcalina, para os fungos isso ocorreu com a atividade da fosfatase ácida. Além disso, as bactérias

apresentaram maior atividade que os fungos para as duas enzimas (Figura 1), confirmando JONER e JAKOBSEN (1995) que mencionaram a fosfatase alcalina como a mais encontrada nas bactérias. Essa resposta decorre também do fato de que a fosfatase alcalina apresentou maior atividade em pH acima de 7,0 (NAHAS et al., 1994a), e as bactérias podem ter sido favorecidas pela seletividade do meio de cultura de BUNT e ROVIRA (1955) que tinha pH 7,2.

4. CONCLUSÕES

1. Encontrou-se, no solo estudado, número expressivo de bactérias ou de fungos produtores das fosfatases ácida ou alcalina, constituindo mais de 50% de bactérias ou de fungos totais. Verificou-se diminuição desses microrganismos no solo cultivado com guandu quando se comparou com os outros tratamentos.

2. Somente as bactérias e os fungos produtores de fosfatase alcalina foram influenciados pela adubação fosfatada, aumentando, respectivamente, nas parcelas adubadas com superfosfato ou controle.

3. Apenas os números de bactérias produtoras de fosfatase ácida aumentaram com a calagem.

4. Uma porcentagem inferior a 2% do total de microrganismos produtores das fosfatases apresentou alta atividade enzimática.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP pelo auxílio financeiro concedido para a execução desta pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AE, N.; ARIHARA, J.; OKADA, K.; YOSHIHARA, T.; JOHANSEN, C. Phosphorus uptake by pigeon pea and its role in cropping systems of the Indian subcontinent. *Science*, Washington, v.248, p.477-480, 1990.
- BARROTI, G. *Características microbiológicas e físico-químicas de solo adubado com fosfato natural em diferentes tipos de cultivos*. 1998. 81f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- BARROTI, G.; NAHAS, E. População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.35, n.10, p.2043-2050, 2000.
- BERTON, R.S.; PRATT, P.F.; FRANKENBERGER, W.T. Phosphorus availability in soils amended with organic materials, estimated by three chemical methods and two enzyme activities. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.21, n.4, p.617-624, 1997.
- BRAMS, E. Soil organic matter and phosphorus relationships under tropical forests. *Plant Soil*, The Netherlands, v.39, p.465-468, 1973.
- BUNT, J.S.; ROVIRA, A.D. Microbiological studies of some subantarctic soils. *Journal of the Soil Science*, Oxford, v. 6, p.119-128, 1955.
- CASIDA Jr., L.E. Phosphatase activity of some common soil fungi. *Soil Science*, Maynard, v.87, n.6, p.305-310, 1959.
- COSGROVE, D.J.; IRVING, G.C.J.; BROMFIELD, S.M. Inositol phosphate phosphatases of microbial origin: the isolation of soil bacteria having inositol phosphatase activity. *Australian Journal of Biological Science*, East Melbourne, v.23, p.339-343, 1970.
- FEDER, J. The phosphatases. In: GRIFITH, E.J.; BECTEN, A.; SPENCER, J.M.; MITCHEL, D.T. *Environmental phosphorus handbook*. New York: John Wiley, 1973. p.475-507.
- FLORES, D.A.; MALAVE, V.; BASTARDO, H. Mineralización de fosforo orgánico por actividad microbiana en suelos de sabana y de un bosque de *Pinus caribaea* var. hondurensis, en Venezuela. In: REGIONAL COLLOQUIUM ON SOIL ORGANIC MATTER STUDIES, 1988, Piracicaba. *Proceedings...* Piracicaba: CENA, 1988. p.45-50.
- GREAVES, M.P.; VAUGHAN, D.; WEBLEY, D.M. The degradation of nucleic acids by *Cytophaga johnsonii*. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v.33, p.380-389, 1970.
- GREAVES, M.P.; WEBLEY, D.M. A study of the breakdown of organic phosphates by microorganisms from the root region of certain pastures grasses. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v.28, n.3, p.454-465, 1965.
- HAN, S.W.; NAHAS, E.; ROSSI, A. Regulation of synthesis and secretion of acid and alkaline phosphatases in *Neurospora crassa*. *Current Genetics*, West Germany, v.11, p.521-527, 1987.
- HIGASHIDA, S.; TAKAO, K. Relations between soil microbial activity and soil properties in grassland. *Soil Science and Plant Nutrition*, Tokyo, v.32, n.4, p.587-597, 1986.
- IVARSON, K.C. Changes in decomposition rate, microbial population and carbohydrate content of an acid peat bag after liming and reclamation. *Canadian Journal of Soil Science*, Ottawa, v.57, p. 129-137, 1977.
- JONER, E.J.; JAKOBSEN, I. Growth and extracellular phosphatase activity of arbuscular mycorrhizal hyphae as influenced by soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.27, n.9 p.1153-1159, 1995.

- KANAZAWA, S.; ASAKAWA, S.; TAKAI, Y. Effect of fertilizer and manure application on microbial numbers, biomass and enzyme activities in volcanic ash soils. *Soil Science and Plant Nutrition*, Tokyo, v.34, n.3, p.429-439, 1988.
- LIMA, J.A.; NAHAS, E.; GOMES, A.C. Microbial populations and activities in sewage sludge and phosphate fertilizer-amended soil. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, v.4, p.75-82, 1996.
- MACHADO, J.O.; PICCIN, C.R.; BARBOSA, J.C.; NAHAS, E. Ação da vinhaça e fosfato natural sobre a população de bactérias solubilizadoras de fosfato bicálcico, habitantes da rizosfera de *Lycopersicon esculentum* (Mill.) cv 'Petomech'. *Científica*, Jaboticabal, v.11, p.63-69, 1983.
- MARTIN, J.P. Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Science*, Maynard, v.69, p.215-232, 1950.
- McKERCHER, R.B.; TOLLEFSON, T.S. Barley response to phosphorus from phospholipids and nucleic acids. soils. *Canadian Journal of Soil Science*, Ottawa, v.58, p.103-105, 1978.
- MERCKX, R.; DIJKSTRA, A.; HARTOG, A. den; VEEN, J.A. van. Production of root-derived material and associated microbial growth in soil at different nutrient levels. *Biology and Fertility of Soils*, West Germany, v.5, p.126-132, 1987.
- MILLER, H.J.; HENKEN, G.; VEEN, J.A. Variation and composition of bacterial populations in the rhizospheres of maize, wheat, and grass cultivars. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.35, n.6, p.656-660, 1989.
- MINHONI, M.T.A.; CARDOSO, E.J.B.N.; EIRA, A.F. Efeito de cinco tipos de matéria orgânica na solubilização microbiana de fosfato de rocha. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.15, p.29-35, 1991.
- MONTGOMERY, D.M.; DEAN, A.C.R.; WIFFEN, P.; MACASKIE, L.E. Phosphatase production and activity in *Citrobacter freundii* and a naturally occurring, heavy-metal-accumulating *Citrobacter* sp. *Microbiology*, London, v.141, p.2433-2441, 1995.
- NAHAS, E. Control and localization of the phosphatases in conidia of *Neurospora crassa*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.35, n.9, p.830-835, 1989.
- NAHAS, E.; ASSIS, L.C. Efeito da concentração de fosfato na solubilização de fluorapatita por *Aspergillus niger*. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v.23, p.37-42, 1992.
- NAHAS, E.; CENTURION, J.F.; ASSIS, L.C. Efeito das características químicas dos solos sobre os microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.18, p.49-53, 1994a.
- NAHAS, E.; CENTURION, J.F.; ASSIS, L.C. Microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases de vários solos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.18, p.43-48, 1994b.
- 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*, Reading, v.128, p.2017-2021, 1982.
- NANNIPIERI, P.; JOHNSON, R.L.; PAUL, E.A. Criteria for measurement of microbial growth and activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.10, p.223-229, 1978.
- PANG, P.C.K.; KOLENKO, H. Phosphomonoesterase activity in forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.18, n.1, p.35-40, 1986.
- PAUL, E.A.; CLARK, F.E. *Soil microbiology and biochemistry*. New York: Academic Press, 1989. 273p.
- ROVIRA, A.D.; MCDUGALL, B.M. Microbiological and biochemical aspects of the rhizosphere. In: McLAREN, A.D.; PETERSON, G.H. (Eds.). *Soil Biochemistry*. New York: Dekker, 1967. v.1, p.417-463.
- SAIVE, R.; POELAERT, J.; RAIMOND, Y.; BRAKEL, J.; HUGE, P. Effect on the soil microflora of different fertilizer treatments applied during 62 years. Parts I to V. *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol*, Montrouge, v.9, p.565-588, 1972.
- SHIEH, T.R.; WARE, J.H. Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. *Applied Microbiology*, Washington, v.16, n.9, p.1348-1351, 1968.
- SMART, J.B.; DILWORTH, M.J.; ROBSON, A.D. Effect of phosphorus supply on phosphate uptake and alkaline phosphatase activity in Rhizobia. *Archives of Microbiology*, Heidelberg, v.14, p.281-286, 1984.
- TARAFDAR, J.C. Visual demonstration of *in vivo* acid phosphatase activity of VA mycorrhizal fungi. *Current Science*, Bangalore, v.69, n.6, p.541-543, 1995.
- TARAFDAR, J.C.; JUNGK, A. Phosphatase activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v.3, p.199-204, 1987.
- THOMPSON, L.M.; BLACK, C.A.; ZOELLNER, J.A. Occurrence and mineralization of organic phosphorus in soils, with particular reference to associations with nitrogen, carbon, and pH. *Soil Science*, Maynard, v.77, n.2, p.185-196, 1954.
- VIEIRA, F.C.S.; NAHAS, E. Microbial counts of dark red latosol samples stored at different temperatures. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v.29, p.159-163, 1998.