

**FABIANA FERREIRA FELIX**

**Produção e efeitos de Biofertilizante Bioprotetor com quitosana na alface**

**R E C I F E – P E**

**Fevereiro 2011**

**FABIANA FERREIRA FELIX**

**Produção e efeitos de Biofertilizante Bioprotetor com quitosana na alface**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de concentração Química, Fertilidade e Microbiologia do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE, PE), como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciência do Solo.

**R E C I F E – P E**

**Fevereiro 2011**

**FABIANA FERREIRA FELIX**

**Produção e efeitos de Biofertilizante Bioprotetor com quitosana na alface**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de concentração Química, Fertilidade e Microbiologia do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE, PE), como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciência do Solo.

Orientador

Prof. Newton Pereira Stamford, Dr.

Co-Orientadora

Luciana de Oliveira Franco, Dr.<sup>a</sup>.

**R E C I F E – P E**

**Fevereiro 2011**

Ficha catalográfica

F316p Felix, Fabiana Ferreira  
Produção e efeitos de biofertilizante bioprotetor  
com  
quitosana na alface / Fabiana Ferreira Felix. – Recife,  
2012.  
60 f. : il.

Orientador: Newton Pereira Stamford.  
Tese (Doutorado em Ciência do Solo) –  
Universidade  
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de  
Agronomia,  
Recife, 2012.  
Referências.

1. Disponibilidade de nutrientes 2. Incorporação de  
nitrogênio 3. Fertilização NPK 4. Fixação assimbiótica  
5. Matéria orgânica 6. Quitosana I. Stamford, Newton  
Pereira, orientador II. Título

CDD

631.4

# **Produção e efeitos de Biofertilizante Bioprotetor com quitosana na alface**

**FABIANA FERREIRA FELIX**

**Tese defendida e aprovada em 29 de fevereiro de 2012, pela Banca Examinadora:**

## **ORIENTADOR:**

---

Prof. Dr. Newton Pereira Stamford

## **EXAMINADORES:**

---

Dr. José de Paula Oliveira - IPA

---

Dra. Luciana de Oliveira Franco - UFRPE

---

Dr. Emídio Cantídio de Almeida Oliveira – UAST/UFRPE

---

Dr. Marcos Antonio Barbosa de Lima - UFRPE

*Á Deus*

*Nada é coincidência tudo é providencia.*

*Dedico*

Ao meu esposo **Abdiel...** não sei o que seria de mim sem seu amor, carinho, atenção e companheirismo em todas as horas.

Aos grandes projetos de minha vida: **Eduarda e Helena Luiza...** tudo mudou por elas... não dá pra viver sem elas.

Aos meus pais **Francisco e Carolina...** não estaria hoje aqui se eles não se encontrasse.

Tudo providencia de Deus.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Newton Pereira Stamford, por acreditar e incentivar a produção deste trabalho, pelos seus ensinamentos e paciência e pelo indispensável apoio... meu muito obrigado, estimado e insubstituível professor!

Às professoras Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos, Luciana de Oliveira Franco, pelo total apoio.

Ao IPA - Instituto Agronômico Pernambuco, pelo espaço e pela atenção especial oferecida no trabalho de campo. A Maria Cristina Lemos e a Luiz Evandro pelo apoio, ensinamentos e paciência.

Com muito carinho a minha amiga de todas as horas Maria do Socorro, não sei o que seria de mim sem ela.

Meu muito obrigado de forma especial a minha cunhada Miquelena Jimena, minha sogra Maria do Carmo e minha sobrinha Emmilly.

Aos meus amigos: Hammady, Patrícia, Fernando e Clayton. Muito obrigada!

Aos meus amigos Lúcia Raquel, Daniela e Márcio.

Aos colegas da Biotecnologia Ambiental: Antônio, Wanderson, Tatyana, Sebastião, Rosangela; e aos amigos da Microbiologia ambiental: Shirley, Fátima e Luciana.

Aos amigos e companheiros do IPA que foram peças fundamentais na realização do trabalho de campo: Marcos, Macena, Marciel, Edmilson, Diana, Luiz e Manoel.

Ao Laboratório de Química do solo e Fertilidade do solo, pelo espaço e paciência. De forma especial a Profa. Dra Maria Betânia, ao Dr. Wagner, Madruga e Anderson.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

*Ainda que eu ande no vale da sombra  
da morte não temerei, pois o Senhor esta  
sempre comigo (Salmo 23).*

## SUMÁRIO

Produção e efeitos de Biofertilizante Bioprotetor com quitosana na alface .....	1
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	3
CAPITULO I.....	5
Bioprotetor enriquecido em N por adição de diazotrófica de vida livre e da quitosana fúngica de <i>Cunninghamella elegans</i> .....	6
Resumo .....	6
Abstract .....	7
Introdução.....	8
Material e métodos.....	9
Resultados e discussão .....	12
Conclusões.....	14
Referências Bibliográficas.....	15
CAPÍTULO II.....	23
Características de <i>Cunninghamella elegans</i> e atividade antimicrobiana da quitosana contra o fungo fitopatogênico <i>Pythium</i> “ <i>in vitro</i> ” .....	24
Resumo - .....	24
Abstract - .....	25
Introdução.....	25
Material e métodos.....	27
Resultados e discussão .....	29
Conclusões.....	31
Referências Bibliográficas.....	31
CAPÍTULO III .....	38
EFICIÊNCIA DE BIOFERTILIZANTE BIOPROTETOR NA ALFACE E EM ATRIBUTOS DO SOLO.....	39
RESUMO .....	39
SUMMARY.....	40
INTRODUÇÃO .....	41
MATERIAL E MÉTODOS.....	42
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
CONCLUSÕES .....	48
CONCLUSÕES FINAIS.....	60



## **Produção e efeitos de Biofertilizante Bioprotetor com quitosana na alface**

### **INTRODUÇÃO GERAL**

A produção agrícola é garantida graças a utilização de fertilizantes minerais solúveis. No entanto, o uso desses produtos solúveis, a maioria das vezes, pode promover substancial aumento nos custos de produção, bem como aumentam o riscos de contaminação ambiental (Roesch et al., 2005). Além de que, na produção de fertilizantes fosfatados solúveis é necessário apreciável gasto de energia e mão de obra altamente especializada (Goedert et al., 1986). Os fertilizantes potássicos estão entre os mais utilizados na agricultura brasileira, e são quase que inteiramente atendidos por importações (Roberts, 2004).

Uma alternativa ao uso dos produtos solúveis seria a utilização direta de rochas fosfatadas ou potássicas moídas. Essas por sua vez são economicamente viáveis, mas tem uso restrito, devido à sua baixa solubilidade, sendo mais usadas em cultivos perenes misturadas a fertilizantes solúveis (Stamford et al. 2006).

Uma alternativa viável, que deve ser considerada, é a produção de biofertilizantes a partir de rochas moídas. A produção de biofertilizante de rochas é um processo prático que reduz o consumo de energia com aumento da disponibilidade de nutrientes para as plantas, e que minimiza os impactos ambientais tendo em vista que a liberação é realizada de forma mais lenta, possibilitando a utilização contínua pelas plantas, e reduz a possibilidade de arraste para as camadas mais profundas do solo e mesmo para o lençol freático, fato que ocorre com os fertilizantes solúveis (convencionais), e que certamente deverá causar problemas ambientais.

Nas últimas décadas, visando o aproveitamento de novas tecnologias para obtenção de fertilizantes biológicos, aqui denominados de biofertilizantes, intensificaram-se as pesquisas para utilização de minerais de rochas. A produção e uso de biofertilizantes fosfatados e potássicos produzidos de rochas, com eficiência comprovada tem sido relatada em trabalhos recentes desenvolvidos por Stamford et al, 2004; Moura et al. 2007; Andrade, 2007; Lima et al. 2007. Estes trabalhos mostram o potencial do biofertilizante de rocha como alternativa para substituição dos fertilizantes solúveis.

A produção de fertilizantes de rochas moídas vem sendo realizada com o uso de enxofre elementar inoculado com a bactéria *Acidithiobacillus* (Moura, 2006; Andrade, 2007).

Por outro lado, o nitrogênio, que representa o nutriente que mais limita a produção, não ocorre nas rochas, e devido a sua alta solubilidade e facilidade de arraste no solo por lixiviação, e bem como em função de inúmeras transformações no solo, normalmente encontra-se no solo em proporções abaixo dos níveis necessários para o desenvolvimento normal das plantas. Entretanto, seu uso excessivo contribui para a poluição do meio, devido a sua alta solubilidade. Os fertilizantes nitrogenados solúveis apresentam baixa eficiência devido às elevadas perdas por lixiviação, desnitrificação das fontes de N aplicadas (Franco e Balieiro, 1999).

Embora apresentem baixa concentração de nitrogênio, a incorporação de resíduos orgânicos tem mostrado que além da melhoria nas condições físicas do solo, contribuem para o aumento da atividade biológica e o fornecimento de nutrientes para a planta (Chepote, 2003). Resíduos orgânicos, que não apresentam possibilidades de promover problemas ambientais, são utilizados para incremento de N e podem ser usados na agricultura orgânica (Figueiredo e Tanamati, 2010).

A fixação biológica de nitrogênio atmosférico é um dos processos mais importantes conhecido na natureza, sendo realizado por bactérias conhecidas como diazotróficas, que podem ser simbióticas, associativas e não simbióticas ou de vida livre (Reis et al., 2006). Estas bactérias possuem um complexo enzimático denominado de nitrogenase e são capazes de quebrar a tripla ligação existente na molécula de N<sub>2</sub> (Moreira e Siqueira, 2006).

Nos sistemas agrícolas, o potencial de algumas bactérias aeróbicas ou microaerófilas de vida livre tem sido demonstrado, com uso de bactérias diazotróficas como as espécies dos gêneros *Azotobacter* e *Beijerinckia*, por meio da inoculação de resíduos ricos em carbono (alta relação C:N) e sua incorporação ao solo, resultando em razoáveis taxas de fixação de nitrogênio (Hill e Patriquin, 1996).

Outro aspecto a ser considerado para a produtividade e qualidade da produção agrícola é o que diz respeito aos processos de resistência das plantas a doenças, em especial as promovidas por fungos radiculares, usando produtos que não provocam danos ao ambiente. O biopolímero quitosana pode ser utilizado para esta finalidade devido a sua capacidade antifúngica e antibacteriana, induzindo enzimas de defesa nas

plantas (El Ghaouth et al., 1991; Stamford et al., 2008), além de atuar na liberação de polifosfato inorgânico (Franco, 2005) e de outros minerais como potássio.

Desse modo, a realização de pesquisas sobre quitosana extraída da massa micelial de fungos para o biocontrole de fungos fitopatogênicos são muito importantes para a obtenção de uma melhor produtividade agrícola e para evitar o uso de fungicidas químicos prejudiciais ao meio ambiente.

Neste trabalho procurou-se verificar as características do fungo *C. elegans* utilizado para fornecer quitosana e o efeito da quitosana (*in vitro*) no combate ao *Pythium*, importante patógeno da cultura da alface. Assim, avaliadas as melhores condições para produzir o Bioprotetor avaliou-se a influência do produto na alface em dois cultivos consecutivos e em alguns atributos químicos do solo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, I. P. Biofertilizante de rochas fosfatadas e potássicas com enxofre inoculado com *Acidithiobacillus* na adubação de uva (*Vitis vinifera* L.) em Planossolo do Vale do São Francisco. (Tese de doutorado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2007. 96 p.
- Chepote, R.E. Efeito do composto da casca do fruto de cacau no crescimento e produção do cacaueiro. *Agrotrópica*, n.15, v.1, p.1- 8, 2003.
- Figueiredo, P.G.; Tanamati, F.Y. Adubação orgânica e contaminação ambiental. *Revista Verde*, v.5, n.3, p. 01-04, 2010.
- Franco, A.A.; Balieiro, F.C. Fixação Biológica de Nitrogênio: alternativa os fertilizantes nitrogenados. 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, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1999. p. 577-595.
- Franco, L.O.; Stamford, T.C.M.; Stamford, N.P.; Campos - Takaki, G.M. *Cunninghamella elegans* como fonte de quitina e quitosana. *Analytica*, 13, 52-56. 2005.
- El Ghaouth, A. E.; Arul, J.; Grenier, J., Asselin, A. 1991. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathology* 82: 398-402.
- Goedert, W. J.; Sousa, D. M. G. Avaliação preliminar de fosfato com acidulação parcial. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 10: 75-80, 1986.
- Hill, N.M.; Patriquin, D.G. Maximizing N<sub>2</sub> fixation in sugarcane litter. p.59-60. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics - the Role of

Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts. Seropédica, EMBRAPA-CNPAB, 1995.

Lima, F.S.; Stamford, N.P.; Sousa, C.S.; Bezerra, V.R. Biofertilizante PK mais vermicomposto de minhoca enriquecido com nitrogênio através de inoculação com bactérias diazotróficas de vida livre. In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 31, Gramado, 2007. Resumo. Gramado, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. CD-ROM

Moreira, F.M.S.; Siqueira, J.O. Microbiologia do solo. 2ed. Larva: editora UFLA, 2006. p.729.

Moura, P.M. de. Uso de biofertilizantes de rochas com enxofre e inoculado com *Acidithiobacillus* em Argissolo acinzentado do vale do São Francisco cultivado com melão. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2006. 71 p.

Moura, P.M. de; Stamford, N.P.; Santos, C.E.R.S.; Duenhas, L.H.; Nunes, G.H. de S. Eficiência de biofertilizantes de rochas com *Acidithiobacillus* em melão no vale do São Francisco. Agrária, v.2, p.1-7, 2007.

Reis, V.M.; Oliveira, A.L.M.; Baldani, V.L.D.; Olivares, F.L.; Baldani, J.I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: Fernandes, M.S., ed. Nutrição mineral de plantas. Viçosa, Sociedade Brasileira de ciências do Solo, 2006. p.153-172.

Roberts, T. Reserva de minerais potássicos e a produção de fertilizante potássicos no mundo. Potafos: Informações agronômicas. v. 107, p.2-3. 2004.

Roesch, L.F.; Camargo, F.; Selbach, P.; Sá, E.S.de; Passaglia, L. identificação de cultivares de milho eficientes de nitrogênio e na associação com bactérias diazotróficas. Ciência Rural, v.35, p. 924-927, 2005.

Stamford, N. P. ; Lima, R. A.; Santos, C. E. de R. e S. ; Dias, S.H.L. Rock biofertilizers with *Acidithiobacillus* on sugarcane yield and nutrient uptake in a Brazilian soil. Geomicrobiology Journal, Elsevier - United Kingdom, v. 23, n. 5, p. 261-265, 2006.

Stamford, N. P.; Santos, C.E.R.S.; Stamford, W.P.J.; Dias, S.H.L. Biofertilizante de rocha com *Acidithiobacillus* em solo de tabuleiro cultivado com caupi. Analytica. 3:48-52, 2004.

Stamford, N.P.; Santos, C.E.R.S.; Silva Junior, S.; Lira Junior, M.A.; Figueiredo, M.V.B. Effect of rhizobia and rock biofertilizers with *Acidithiobacillus* on cowpea nodulation and nutrients uptake in a tableland soil. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v.24, p.1857-1865, 2008.

## **CAPITULO I**

**Bioprotetor enriquecido em N por adição de diazotrófica de vida livre e da quitosana  
fúngica de *Cunninghamella elegans***

Artigo enviado para a Revista “**Pesquisa Agropecuária Brasileira**”

## **Bioprotetor enriquecido em N por adição de diazotrófica de vida livre e da quitosana fúngica de *Cunninghamella elegans***

**Resumo** – O nitrogênio é o macronutriente mais limitante para o crescimento das plantas, e normalmente não é encontrado diretamente nas rochas. Assim o estudo com bactérias fixadoras de N sejam de vida livre, associativas ou simbióticas são de extrema importância para o desenvolvimento da agricultura. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o enriquecimento em N na matéria orgânica (húmus de minhoca) por inoculação com bactéria diazotrófica de vida livre e adição de quitosana fúngica pelo fungo da Ordem Mucorales (*Cunninghamella elegans*) que possui na parede celular a quitosana, biopolímero que atua no controle de doenças de plantas. A bactéria diazotrófica de vida livre foi selecionada no Núcleo de Fixação Biológica do N<sub>2</sub> nos Trópicos da UFRPE. As bactérias foram isoladas em placas de sílica gel, cultivadas em meio de cultura (LG líquido), e mantidas em crescimento sob agitação por 15 dias ( $\pm 28^{\circ}\text{C}$ ). A produção do biofertilizante (BNPK) e do Bioprotetor (PNPK) foi realizada em ensaios em laboratório (bandejas) e em condições de campo usando canteiros da Horta Experimental da UFRPE. No experimento em campo na inoculação com bactéria diazotrófica de vida livre foram adicionados 30L de meio ( $10^8$  células viáveis mL<sup>-1</sup>) para cada 3000 kg de matéria orgânica (Húmus de minhoca). O fungo *C. elegans* foi cultivado em meio batata dextrose (BD) e a inoculação feita da mesma forma descrita para o ensaio com bactéria diazotrófica. Em todos os experimentos foram coletadas amostras no início, e semanalmente, após a inoculação (T0, T7, T14, T21, T28, T35 e T42). Os resultados demonstram que o período de máxima eficiência no processo da fixação biológica de N<sub>2</sub> pela bactéria diazotrófica é atingido aos 35 dias de incubação, com um incremento de N na faixa de 100% em comparação com o N inicial (T0). O trabalho mostra a possibilidade de obtenção de biofertilizante misto (BNPK) com maior nível de N pela inoculação com bactéria diazotrófica de vida livre. O Bioprotetor (PNPK) com quitosana fúngica (PNPK), promove aumento de N, P e K no produto e tem potencial de disponibilizar nutrientes para a planta.

**Termos para indexação:** disponibilidade de nutrientes, incorporação de nitrogênio, fertilização NPK, fixação assimbiótica, matéria orgânica, quitosana

**Bioprotector enriched in N by free living diazotrophic bacteria and fungi chitosan  
from *Cunninghamella elegans***

**Abstract** – Nitrogen is one of the macronutrient that affects plant growth, and is usually not found on the rocks. Thus the study involving N-fixing bacteria with free living or symbiotic associations are of extreme importance for the development of agriculture. The objective of this study was to evaluate the enrichment in N of the organic matter (earthworm compound) by inoculation with free living diazotrophic bacteria and the addition of fungi chitosan adding *Cunninghamella elegans* that contain chitosan in their cell wall, a biopolymer that have the properties to act in the control of plant diseases. Diazotrophic bacteria were isolated from Brazilian soils and selected at the Nucleus of Biologic Nitrogen Fixation in the Tropics (NBNFT/UFRPE). The diazotrophic bacteria, were isolated in silica gel plaques and grown in liquid culture (LG medium), maintained under shaking during 15 days ( $\pm 28^{\circ}\text{C}$ ). The biofertilizer (NPKB) and the Protector (NPKP) production were processed in laboratorial assay using plastic trays, and in field conditions in furrows at the University Federal Rural of Pernambuco Horticultural Station. In field the diazotrophic bacteria was inoculated adding 30 L of the culture medium ( $10^8$  viable cells  $\text{mL}^{-1}$ ) for each 3000 kg of organic matter (earthworm compound). The fungus *C. elegans* was grown in potato-dextrose medium (PD) and the inoculation was processed in the same manner described for the diazotrophic bacteria. In all assays samples were collected weekly (T0, T7, T14, T21, T28, T35 e T42, after inoculation) for chemical analyzes. By the results it was observed that the time for maximum efficiency for increment of the biological N fixation by the free living diazotrophic bacteria was achieved at 35 days after inoculation and N increase up to 100% compared with the initial N (T0). The research work showed the possibility to obtain a mixed fertilizer (NPKB) with higher N rate due to the free living diazotrophic bacteria inoculation. The bioprotector (NPKP) increments the N, P and K content of the product and have potential to provide nutrients for plants.

Key words: assimbiotic  $\text{N}_2$  fixation, chitosan, nitrogen uptake, NPK fertilization, nutrient availability, organic matter.

## Introdução

O crescimento acentuado da população mundial, a demanda do uso de fertilizantes e pesticidas e bem como os constantes aumentos no custo dos insumos têm promovido sensíveis mudanças nos sistemas de produção principalmente com vistas na agricultura sustentável (Lima et al., 2010).

A fertilização com NPK é um dos fatores mais importantes que afetam a produção, a nutrição e disponibilidade de nutrientes no solo, e torna-se necessário intensificar o uso de novas técnicas visando incrementar a produtividade e melhorar ao máximo o sistema de produção agrícola (Stamford et al., 2008). Pesquisas realizadas com biofertilizantes produzidos com rochas fosfatadas e potássicas com adição de enxofre elementar inoculado com a bactéria oxidante do enxofre *Acidithiobacillus*, que metabolicamente produz  $H_2SO_4$ , mostraram grande possibilidade de significativa contribuição para aumento da disponibilidade de nutrientes, principalmente P e Ca proveniente de fosfatos naturais, K e Mg da biotita e sulfato solúvel do ácido sulfúrico produzido.

No entanto, é bastante conhecido que o N é na maioria das vezes, o nutriente mais limitante para o crescimento e produtividade das plantas, e normalmente não é encontrado diretamente nas rochas. O processo da fixação biológica de nitrogênio atmosférico é um dos mais importantes na natureza, sendo realizada por bactérias conhecidas como diazotróficas, que podem ser simbióticas, associativas e assimbióticas ou de vida livre (Reis et al., 2006). As bactérias diazotróficas possuem um complexo enzimático denominado de nitrogenase, que realiza biologicamente a quebra da tripla ligação existente na molécula de  $N_2$  incrementando a formação de N orgânico (Moreira e Siqueira, 2006).

As bactérias diazotróficas associativas e simbióticas, normalmente apresentam uma maior contribuição nos ecossistemas, fixando de 20 a 100 kg ha ano<sup>-1</sup> de N e 30 a 200 kg ha ano<sup>-1</sup> de N, respectivamente. As bactérias diazotróficas de vida livre, que não necessitam de planta hospedeira, são as que apresentam um maior potencial para serem utilizadas como alternativa para o enriquecimento dos resíduos orgânicos em nitrogênio. As bactérias diazotróficas de vida livre (assimbióticas) abrangem microrganismos que podem ser encontrados no solo e em ambientes aquáticos, e necessariamente não fazem parte de estruturas mutualísticas ou associativas (Reis et al., 2006).

Nos sistemas agrícolas, o potencial de algumas bactérias aeróbicas ou microaerofilicas de vida livre tem sido demonstrado, como, por exemplo, espécies dos gêneros *Azotobacter* e *Beijerinckia*, por meio da inoculação de resíduos ricos em carbono,



especialmente com alta relação C/N, resultando em razoáveis taxas de fixação de nitrogênio (Hill e Patriquin, 1995). Lima et al. (2010) em pesquisa a nível de laboratório (bandejas) encontraram incremento em torno de 100% em N total da matéria orgânica (húmus de minhoca), após incubação por 45 dias, com bactérias diazotróficas de vida livre, o que representa um satisfatório incremento de N para uso como insumo na agricultura.

Estudos biológicos utilizando quitosana de crustáceos são realizados visando avaliar a resistência das plantas a patógenos (Berger et al., 2010), e também para incrementar a liberação de nutrientes para o ambiente, em função de suas propriedades, conferida pela presença de grupos amínicos em sua composição.

O presente trabalho tem como objetivo obter Bioprotetor (PNPK) utilizando a biomassa do fungo *Cunninghamella elegans* aplicada ao biofertilizante misto (BNPK), produzido com a mistura de biofertilizante de rochas com P e K; matéria orgânica inoculadas com bactéria de vida livre.

## **Material e métodos**

### ***Produção de biofertilizante misto (BNPK) em laboratório***

A bactéria diazotrófica de vida livre utilizada para produção do biofertilizante misto foi a NFB 10001, isolada da área de Mata Atlântica localizada na Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE. Esta bactéria foi selecionada em trabalho prévio conduzido pela equipe do Núcleo de Fixação Biológica do N<sub>2</sub> nos Trópicos da UFRPE. A bactéria selecionada foi isolada em placas de sílica gel, cultivada em meio de cultura LG (Döbereiner et al., 1995), repicada para tubos e conservada com óleo mineral na bioteca do NFBNT.

Para produção do inóculo a bactéria selecionada (NFB 10001) foi cultivada em meio LG líquido, durante 3 dias a 28°C. Após a concentração de 10<sup>7</sup> células viáveis mL<sup>-1</sup>, foi feita a transferência de 50 mL para Erlenmeyers de 125 mL, mantidos sob agitação constante em mesa orbital, a 150 rpm, durante 4 dias a temperatura ambiente (28° C ± 2° C).

A inoculação foi realizada com adição de 0,1 L do inóculo para cada bandeja (6 dm<sup>3</sup>) contendo os tratamentos para produção de biofertilizante misto (BNPK), visando avaliar o incremento de N em função da inoculação com o isolado da bactéria diazotrófica (NFB 10001). Os materiais orgânicos utilizados como tratamentos foram: torta de filtro,

levedura e melação, resíduos da produção de açúcar e álcool gentilmente cedidos pela Usina Cruangí, localizada no município de Timbaúba, Pernambuco-Brasil. Cada resíduo (torta de filtro, levedura e melação) possuía respectivamente: 0.96, 4.24, 0.78 % de N; 1.02, 0.73, 0.43 % de P; 0.73, 0.97, 7.71 % K.

Os tratamentos usados foram os seguintes:

(T1) - 4 dm<sup>3</sup> de torta de filtro;

(T2) - 4 dm<sup>3</sup> de torta de filtro + 0,1 L do inoculo NFB 10001;

(T3) - 4 dm<sup>3</sup> (torta de filtro) + 0,5 L de melação+ 0,1 L do inoculo NFB 10001;

(T4) - 4 dm<sup>3</sup> (torta de filtro + 0,75 L de melação+ 0,1 L do inoculo NFB 10001;

(T5) - 4 dm<sup>3</sup> de torta de filtro + 0,1 L de melação+ 0,1 L do inoculo NFB 10001;

(T6) - 2 dm<sup>3</sup> de levedura + 0,25L de melação+ 0,05 L do inoculo NFB 10001;

(T7) - 2 dm<sup>3</sup> de levedura + 0,5 L de melação+ 0,05 L do inoculo NFB 10001

e (T8) - 2 dm<sup>3</sup> de levedura.

O melação foi usado como fonte de carbono para promover rápido crescimento da bactéria fixadora de nitrogênio.

Durante o período de incubação foi mantida a umidade nas bandejas em nível equivalente a 80% da retenção máxima, por controle por pesagem diária, utilizando água destilada. Após a inoculação com a bactéria diazotrófica de vida livre (NFB 10001), foi procedida a incubação por 35 dias, e coletadas amostras no tempo inicial e com 7, 14, 21, 28 e 35 dias, após a inoculação, para análise de pH, N total, N amoniacal, N nítrico e N orgânico, P e K disponível.

### ***Produção de BNPK em condições de campo***

Em função dos resultados obtidos com o biofertilizante misto e do Bioprotetor em laboratório, através de experimentos em casa de vegetação, foi realizada a produção de biofertilizante bioprotetor em condições de campo, utilizando canteiros da Horta Experimental da Universidade Federal Rural de Pernambuco, seguindo as recomendações de Stanford et al. (2008). Para cada canteiro com 3000 kg de húmus de minhoca, foram adicionados 30L de cultura da bactéria diazotrófica de vida livre (NFB 10001) com crescimento bacteriano equivalente a 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. Como substrato para incremento da multiplicação da bactéria diazotrófica foi usado lodo de sorvete líquido (1 m<sup>3</sup> por canteiro), cedido pela indústria Unilever (Recife). Foi realizada a incubação por 35 dias, e coletadas amostras no tempo inicial e com 7, 14, 21, 28 e 35 dias, após a inoculação, para análise de

pH, N total, P e K disponível. O biofertilizante foi por fim ensacado em sacos de polietileno contendo 5kg cada, etiquetados e armazenados em ambiente seco a temperatura ambiente.

O N total foi analisado pelo método de Kjeldhal, com digestão sulfúrica, em analisador automático Kjeltex (Modelo 1030). N amoniacal, N nítrico e N orgânico pela metodologia da Embrapa (2009). O P e K disponível foram determinados por digestão nitroperclórica, com o P analisado por colorimetria e o K por fotometria de chama seguindo a metodologia descrita por Malavolta et al. (1989).

As análises estatísticas foram procedidas usando o programa SAS versão 9.0, (SAS Institute, 1996) sendo realizada a análise de variância e comparação de medias pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

### ***Produção do Bioprotetor (PNPK)***

A produção do bioprotetor (PNPK) foi realizada com adição de biomassa micelial do fungo *Cunninghamella elegans* ao biofertilizante misto (BNPK) com rochas (fosfatada e potássica) em mistura com matéria orgânica (composto de minhoca) inoculada com a bactéria diazotrófica de vida livre selecionada (BNPK),

Amostras do fungo Ordem Mucorales *Cunninghamella elegans* (UCP 542), cedidas pelo banco de culturas da Universidade Católica de Pernambuco, foram mantidas em meio BDA e estocadas em refrigeração (5°C). As células foram crescidas durante 9 dias, em placas de Petri contendo meio BDA. Após crescimento, retirou-se esporangióolos, com auxílio da alça, e riscou-se em Erlenmeyers de 2 L contendo 1L de meio BD, pH 5,6 (Franco, 2005). Os Erlenmeyers foram incubados durante 96 dias e mantidos sob agitação orbital, e ao final do crescimento foi feita repicagem para Erlenmeyers de 2000 mL sob agitação a 180 rpm, durante 5 dias.

Com a biomassa obtida procedeu-se a adição do fungo nas bandejas foi realizada, da mesma forma descrita para a inoculação com o isolado da bactéria diazotrófica. Foi realizada a incubação por 35 dias, e coletadas amostras no tempo inicial e com 7, 14, 21, 28 dias, após a inoculação, para análise de pH, N total, P e K disponível.

## **Resultados e discussão**

### ***Produção de biofertilizante misto (BNPK) em laboratório***

A Figura 1 mostra os resultados de pH após inoculação com a bactéria diazotrófica de vida livre (NFB10001) nos resíduos sucroalcooleiros (torta de filtro, levedura e melão). Os resultados encontrados nos tratamentos T6; T7 e T8 apresentaram os valores de pH mais baixos, provavelmente devido a produção de sulfato de amônio, que resulta em leve diminuição do pH (Alfaia, 1997).

A Figura 2 apresenta os resultados de N total no Biofertilizante misto (BNPK), nos diferentes períodos até 40 dias após a inoculação. Os valores 4,3; 4,7 e 5,7% de N foram obtidos respectivamente para T8, T6 e T7, tratamentos contendo levedura e melão, com adição do isolado da bactéria diazotrófica de vida livre (NFB 10001). O valor de 5,7% corresponde a um incremento de aproximadamente 40% de N em relação ao tratamento com levedura sem inoculação e sem melão. Observa-se que o incremento de N total foi crescente e diretamente proporcional ao aumento da dose de melão.

Meunchang et al. (2005) obtiveram 6 a 16% de N total em comparação com o controle não inoculado quando inoculou bactérias diazotróficas de vida livre em resíduos de usina de cana de açúcar.

A Figura 3 mostra os resultados de P disponível (40 dias após a inoculação). Os valores para os tratamentos T6; T7 e T8 de P foram respectivamente 540; 279 e 566 (mg dm<sup>-3</sup>), nos tratamentos contendo levedura e melão inoculados com o isolado da bactéria diazotrófica (NFB 10001). O tratamento T7 apresentou o valor de P disponível mais baixo, provavelmente devido ao processo da imobilização promovido pelo crescimento acelerado da bactéria diazotrófica de vida livre como relatado por Moreira e Siqueira (2006).

### ***Produção de BNPK em condições de campo***

Os resultados de pH determinado em dois canteiros (média de 4 repetições por canteiro) são apresentados na Tabela 1. Verifica-se que em função do tempo ocorreu redução nos valores de pH da matéria orgânica enriquecida por inoculação com bactérias diazotróficas de vida livre, com sensível efeito dos 7 até os 14 dias. Posteriormente também ocorreu redução até os 28 dias. Provavelmente este efeito deve-se à produção de N amoniacal, como também foi observado no N total. Com o incremento satisfatório após 28

dias e aos 35 dias após a inoculação com bactéria diazotrófica ocorreu a maior incorporação de N ao substrato (húmus de minhoca). Após os 35 dias os resultados mostram que deve ocorrer redução no incremento do N total.

Os resultados de N total determinado em dois canteiros (média de 4 repetições por canteiro) são apresentados na Tabela 1. Verifica-se que houve incremento do N total em função do tempo, sendo observado um período de pequeno aumento (tempo 0 até 21 dias) e com incremento satisfatório após 28 dias e aos 35 dias após a inoculação com o isolado da bactéria diazotrófica NFB 10001. Verifica-se que ocorreu a maior incorporação de N ao substrato (húmus de minhoca), e após os 35 dias os resultados mostram redução no incremento do N total, provavelmente por efeito da imobilização e posteriormente volatilização (Meunchang et al., 2005).

O N total analisado no tempo inicial para os 35 dias após a inoculação mostra um incremento de 112%. O aumento observado para N total no húmus de minhoca, em função da inoculação com a bactéria diazotrófica selecionada representa um aumento satisfatório, e possibilita melhor utilização do produto na agricultura. Estes resultados mostram que a melhor época para a coleta do húmus de minhoca deverá ser em torno de 35 dias após a inoculação com bactérias diazotróficas efetivas na fixação de  $N_2$ .

Os dados encontrados são semelhantes aos obtidos por Lima et al. (2010) trabalhando com húmus de minhoca inoculado com bactérias diazotróficas de vida livre em bandejas. No presente trabalho os resultados foram encontrados em condições de campo, com produção a nível piloto, utilizando húmus de minhoca com adição da bactéria diazotrófica de vida livre que apresentou os melhores dados de incremento do N total.

De acordo com resultados obtidos em ensaio com bandejas, após 35 dias verifica-se redução no N total, entretanto na produção em condições de campo observa-se também incremento no N amoniacal (Figura 4), que inclui a liberação de N das células das bactérias diazotróficas tendo em vista que no processo da fixação do  $N_2$  ocorre transformação de N atmosférico para a forma de N amoniacal.

Os resultados do experimento em condições de campo estão de acordo com os obtidos no ensaio em bandejas, que também mostraram redução no N total após 35 dias de incubação, provavelmente devido a morte das células das bactérias diazotróficas, que posteriormente deverão sofrer mineralização e conseqüentemente aumento no N total do substrato. Os resultados com produção de N principalmente na forma amoniacal mostram que houve efeito da bactéria diazotrófica tendo em vista que nessa forma o N é proveniente do processo da fixação biológica do  $N_2$ .

### ***Produção do Bioprotetor (PNPK)***

Os resultados de pH, N total e P disponível do Biofertilizante Bioprotetor determinados em bandejas em condições de laboratório são apresentados na Tabela 2. Para os valores de pH, observou-se leve aumento nestes parâmetros em função do tempo. Provavelmente este efeito deve ser devido a decomposição da matéria orgânica, promovendo ligeiro aumento de pH (Paes et al., 1996).

Foi observado aumento significativo de N-total, P e K disponível conforme pode-se verificar na tabela 2. Berger (2010) obteve aumentos significativos de N total, P e K disponível após incubação com adição do fungo produtor de quitosana *C. elegans* no Biofertilizante misto.

A inoculação com o fungo *C. elegans* para produção do Biofertilizante Bioprotetor promove leve aumento no teor de P e K disponível no Biofertilizante Bioprotetor. Provavelmente há uma liberação de íons fosfatos produto metabólico da atividade do *C. elegans*. Franco et al (2011) verificaram que ocorre um aumento do conteúdo de fosfato total na biomassa de *C. elegans*, ao longo do tempo, em diferentes meios de culturas devido a formação de polifosfato inorgânico.

### **Conclusões**

Os resultados obtidos permitem concluir que a inoculação do húmus de minhoca com bactérias diazotróficas de vida livre promove incremento superior a 100% no N total, possibilitando melhor utilização do produto na agricultura orgânica. O período mais adequado para a coleta do húmus enriquecido em N encontra-se em torno de 35 dias após a inoculação.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Apoio e Tecnologia do estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro para a pesquisa e pelas bolsas concedidas.

## Referências Bibliográficas

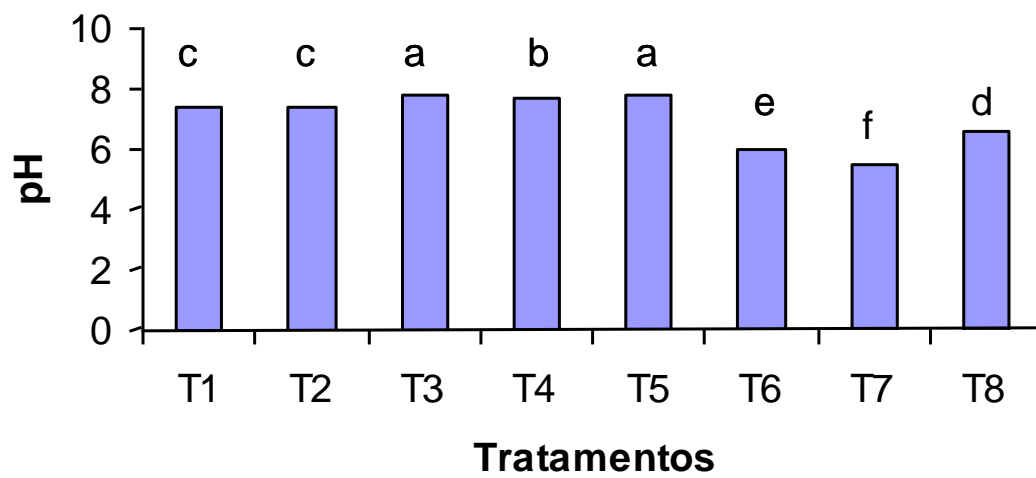
- Alfaia, S. S. Destino de adubos nitrogenados marcados com  $^{15}\text{N}$  em amostras de dois solos da Amazônia Central. R. bras. Ci. Solo, Viçosa, 21:379-385, 1997
- Paes, J.M.V; Andreola, F. Brito, C.H.; Loures, E.G. Decomposição da palha de café em três tipos de solo e sua influência sobre a CTC e o pH. Revista Ceres 43 (249): 674-683. 1996.
- Lima, M.A.Barbosa.; Nascimento, A.E.; Souza, W.; Fukushima, K.; Campos-Takaki, G.M. Effects of phosphorus on polyphosphate accumulation by *Cunninghamella elegans*. Braz. J. Microbiol. [online]. 2003, vol.34, n.4, pp. 363-372.
- Berger, L.R.R. Efeito da quitosana e do biofertilizante-bioBioprotetor na murcha-de-fusário em caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp). 2010. 74p. (Dissertação de Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- Döbereiner, J.; Baldani, V.L.D.; Baldani, J.I. 1995. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. Brasília: EMBRAPA-SPI: Itaguai, RJ: EMBRAPACNPAB, 60p.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Manual de Análises Químicas de Solo, Plantas e Fertilizantes. 2ª ed. rev. ampl. – Brasília, DF: Embrapa Informações Tecnológicas, 627p. 2009.
- Franco, L. O.; Stamford, T. C. M.; Stamford, N. P.; Takaki, G. M. C. *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. Analytica. 4: 40-44. 2005.
- Franco, L. O.; Albuquerque, C.D.C.; Stamford, N. P., Lima, M.A.B., Takaki, Galba Maria Campos. Avaliação da atividade ácida e alcalina e acúmulo de fosfato inorgânico em amostras de *Cunninghamella elegans*. Analytica, 54: 70 - 78, 2011.
- Hill, N. M.; Patriquin, D. G. (1995), Maximizing  $\text{N}_2$  fixation in sugarcane litter. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics – the Role of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts. Seropedica, EMBRAPA-CNPAB, p. 59-60.
- Lima, F., S.; Stamford, N. P. ; Sousa, C.S. ;Lira Júnior; Malheiros, S.M.M. ; van Straaten, P. . Earthworm compound and rock biofertilizer enriched in Nitrogen by inoculation with free living diazotrophic bacteria. World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 27, p. 1-7, 2010.
- Meunchang, S.; Panichsakpatana, S.; Weaver, R.W. 2005. Inoculation of sugar mill by-products compost with  $\text{N}_2$ -fixing bacteria. *Plant and Soil*. 271:219–225
- Malavolta, E.; Vitti, G.C.; Oliveira, A.S. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. 201p., 1989.
- Moreira, F. M. S.; Siqueira, J. O. (2006), Microbiologia do solo. 2 ed. Larva: editora UFLA, p. 729.

Reis, V.M.; Oliveira, A.L.M.; Baldani, V.L.D.; Olivares, F.L.; Baldani, J.I. (2006), Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: Fernandes, M.S., ed. Nutrição mineral de plantas. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciências do Solo. p.153-172.

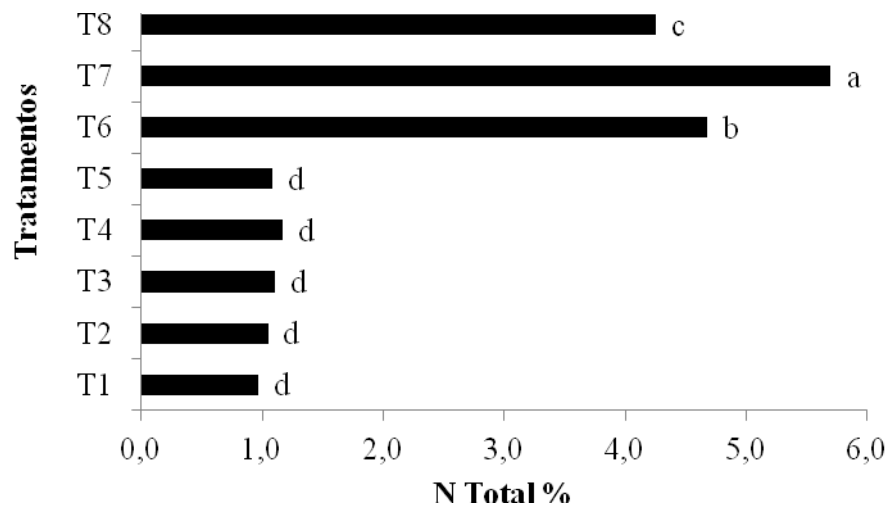
SAS Institute Inc. SAS/STAT<sup>TM</sup>. *SAS user's guide for windows environment*. 6.08 ed. Cary, SAS Institute Inc., 1995.

Stamford, N.P.; Izquierdo, C. G.; Fernández, M.T.H. ; Moreno, M. C.M. Biofertilizantes de rochas fosfatadas e potássicas com enxofre e *Acidithiobacillus*. In: Figueiredo, M.V.B.; Burity, H.A.; Stamford, N.P.; Santos, C.E. DE R. E S. (Ed.). *Microorganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura*. Guaíba: Agrolivros, 2008, p-401-421.

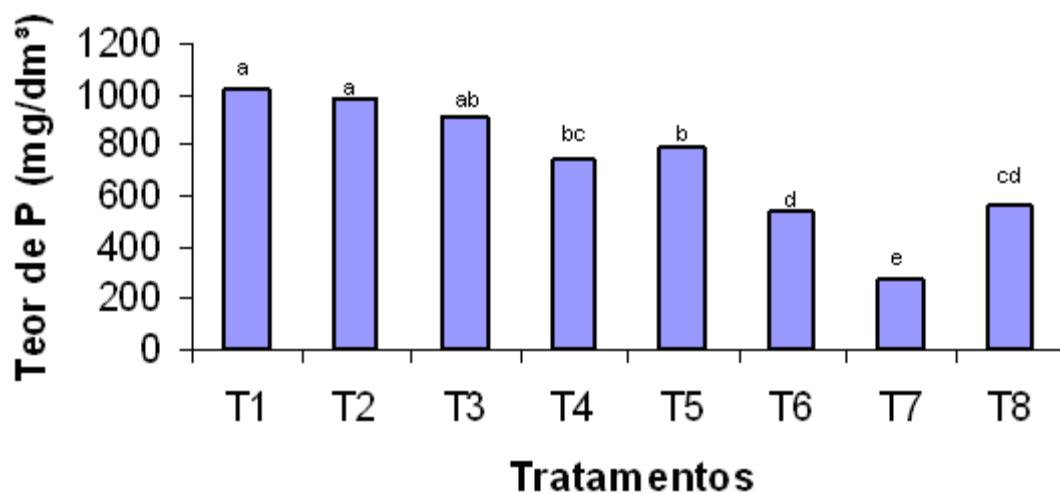




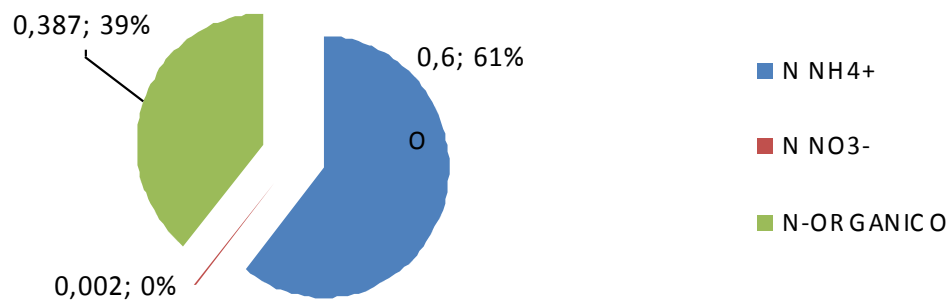
**Figure 1.** Valores de pH do biofertilizante misto com resíduos sucroalcooleiros, aos 40 dias após a inoculação com bactéria diazotrófica de vida livre na bandeja.



**Figura 2.** N Total (%) no ensaio em laboratório (bandejas) 40 dias após a inoculação com o isolado de bactéria diazotrófica de vida livre (NFB 10001) em tratamentos com diferentes resíduos da indústria da cana de açúcar (torta, melaço e levedura).



**Figure 3.** P disponível ( $\text{mg dm}^{-3}$ ) no ensaio de laboratório (bandejas) 40 dias após a inoculação com bactéria diazotrófica de vida livre em resíduos da indústria de cana de açúcar (torta, melaço e levedura).



**Figura 4.** Fracionamento do N no biofertilizante misto (BNPK), com análise de N-amoniacoal, N nítrico e N orgânico, em amostras coletadas no ensaio de campo.

**Tabela 1.** pH e Teores de N total do Biofertilizante misto (BNPK) no ensaio em laboratório, com dados representando a média de 4 repetições.

<b>Coletas</b>	<b>pH</b>	<b>N total</b>
	H <sub>2</sub> O (1,0:2,5)	(g kg <sup>-1</sup> )
To (tempo inicial)	7,56 <sup>a</sup>	5,6 d
T2 (7 dias)	6,86 <sup>b</sup>	5,2 d
T3 (14 dias)	6,87 <sup>b</sup>	6,1 cd
T4 (21 dias)	6,40 <sup>c</sup>	5,7 cd
T5 (28 dias)	6,21 <sup>cd</sup>	7,4 bc
T6 (35 dias)	6,28 <sup>d</sup>	11,9 a
T7 (42 dias)	6,34 <sup>cd</sup>	8,2 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV%: pH = 0,68323; N total = 8,31.

**Tabela 2** – pH, N total e P disponível no Biofertilizante Bioprotetor (PNPK) produzido em bandejas campo, incubado durante 35 dias.

Período <sup>1</sup>	pH	N-total	P disponível	K disponível
	H <sub>2</sub> O (1:2,5)	-----	g kg <sup>-1</sup> -----	-----
T <sub>0</sub> (Início)	6,04	4,8	0,82	0,8
T <sub>1</sub> (7 dias)	6,28	5,6	1,23	1,2
T <sub>2</sub> (14 dias)	6,29	7,2	1,36	1,2
T <sub>3</sub> (21 dias)	6,36	8,5	1,37	1,2
T <sub>4</sub> (28 dias)	6,40	10,3	1,39	1,2

<sup>1</sup>T<sub>0</sub>; T<sub>1</sub>; T<sub>2</sub>; T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> referem-se a coletas que foram feitas a cada 7 dias, considerando T<sub>0</sub> o dia da inoculação.

## **CAPÍTULO II**

**Características de *Cunninghamella elegans* e Atividade antimicrobiana da quitosana contra o fungo fitopatogênico *Pythium* em condições “*in vitro*”**

Artigo enviado para a Revista “**Pesquisa Agropecuária Brasileira**”

## **Características de *Cunninghamella elegans* e atividade antimicrobiana da quitosana contra o fungo fitopatogênico *Pythium* “in vitro”**

**Resumo** - O crescimento das plantas é limitado pela atuação de fungos fitopatogênicos, especialmente encontrados em solos tropicais. O estudo de substâncias com ação contra microrganismos fitopatogênicos vem se tornando da maior importância para o desenvolvimento da agricultura, sendo a quitosana o biopolímero que vem mostrando especial atuação no controle de doenças de plantas. O objetivo do presente trabalho foi de avaliar em placas de Petri a atuação da quitosana contra o fungo fitopatogênico *Pythium* sp., visando a produção de biofertilizante Bioprotetor com adição de quitosana fúngica produzida por *Cunninghamella elegans*. Nos ensaios iniciais em placas de Petri observou-se o desenvolvimento de biomassa, o consumo de nitrogênio e a variação do pH no crescimento do fungo *C. elegans*, e em seguida realizar os testes de atividade da quitosana contra o fungo patogênico *Pythium*, utilizando diferentes concentrações de quitosana em meio de cultura. Observou-se rendimento máximo de biomassa de *C. elegans* com 96 h de crescimento, estabilizando o pH a valores próximos de 6,0. Através dos testes de atuação do biopolímero, observou-se o efeito da quitosana inicia na redução do crescimento de *Pythium* sp. a partir da concentração 0,5 mg mL<sup>-1</sup> e que ocorre inibição total do crescimento do fitopatógeno na concentração de 2 mg mL<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos em ensaios com placas de Petri foram expressivos e deverão ser utilizados no experimento em campo com alface. Foi mostrada ampla possibilidade de produção de biofertilizante Bioprotetor com adição de biomassa de *C. elegans* em laboratório.

**Termos para indexação:** atuação antifúngica, características fúngicas, fungo Mucorales, fungo patogênico, quitosana de fúngica, fungo Zygomycetes.



## Characteristics of *Cunninghamella elegans* and chitosan activity against the phytopatogenic fungi *Pythium* “in vitro”

**Abstract** - Plant growth is limited by pathogenic action promoted by phytopatogenic fungi, especially in reference to tropical soils. Studies have been conducted to evaluate the effects of biopolymers against phytopatogenic microorganisms, and chitosan have received special attention for agricultural systems especially for control of fungi diseases. The main objective of this study was to evaluate the action of chitosan against the fungi phytopatogenic *Pythium* sp., with the aim to produce biofertilizer bioprotector with fungi chitosan produced by *Cunninghamella elegans*. In a previous assay carried out in Petri dishes were observed the biomass yield, protein consumption and determined pH values in the growth of *C. elegans* fungi and followed realized tests to evaluate the chitosan action against the pathogenic fungi *Pythium* sp. using different chitosan rates. Maximum yield of the *C. elegans* biomass were observed at 96 h growth and the pH were stable in values close to 6.0. The tests with the biopolymer showed that the effect of chitosan initiated to reduce the *Pythium* growth at rate 0.5 mg mL<sup>-1</sup> and total inhibition on the pathogenic fungi were obtained with rate 2 mg mL<sup>-1</sup>. The results were expressive and may be used in field experiments with lettuce, and showed great possibility for production or bioprotector by *C. elegans* produced in laboratory.

**Key words:** antifungal action, fungi characteristics, fungi chitosan, Mucorales fungi, pathogenic fungi, Zygomycetes fungi.

### Introdução

Um aspecto bastante importante para a produtividade e qualidade da produção agrícola é o que diz respeito aos processos de resistência das plantas a doenças, em especial as promovidas por fungos radiculares, tais como *Pythium* e a murcha de fusário. No combate às doenças de plantas se faz absolutamente necessário avaliar a atuação de produtos cuja aplicação não cause danos ao ambiente e às plantas, e também, conseqüentemente, não venha promover problemas com a nutrição humana e animal.

A utilização de massa micelial de fungos como fonte alternativa de quitina e quitosana tem demonstrado grandes vantagens, tais como: extração simultânea de quitina e

quitosana, independência dos fatores de sazonalidade, produção em larga escala (Amorim et al., 2001; Amorim, et al., 2006). A quantidade do polissacarídeo extraído da biomassa fúngica varia, entre outros fatores, com a espécie de fungo e com as condições de cultivo utilizadas (Franco et al., 2004). Geralmente fungos da Classe Zygomycetes apresentam maior quantidade de quitina e quitosana em sua parede celular (Franco et al., 2004; Amorim, et al., 2006; Stamford, et al., 2007).

O gênero *Pythium* criado por Pringsheim em 1858 é classificado atualmente como pertencente à família *Pythiaceae*, ordem *Pythiales*. O gênero possui cerca de 150 espécies conhecidas, sendo a maioria delas cosmopolita, as quais podem ser sapróbias em diferentes substratos, como água e solo, entre outros, e como parasita de algas, crustáceos, outros fungos, plantas vasculares, mamíferos, e inclusive no homem (Kirk et al., 2008). É considerado como um dos gêneros de organismos zoospóricos de maior importância, principalmente devido ao alto potencial parasítico de muitas espécies de plantas de interesse econômico, causando apodrecimento de raízes, caules e frutos. Promove a podridão de sementes na pré-emergência, e o tombamento de plântulas na pós-emergência, conhecido como “*damping off*”. Representantes de *Pythium* podem também ocasionar reduções significativas na produção de diversas culturas, mesmo na ausência de sintomas radiculares e foliares visíveis, o que tem sido classificado como infecção sub clínica (Owen-Going et al., 2003).

Métodos naturais menos agressivos são necessários para diminuir os prejuízos causados por este patógeno. O controle biológico vem ao encontro desta demanda, pois se baseia em métodos ambientalmente corretos, e que pode fazer parte de um controle integrado de doenças, sendo considerado como uma medida promissora para a redução do uso dos agrotóxicos e proteção das culturas (Grigoletti Junior et al., 2000, Slininger et al. 2003, Morandi e Bettiol, 2009).

A quitosana é usada como produto antifúngico e indutor de mecanismo de defesa na planta. Algumas hipóteses sugerem que a quitosana pode alterar a permeabilidade da membrana plasmática (Benhamou, 1996) e provocar estresse oxidativo em fungos patogênicos (Di Piero e Garda, 2008).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de crescimento e alguns atributos do fungo *C. elegans*, e o efeito de diferentes concentrações da quitosana em ensaios “*in vitro*” atuando no desenvolvimento micelial de *Pythium*, fungo patogênico da alface.

## Material e métodos

### *Isolamento do fungo Pythium de solo da área do experimento em campo*

Para verificar a atuação antifúngica da quitosana procurou-se obter isolados do fungo *Pythium* proveniente de solo da área onde seria conduzido o experimento com alface. Para isolar o fungo *Pythium*, seguiu-se a metodologia citada por Menezes e Assis (2004) que consiste no uso de iscas de pepino. A área experimental de onde foi coletado o solo está localizada na Estação Experimental Luiz Jorge da Gama Wanderley, unidade pertencente ao Instituto de Pesquisa de Pernambuco – IPA, no município de Vitória de Santo Antão – PE.

Colocou-se o solo em potes de vidro de 1000 mL, até a camada de solo atingir o volume de 300 mL. O pepino foi lavado com água e sabão e, em seguida, cortou-se ao meio com auxílio de uma faca limpa e flambada. O pepino deve ser colocado em Becker mantendo a parte cortada em contato com a superfície do solo, previamente umedecido com água esterilizada. O pote foi coberto com plástico filme, mantido a temperatura em torno de 25 °C, durante quatro dias. O crescimento do fungo sobre a superfície do pepino foi observada constantemente a partir do terceiro dia da montagem do ensaio com isca.

A partir do desenvolvimento do *Pythium* do solo para a superfície do pepino, foi retirado micélio do fungo, transferido em condições assépticas para placas de Petri com meio BDA mais 0,25 g de cloridrato de tetraciclina. O isolado do fungo *Pythium* foi preservado em placas de Petri com meio BDA a 25 °C sob luz constante (Figura 1).

### *Condições de crescimento de quitosana de Cunninghamella elegans*

O microrganismo utilizado neste trabalho foi *Cunninghamella elegans* (UCP 542), gentilmente cedido pelo Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – NPCIAMB – Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP. Amostras deste microrganismo foram mantidas em placas de Petri com BDA (Batata Dextrose Agar) e para o cultivo em batelada foi usado o meio BD (Batata Dextrose) com a seguinte composição: glicose (20 g), infusão de batata (200 g de batata para cada 1L de água destilada), pH 5,6.

A repicagem do fungo *Cunninghamella elegans* (UCP 542) foi feita após um período de crescimento do fungo *C. elegans* (4-5 dias) com suspensão esporica através da padronização do pré inóculo: 10<sup>6</sup> esporos/mL, utilizando Câmara de Neubauer.

Utilizou-se o meio de cultura BD que foi autoclavado a 120 °C, por 15 minutos, com o pH ajustado para 5,6. Este valor de pH é o que permitir melhor rendimento de quitina e quitosana. A suspensão esporíca foi adicionada ao meio BD em Erlenmeyers de 500 mL contendo 225 mL do meio BD e 25 mL da suspensão. A cultura foi incubada a 28°C, sob agitação orbital de 150 rpm por 96 h.

Para monitorar o crescimento do microrganismo, a cada 24 h amostras do meio D fermentado foram filtradas usando membrana de nylon (120 F), lavando-se com água destilada gelada. Após filtração foram analisados: consumo de proteínas totais, pH a partir do líquido metabólico; e a biomassa microbiana. A biomassa de *C. elegans* peneirada em membrana de nylon foi submetida a liofilização, maceração e pesagem da biomassa seca.

O consumo de proteínas totais foi determinado a partir do método colorimétrico (Lab-Test Diagnóstica). O espectrofotômetro digital utilizado foi o Spectronic Genesys 2 e a absorbância foi determinada a 545 nm. A avaliação do pH foi realizada por potenciometria (Potenciômetro digital Quimis Mod. 400 A).

### ***Efeito da quitosana no crescimento radial do fungo fitopatogênico***

O ensaio foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Ambiental do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, com a finalidade de avaliar o efeito da quitosana no crescimento micelial do fungo fitopatogênico *Pythium*, utilizando a quitosana de crustáceo proveniente da Sigma (grau de desacetilação de 90%).

A quitosana foi dissolvida em ácido acético 0,5%, com pH ajustado para 5,6 com NaOH a 1 %, e incorporado ao meio de cultura BDA nas concentrações finais de 0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 mg de quitosana por mL de BDA, metodologia modificada de (Di Piero e Garda, 2008).

Além do tratamento de controle absoluto, ou seja, placas de Petri apenas com BDA, foi utilizado um controle relativo Q 0 mg/mL, que foram, placas de Petri com o mesmo volume de ácido acético 0,5%, presente nos tratamentos com gel de quitosana, misturado ao BDA. O gel de quitosana e o meio BDA foram autoclavados (120 °C, por 15 min) separadamente, combinados após a autoclavagem, e vertidos para as placas de Petri, sendo que todos os tratamentos apresentaram pH 5,6. O volume de ácido necessário para dissolver a quitosana foi mantido constante em todos os tratamentos que o apresentaram,

para influenciar o mínimo possível no crescimento dos fungos. As placas foram incubadas em câmara BOD mantida a 28 °C. O diâmetro de todas as colônias foi medido 20 e 30 h após repicagem em placa de Petri. Sendo que até esse período foi finalizada as medições devido a colônia com a maior velocidade de crescimento ter atingido a extremidade da placa.

O ensaio em laboratório foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, e os dados submetidos à análise de variância pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade utilizando o Programa Assisat (Silva e Azevedo, 2002).

## **Resultados e discussão**

### ***Crescimento e características de Cunninghamella elegans***

O perfil de crescimento de *C. elegans* (UCP 542) durante 96 horas no meio BD mostra um aumento rápido da produção de biomassa até 48 horas de crescimento (Figura 2), situação semelhante à encontrada por Stamford et al. (2007) utilizando o mesmo microrganismo, Synowiecky e Al-Khateeb (1997) utilizando *Mucor rouxii* e Franco et al. (2004) trabalhando com *C. elegans* (IFM 46109). Os resultados apresentados evidenciam maior produção de biomassa (6,0 g/L) com 96 horas de crescimento. Apesar de o rendimento ser inferior aos apresentados por Franco et al. (2004) e Stamford et al. (2007), que obtiveram os rendimentos de 11,6 g/L para *C. elegans* (IFM 46109) e 20,4 g L<sup>-1</sup> para *C. elegans* (UCP 542), respectivamente, as suspensões esporícas utilizadas (10<sup>6</sup> e 10<sup>8</sup> esporos mL<sup>-1</sup>) foram superiores a utilizada no presente trabalho (10<sup>5</sup> esporos mL<sup>-1</sup>).

O consumo de proteínas totais durante o crescimento de *C. elegans* mostram um decréscimo nas concentrações do tempo zero até 24 horas; e após as 48 horas de cultivo (Figura 3), evidenciando a utilização dos substratos pelo microrganismo.

Verifica-se um aumento na quantidade de proteínas totais entre 24 e 48 horas de incubação. De acordo com Amorim et al. (2001) esse aumento de proteínas totais, provavelmente é devido à produção de compostos nitrogenados originados do metabolismo secundário do microrganismo.

O pH do meio BD oscilou entre 5,0 e 6,0 durante o tempo de crescimento de *C. elegans*. O valor de pH diminui acentuadamente nas primeiras 24 horas, permanecendo em torno de pH 5,0 e 6,0 durante as 96 horas de cultivo. Amorim et al. (2001) sugere que a

queda de pH durante as 24 horas seja devido a alta troca metabólica com o substrato do meio e a liberação de íons da célula fúngica (Figura 4).

### ***Efeito da quitosana no crescimento radial de Pythium***

Observou-se diferença significativa no crescimento do fungo fitopatogênico *Pythium* em função das diferentes concentrações de quitosana, comparando com o controle só com BDA, e ao tratamento com BDA mais ácido acético 0,5% (Tabela 1). O fungo *Pythium* demonstrou sensibilidade a partir da concentração 0,50 mg mL<sup>-1</sup> de quitosana, e não apresentou crescimento micelial no tratamento com 2,0 mg mL<sup>-1</sup>.

O *Pythium* demonstrou sensibilidade ao ácido acético, com crescimento micelial em torno de 33 %, diferindo significativamente ( $P < 0,05$ ) do controle, que apresentou crescimento de 100 % de crescimento. Os tratamentos com quitosana apresentaram maior redução do crescimento micelial, sem mostrar crescimento nas concentrações Q 3, Q 4, Q 5, Q 6.

Nos trabalhos de El Ghaouth et al. (1991), Di Piero e Garda (2008) e Berger (2010), a quitosana pode apresentar propriedades fungicidas, semelhante ao observado neste trabalho. Laflamme et al. (1999) observando o efeito fungicida da quitosana concluíram que a quitosana mesmo não reduzindo em 100% o crescimento do fungo, pode ser uma alternativa potencial contra fitopatógenos, por oferecer mais tempo para a planta elaborar suas estratégias de defesa.

Embora, o mecanismo exato pelo qual a quitosana exerce sua atividade antifúngica ainda não tenha sido esclarecido, algumas hipóteses têm sido sugeridas. Singh et al. (2008) relata que a quitosana induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células dos fungos causando estresse oxidativo, e conseqüentemente, danos aos principais componentes da célula (proteínas, lipídios, DNA e outros). De acordo com Di Piero e Garda (2008) e Laflamme et al. (1999) outra hipótese seria que a quitosana, por apresentar alta massa molecular e cargas positivas, pode interferir com os resíduos das macromoléculas carregadas negativamente quando expostas sobre a superfície celular fúngica, e dessa forma, modificar a permeabilidade da membrana plasmática. Conseqüentemente, esta interação poderia provocar desbalanço osmótico e pronunciada desorganização celular. Além dessas hipóteses, Laflamme et al. (1999) também sugere que a quitosana poderia interagir com o DNA da célula fúngica e alterar sua conformação, inibindo a síntese de mRNAs e proteínas.

A quitosana apresenta propriedades antifúngicas contra o fungo fitopatogênico *Pythium*, entretanto, mais estudos são necessários para comprovar a eficácia deste polímero e sugeri-lo como uma alternativa para o controle de fungos fitopatogênicos.

### **Conclusões**

Foi comprovada “*in vitro*” a inibição do fitopatógeno *Pythium*, quando aplicada a quitosana nas maiores concentrações, sendo obtidos os melhores resultados com concentração a partir de 0,5 mg mL<sup>-1</sup>, especialmente com adição de 2 mg mL<sup>-1</sup>.

Houve redução no pH do meio com *C. elegans*, entretanto, não foram observados valores abaixo de 5,8 que possam vir a prejudicar o desenvolvimento de culturas tropicais, na utilização do Bioprotetor (PNPK).

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Apoio e Tecnologia do estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro para a pesquisa e pelas bolsas concedidas.

### **Referências Bibliográficas**

Amorim, R.V. S.; Pedrosa, R.P.; Martínez, C.R.; Ledingham, W.M; Fukushima, K.; Campos-Takaki, G.M. Carbon Sources from Sugar Cane Process for Submerged Cultivation of *Cunninghamella bertholletiae* to Produce Chitosan. *Food Technol. Biotechnol.* 44: 519–523, 2006.

Amorim, R.V.S.; Souza, W.; Fukushima, K.; Campos-Takaki, G.M. 2001. Faster Chitosan Production by Mucoralean Strains in Submerged Culture. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32:20-23.

Benhamou, N. Elicitor - induced plant defense pathways. *Trends in Plant Science*, 1: 233-240, 1996.

Berger, L.R.R. Efeito da quitosana e do biofertilizante-bioBioprotetor na murcha-de-fusário em caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp). 2010. 74p. (Dissertação de Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

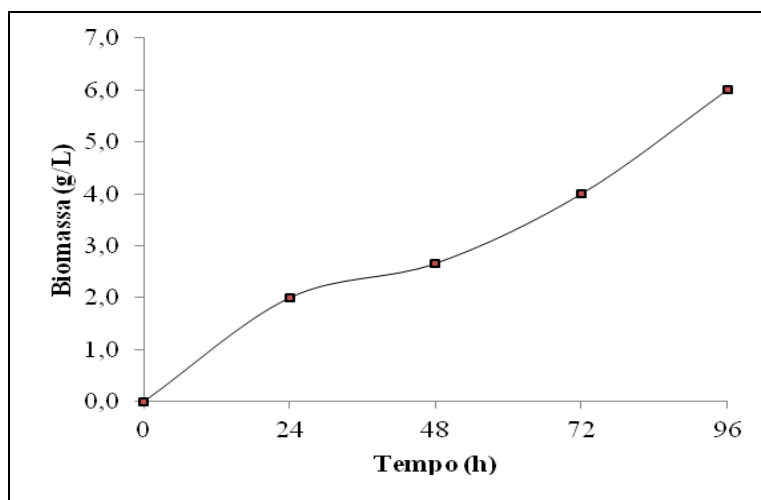
Di Piero, R.M.; Garda, M.V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 43: 1121-1128, 2008

- El Ghaouth, A. E.; Arul, J.; Grenier, J., Asselin, A. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathology*, 82: 398-402. 1991.
- Franco, L.O.; Stamford, T.C.M.; Stamford, N.P.; Campos-Takaki, G.M. *Cunninghamella elegans* como fonte de quitina e quitosana. *Analytica*, 13, 52-56. 2004.
- Grigoletti Junior, A., Santos, A. F., Auer, C.G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. *Floresta*, 30: 155–165. 2000.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalpers, J.A. *Dictionary of the Fungi*. CABI Europe, Wallingford. 2008.
- Laflamme, P.; Benhamou, N.; Bussieres, G., Dessureault. Differential effect of chitosan on root rot fungal pathogens in forest nurseries. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 77:1460-1468. 1999.
- Menezes, M.; Assis, S.M.P. Guia prático para fungos fitopatogênicos. 2º Edição, Recife, Imprensa Universitária, UFRPE, 2ª ed. 2004.
- Morandi, M.A.B., Bettiol, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. *In: Bettiol, W. ; Morandi, M.A.B. (eds.). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna. 2009.
- Owen-Going, N., Sutton, J.C., Grodzinsk, B. Relationships of *Pythium* isolates and sweet pepper plants in single-plant hydroponic units. *Canadian Journal of Plant Pathology* 25: 155–167. 2003.
- Silva, F. de A.S.E.; Azevedo, C.A.V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 4: 71-78,2002.
- Singh, T.; Vesentini, D.; Singh, A. P.; Daniel, G. 2008. Effect of chitosan on physiological, morphological, and ultrastructural characteristics of wood-degrading fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62:116-124.
- Slininger, P.J., Behle, R.W., Jackson, M.A., Schiler, D.A. Discovery and development of biological agents to control crop pests. *Neotropical Entomology* 32: 183–195. 2003.
- Stamford, T.C.M.; Stamford, T.L.M.; Stamford, N.P.; Neto, B.B.; Campos-Takaki, G.M.(2007) Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10:1-8.
- Synowiecki, J. Al-Khatteb, N.A.A.Q. Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. *Food Chemistry*, 60: 605-610, 1997.

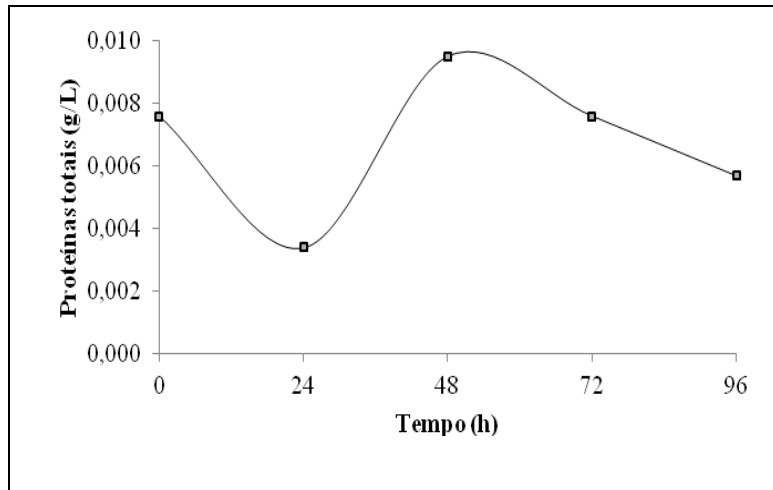




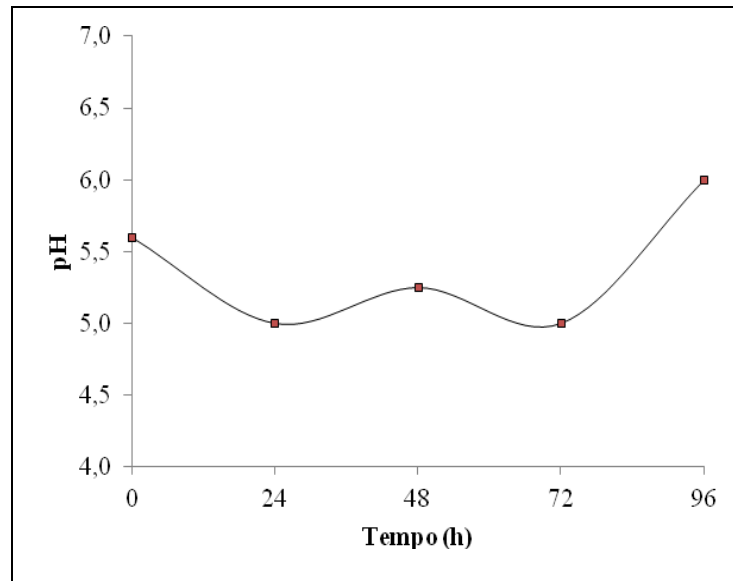
Figura 1. *Pythium* em meio BDA



**Figura 2.** Rendimento da biomassa de *Cunninghamella elegans* durante o crescimento.



**Figura 3.** Consumo de Nitrogênio durante o crescimento do *Cunninghamella elegans*.



**Figura 4.** Perfil do pH do meio durante o crescimento do *Cunninghamella elegans*

**Tabela 1.** Efeito de diferentes concentrações de quitosana no crescimento micelial (%) do fungo patogênico *Pythium* isolado da área do experimento em campo.

Tratamentos <sup>(1)</sup>	Tempo de crescimento micelial (h)		
	0	20	30
Controle (BDA)	0 a	68 a	100 a
Q 0 Ac +BDA	0 a	16 b	33 b
Q 0,5 Ac + BDA	0 a	8 bc	16 c
Q 1,0 Ac+BDA	0 a	17 b	34 b
Q 2,0 Ac 2%+BDA	0 a	0 c	0 d
Q 3,0 Ac 3%+BDA	0 a	0 c	0 d
Q 4,0 Ac 4%+BDA	0 a	0 c	0 d
Q 5,0 Ac 5%+BDA	0 a	0 c	0 d
Q 6,0 Ac 6%+BDA	0 a	0 c	0 d

<sup>(1)</sup> Controle = BDA (meio Batata Dextrose Ágar); Q = concentração de quitosana (mg mL<sup>-1</sup>); Ac = concentração de ácido acético (0,5%).

<sup>(2)</sup> Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

### **CAPÍTULO III**

#### **Eficiência do biofertilizante e do bioprotetor na alface e em atributos do solo**

Artigo enviado para a **Revista Brasileira de Ciência do solo**

## EFICIÊNCIA DE BIOFERTILIZANTE BIOPROTETOR NA ALFACE E EM ATRIBUTOS DO SOLO

### RESUMO

Biofertilizante misto (BNPK) produzido com matéria orgânica e rochas com P e K e o Bioprotetor com quitosana fúngica (PNPK) podem ser alternativa para substituição ao fertilizante convencional (FNPK). O trabalho teve como objetivo avaliar a influência da aplicação do BNPK e do PNPK em substituição a fertilizante solúvel convencional (FNPK) avaliando a produtividade e aspectos nutricionais, da alface em dois cultivos consecutivos, e alguns atributos químicos de um Latossolo. O experimento em campo foi realizado na Estação Experimental Luiz Jorge da Gama Wanderley do Instituto de Pesquisa Agronômica de Pernambuco – IPA, no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil. O delineamento experimental foi em parcelas subdivididas, no esquema fatorial 8x2, com 8 tratamentos de fertilização e 2 sub tratamentos (com e sem aplicação foliar de quitosana de camarão), com quatro repetições. Os tratamentos de fertilização foram: (1) FNPK aplicada na dose recomendada (DR) para alface; (2) BNPK 50 % DR; (3) BNPK 100 % DR; (4) BNPK 150 % DR; (5) PNPK 50 % DR; (6) PNPK 100 % DR; (7) PNPK 150 % DR; (8) Controle (estrupe de curral 2.4 L planta<sup>-1</sup>). Os teores de N, P e K na alface no primeiro ciclo mostraram redução quando aplicadas doses mais elevadas, provavelmente por efeito do aumento na acidez do solo. Os melhores resultados foram obtidos com aplicação de BNPK na dose recomendada e o controle apresentou os menores resultados. Os resultados da análise de N total, P e K disponível no solo mostraram o efeito positivo da adição de BNPK e de PNPK, sendo normalmente mais elevados em comparação com o FNPK e com o controle com adição de matéria orgânica. Os efeitos da aplicação de quitosana via foliar não foram avaliados tendo em vista que não ocorreu presença de fitopatógenos. Os resultados mostram que BNPK e PNPK são alternativas viáveis em substituição aos fertilizantes convencionais (FNPK).

**Termos de indexação:** *Lactuca sativa*, *Cunninghamella elegans*, adubação orgânica, biofertilizante de rochas, nutrição mineral, produtividade agronômica

## **SUMMARY: EFFECTIVENESS OF BIOFERTILIZER BIOPROTECTOR ON LETTUCE AND IN SOIL ATTRIBUTES**

*The mixed biofertilizers (NPKB) produced from organic matter and powdered rocks with P and K and the protector with fungi chitosan (NPKP) should be alternative for conventional fertilizers (NPKF). The aim of the study was evaluate the effects of BNPK and PNPk application as alternative in substitution of soluble commercial fertilizer (NPKF) on the agronomic characteristics of lettuce and in some chemical properties of an Oxissol. A field experiment was carried out at the Experimental Station of Horticulture of the Institute of Agronomic Research of Pernambuco (IPA), located in the District of Vitoria de Santo Antão, Pernambuco, Brazil. The study was conducted in a randomized split-plot design in a factorial 8x2, with 8 fertilization treatments and 2 sub treatments (with and without foliar application of chitosan from shrimps), with four replicates. The fertilization treatments were: (1) FNPk in recommended rate (RR) for lettuce in Pernambuco State; (2) Biofertilizer (BNPK) 50 % RR; (3) BNPK 100 % RR; (4) BNPK 150 % RR; (5) Protector (PNPK) 50 % RR; (6) PNPk 100 % RR; (7) PNPk 150 % RR; (8) Control (farmyard manure - 2.4 L plant<sup>-1</sup>). The total level of N, P and K in lettuce increased with the fertilizers treatments applied. The best results for plant characteristics were found with BNPK in the recommended rate and the control present the lowest result. The lettuce characteristics showed best results when applied BNPK and PNPk followed by NPKF. The soil results showed an increase of total N and available P and K with NPKB and NPKP compared with NPKF and the control treatment (farmyard manure). The effects of chitosan by foliar application was not evaluated because do not occurred phytopatogenic microorganisms. By the experimental results it was observed that the biofertilizer BNPK and the protector PNPk are alternatives for substitution of commercial fertilizers (FNPk).*

*Index terms:* *Lactuca sativa, Cunninghamella elegans, mineral nutrition, organic fertilization, rock biofertilizers, yield of lettuce*



## INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma cultura de grande importância econômica. O consumo desta hortaliça faz parte de uma dieta constante e equilibrada na mesa do consumidor, já que a população está cada dia mais convencida da necessidade de uma alimentação saudável que está diretamente relacionada com a agricultura orgânica sustentável, inserida na utilização de produtos orgânicos, incluindo o uso de resíduos e de microrganismos benéficos para o ambiente e para a cultura (Mello et al., 2003).

A alface é extremamente exigente em nutrientes, principalmente potássio, nitrogênio, cálcio e fósforo. É uma cultura que apresenta lento crescimento inicial, até os 30 dias, quando, então o ganho de peso é acentuado até a colheita. Apesar de absorver quantidades relativamente pequenas de nutrientes, quando comparadas com outras culturas, seu ciclo rápido a torna mais exigente em nutrientes (Filgueira, 2003).

O biofertilizante, produzido a partir de rochas fosfatadas e rochas potássicas, pode ser utilizado como fonte alternativa de P e K para a produção orgânica das plantas. Além de proporcionar aumento na disponibilidade de potássio e de fósforo solúvel no solo e na composição do tecido foliar possui efeito residual em solos cultivados com este produto, devido à participação das bactérias oxidantes de enxofre nativas do solo (Stamford et al., 2008). Essas bactérias atuam na liberação de nutrientes das rochas e minerais existentes nos solos. Na cultura da alface, Lima et al. (2007) obtiveram desempenho dos biofertilizantes com P e K equivalente ao dos fertilizantes minerais e no segundo cultivo houve efeito residual para produtividade da alface (biomassa fresca da parte aérea), altura, número de folhas, avaliação comercial e acumulação de P e K na parte aérea. Araujo & Santos Júnior (2009), também obtiveram efeito residual de P pela aplicação do biofertilizante de rocha inoculado com *Acidithiobacillus*, sendo que a taxa de aplicação do biofertilizante para fornecimento de 160 kg ha<sup>-1</sup> de P mostrou-se como de melhor desempenho no fornecimento de fósforo e desenvolvimento do milho. O biofertilizante proporcionou aumento na disponibilidade fósforo solúvel no solo e na composição do tecido foliar do milho no segundo cultivo.

A agricultura orgânica sustentável também inclui a preocupação com a proteção das plantas contra pragas e doenças, e, atualmente pesquisas com o uso da quitosana, um biopolímero natural que tem propriedades peculiares que ajudam na proteção da planta contra doenças estão sendo intensificadas. De acordo com Otha et al. (2000) a quitosana

além de proporcionar aumento no crescimento da planta devido ao seu conteúdo de nitrogênio, também pode induzir o sistema de defesa da planta.

A quitosana é um heteropolímero natural, composto por unidades  $\beta$ -1,4 D-glucosamina ligadas a N-acetilglucosamina obtido da desacetilação da quitina, que é um polímero natural, insolúvel, linear com o mesmo tipo de unidade manomérica  $\beta$ -1,4 N-acetilglucosamina. A semelhança estrutural é refletida nas funções similares exercidas por esses dois polímeros na natureza, pois ambos atuam como material estrutural e Bioprotetor (Signini, 2002; Campos-Takaki, 2005).

A quitosana apresenta diversas aplicações: absorção de gordura, componentes de cosméticos (esfoliante, hidratante, tratamento de acne), reconstituição óssea, agente bactericida e bacteriostático, coadjuvante na higiene oral (contra células infecciosas nos dentes) e liberação controlada de fármaco (Costa Silva et al., 2006; Laranjeira e Fávere, 2009). Também, a quitosana possui potencial como biofilme para a preservação de frutas e legumes (Fai et al., 2008); como biosorvente para o tratamento de água e efluentes (Janegitz et al., 2007), na remoção de metais pesados, também usada para sanar danos devido ao derramamento de óleo e corantes sintéticos (Airoldi, 2008).

A quitina e quitosana podem ser encontradas nos exoesqueletos de crustáceos, que constituem a fonte tradicional de obtenção; e também na parede celular dos fungos, os quais são considerados uma fonte alternativa de obtenção (Stamford et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi avaliar na cultura da alface a eficiência agrônômica do Biofertilizante e do Bioprotetor, em comparação com os fertilizantes minerais solúveis, sulfato de amônio, superfosfato simples (SFS) e cloreto de potássio (KCl) e com o controle sem adição de N, P e K ( $N_0P_0K_0$ ), bem como para avaliar o desenvolvimento da planta com e sem aplicação de quitosana.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Estação Experimental Luiz Jorge da Gama Wanderley- IPA, localizada na Mesorregião da Mata Pernambucana, em Vitória do Santo Antão - PE, situada na Latitude Sul ( $8^{\circ} 8' 00''$ ) e Longitude Oeste ( $35^{\circ} 22' 00''$ ), a uma Altitude de 146 m. O solo da área era constituído com um Latossolo Vermelho Amarelo distrófico (Embrapa, 2006); cuja análise química da camada arável apresentou: pH 6,1, N total 0,055%, P disponível  $2,7 \text{ mg dm}^{-3}$ , potássio disponível  $10,4 \text{ mg dm}^{-3}$ , Ca trocável  $16 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ , Mg trocável  $4 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ , e Al trocável  $1,6 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ , de acordo com

Embrapa (2009).

Foram realizados dois cultivos consecutivos de alface crespa “cv. Veneranda”, considerados no presente trabalho como ciclo 1 e ciclo 2. O segundo cultivo foi conduzido da mesma forma citada para o primeiro, entretanto não foram aplicados os tratamentos de fertilização com N, P e K, para avaliação do efeito residual.

O experimento foi realizado no delineamento experimental em blocos casualizados (parcelas subdivididas), no fatorial (8x2), com quatro repetições, sendo 8 tratamentos de fertilização e 2 tratamentos com e sem aplicação de quitosana de camarão.

No primeiro plantio foram aplicados os seguintes tratamentos de fertilização: (1) Fertilizante convencional (FNPK) na dose recomendada (DR), de acordo com a recomendação do IPA (2008) para alface irrigada no Estado de Pernambuco; (2) Biofertilizante misto (BNPK) 50% (DR); (3) BNPK (DR); (4) BNPK 150% (DR); (5) Bioprotetor (PNPK) 50% (DR); (6) PNPK (DR); (7) PNPK 150% (DR); (8) tratamento controle sem fertilização com NPK (aplicado estrume de curral, seguindo a recomendação do agricultor local, na dose de 2,4 L por cova. Sendo o estrume de curral com as seguinte característica: 87 % umidade, 0,63 % N, 0,16 % P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 0,44 % K<sub>2</sub>O.

A mistura FNPK foi composta pelos fertilizantes convencionais sulfato de amônio (20% N), superfosfato simples (20% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) e sulfato de potássio (50% K<sub>2</sub>O), seguindo a recomendação do IPA (2008) para alface, sendo o cálculo da quantidade a aplicar realizado de acordo com a análise do solo. Os tratamentos de fertilização foram aplicados por ocasião do transplante das mudas de alface no campo.

O biofertilizante (BNPK) foi obtido a partir do biofertilizante de rochas (BPK) produzido com rocha fosfatada e com rocha potássica, seguindo a metodologia descrita por Stamford et al. (2008), em mistura com matéria orgânica (húmus de minhoca) enriquecida em N pela inoculação com a bactéria diazotrófica de vida livre (NFB 10001), seguindo a metodologia descrita por Lima et al. (2010).

Após a multiplicação do isolado, foi feita a inoculação do húmus de minhoca (MO) em mistura com biofertilizante de rochas (BP+BK) na proporção (MO+BP+PK) equivalente a 4+0,5+0,5. Realizada a mistura por bandeja com capacidade para 6 L adicionou-se 200mL de meio LG contendo o isolado NFB 10001. Em seguida, o material foi homogeneizado com auxílio de uma espátula esterilizada, e realizada a incubação por 40 dias, a temperatura ambiente (28° C ± 2° C). Durante o período de incubação as bandejas foram mantidas com umidade em torno de 80% da retenção máxima, usando água destilada. Foram utilizadas 60 bandejas, sendo produzido no total 360 kg de BNPK, cuja

análise final forneceu: pH 5,9; N total 21 g kg<sup>-1</sup>, P disponível 20 g kg<sup>-1</sup>; e K disponível 19 g kg<sup>-1</sup>.

O pH em água foi determinado utilizando pH metro (modelo DM – 22); o N total analisado por digestão sulfúrica, em analisador automático Kjeltex (modelo 1030); O P e K disponível (extração com a solução Mehlich-1), com o P determinado por colorimetria (espectrofotômetro digital Spectronic Genesys 2), e o K por fotometria de chama.

Para produção do Bioprotetor (PNPK) em bandejas (6L) foi adicionado ao BNPK o fungo *Cunninghamella elegans* (UCP 542). O fungo foi cultivado em meio Batata-Dextrose (BD) em Erlenmeyers de 2000 mL sob agitação a 180 rpm, durante 96 horas, de acordo com a metodologia descrita por Franco (2005). Após a agitação, a massa micelial foi filtrada em membrana de nylon (120F), lavada com água destilada e realizada a secagem em estufa a 35° C. Em seguida a massa micelial seca foi macerada, para a produção da biomassa fúngica, aplicada ao Biofertilizante (BNPK), na proporção de 1 g de biomassa seca por kg de BNPK, para a produção do Bioprotetor (PNPK).

Para instalação do experimento no campo, foram obtidas mudas de alface crespa (cv. “Veneranda”) produzidas em bandejas de isopor (200 células), em casa de vegetação, usando como substrato mistura com 50% de pó de coco, 300 g de pó de rocha e 50% de húmus de minhoca. Diariamente adicionou-se água destilada (através de pesagem) visando manter a umidade próxima da capacidade de campo.

Após 15 dias da semeadura nas bandejas, foi realizado o desbaste e feita adubação com torta de mamona, com aplicação semanal, até as mudas serem transplantadas para o campo. O transplante ocorreu aos 38 dias após a semeadura nas bandejas. As mudas foram conduzidas para o campo no dia posterior a aplicação dos tratamentos nas covas.

Após 7 dias do transplante das mudas de cada ciclo, foi pulverizada nas folhas das plantas, a quitosana de camarão adquirida da Industria Polymar, no Estado do Ceará, Brasil, com 90% de pureza e 95 % de grau de desacetilação, para observar a possível ocorrência natural de doenças fúngicas de raízes.

Foram realizadas capinas, com enxada, sempre que necessárias. O sistema de irrigação utilizado no campo foi pelo sistema de microaspersão, procurando manter a umidade do solo próxima da capacidade de campo, durante todo o desenvolvimento da planta, sem deixar ocorrer excesso de água no solo.

Cada sub parcela, com de 3,24 m<sup>2</sup>, foi constituída por 4 linhas de 2,7 m de comprimento, sendo as mudas distribuídas no espaçamento de 0,30 cm x 0,30 cm, compreendendo 36 plantas por sub parcela. Os sulcos foram abertos mantendo a

declividade de 0,2% a 0,5% visando facilitar o escoamento da água. Como área útil foi considerada a colheita das 14 plantas centrais de cada subparcela.

A colheita de cada ciclo foi realizada 37 dias após o transplante das mudas. Na coleta de cada ciclo foi feita amostragem de 4 plantas por subparcela para determinação de características da alface: produtividade, número e comprimento de folhas, massa fresca e massa seca por pé (cabeça). Para determinação da massa seca, as amostras foram secas em estufa de ventilação forçada ( $65 \pm 1^\circ\text{C}$ ), até peso constante, e em seguida o material foi moído e e, seguida realizada a determinação de N, P e K, de acordo com Malavolta et al. (1989).

O experimento foi conduzido no período entre os meses de dezembro de 2010 a maio de 2011. Após a colheita das plantas, em cada ciclo cultivado, foram retiradas amostras compostas de solo (6 sub amostras por parcela), com coleta de 0-15 cm, e após secagem ao ar e peneiramento (peneira de 2 mm) foram determinados: pH, N total, P e K disponível, seguindo a metodologia da Embrapa (2009).

Os dados obtidos foram analisados usando o programa estatístico SAS versão 9.0 (SAS Institute, 1996), sendo realizada a ANOVA, comparação das médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### ***Características da planta***

Os dados obtidos para a biomassa fresca da parte aérea da alface encontram-se na Tabela 1. Os resultados mostram que houve resposta positiva da fertilização com Biofertilizante misto (BNPK) e com o Bioprotetor (PNPK), na biomassa fresca, quando comparado com o tratamento controle. Observa-se que houve estabilidade com efeito residual para todos os tratamentos com exceção do controle. O tratamento com Bioprotetor PNPK1 mostrou maior estabilidade, observando-se que para esse tratamento os dados apresentam aumento na biomassa fresca da parte aérea no 2º ciclo, em relação ao 1º ciclo.

No primeiro e segundo ciclo observa-se que os biofertilizantes nos níveis usados (50% e 150% da recomendação) obtiveram resultados de biomassa fresca na parte aérea da alface semelhantes ao tratamento com mistura de fertilizantes solúveis aplicado no nível recomendado. O Bioprotetor foi semelhante ao tratamento com fertilizantes solúveis no 2º ciclo. Os tratamentos com menor desenvolvimento da matéria fresca no 1º ciclo foram:

PNPK3 e o controle; e no 2º ciclo BNPK2 e PNPk2. A redução observada para o tratamento com aplicação de doses mais elevadas pode ter sido em função do efeito indireto da acidez promovida pelos biofertilizantes de rochas com P e K pela produção metabólica de ácido sulfúrico (Garcia Júnior, 1991).

Na Tabela 1 são apresentados também os dados para a biomassa seca da parte aérea da alface. Pode ser observada resposta positiva da aplicação do biofertilizante misto (BNPK) e do Bioprotetor (PNPK) na biomassa seca, quando comparado com o tratamento controle (com adição de matéria orgânica) sem fertilização com NPK solúvel.

A largura das folhas e o número de folhas por planta (Tabela 2) não apresentaram diferenças significativas entre tratamentos. Entretanto, pode ser observado que no segundo ciclo houve uma tendência a aumentar o número de folhas, provavelmente devido ao efeito residual dos nutrientes.

Verificou-se que as fertilizações com biofertilizante e bioprotetor contribuíram para o aumento da produtividade da alface (Tabela 3), tendo proporcionado ganhos em biomassa fresca, massa seca, diâmetro médio da parte aérea e de número de folhas por planta. A adubação orgânica possibilita maior autonomia aos produtores em face do comércio de insumos, devido à possibilidade do seu uso de agricultura orgânica, além de ser observado grande efeito residual (Vidigal et al., 1995).

Os teores de N total acumulado na parte aérea da alface (Tabela 4) foram significativamente semelhantes ao FNPk, nos tratamentos BNPK1, BNPK2 e PNPk1, para o primeiro ciclo e PNPk1, BNPK3, para o segundo ciclo, sendo que o tratamento BNPK3 mostrou efeito residual. Provavelmente houve uma interação positiva entre o fornecimento de fósforo no substrato de cultivo, e a absorção de nitrogênio pela alface.

Observa-se na Tabela 4 que os teores de P total na parte aérea das plantas de alface foram significativamente semelhantes ao tratamento com mistura de fertilizantes minerais FNPk, os tratamentos BNPK3 para o primeiro ciclo e BNPK3 e PNPk1. Entretanto para os dois ciclos os valores de P acumulado na parte aérea para o BNPK3 (86,8 e 86,5 kg ha<sup>-1</sup>, respectivamente primeiro e segundo ciclo) foram maiores que os valores de FNPk (85,7 e 83,6 kg ha<sup>-1</sup>) respectivamente para o primeiro e segundo ciclo.

Os teores de K total acumulados na parte aérea do tratamento BNPK3 foram significativamente semelhantes ao FNPk, no primeiro ciclo, e significativamente maior que o tratamento FNPk, no segundo ciclo. Entretanto, os valores obtidos para o FNPk (356,9 e 482,9 kg ha<sup>-1</sup>, respectivamente primeiro e segundo ciclo) foram menores que BNPK3 (370,6 e 549,1 kg ha<sup>-1</sup>), correspondentes ao primeiro e segundo ciclo).

Estes resultados evidenciam a maior disponibilidade de N, P e K total no substrato que recebeu o biofertilizante na dose uma vez e meia a recomendada, enriquecida com bactéria diazotrófica de vida livre e biofertilizante de rocha fosfatada e potássica.

Resultados semelhantes foram obtidos em experimentos de campo descritos por Stamford et al. (2011) trabalhando com uva no vale do São Francisco, e por Oliveira (2011) em características do melão no sudoeste da Bahia. Em experimento conduzido por Berger (2010) em casa de vegetação foi avaliada em caupi a eficiência agrônômica de BNPK e PNPk em comparação com FNPK e foram encontrados resultados corroborando com os encontrados para alface.

Moura et al. (2007) na avaliação comercial do meloeiro no Vale do São Francisco, Lima et al. (2007) com alface no vale do Cariri cearense, e Stamford et al. (2006) com cana de açúcar na Zona da Mata de Pernambuco, mostraram o efeito da aplicação de biofertilizante de rocha fosfatada (BP) e de rocha potássica (BK), em comparação com fertilizantes convencionais. Nestes trabalhos também se observou efeito de redução quando aplicadas as doses mais elevadas, provavelmente em função do aumento da acidez devido ao uso de biofertilizante de rochas que possui reação ácida.

### ***Efeitos da fertilização em atributos do solo***

Os resultados da análise do solo com os diferentes tratamentos de fertilização são apresentados nas tabelas 5, 6, 7 e 8. Verifica-se que houve diferença significativa do tratamento BNPK3, no primeiro ciclo e BNPK1, BNPK2 e PNPk3.

Na primeira colheita o N total apresentou valores mais altos com aplicação do BNPK no nível mais elevado, e, de uma maneira geral, observou-se redução no N total na segunda colheita em relação à primeira, provavelmente em função da retirada de nutrientes pela alface no primeiro cultivo.

No primeiro ciclo o P disponível foi mais elevado com aplicação do PNPk no nível mais elevado. De uma maneira geral os melhores resultados foram obtidos no 1º ciclo, e houve redução no 2º ciclo, provavelmente, também em função da retirada de nutrientes pela alface no 1º ciclo.

Lima et al. (2007), em experimento com alface utilizando biofertilizante de rocha fosfatada e potássica verificaram que houve efeito da fertilização com P e K, no P disponível no solo, com efeitos residuais positivos, evidenciados no 2º ciclo.

Stamford et al. (2005) observaram efeito positivo do fosfato natural de Gafsa com adição de S inoculado com *Acidithiobacillus* no P disponível no solo cultivado com sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia*), tendo sido considerado que no solo ocorrem bactérias nativas que realizam a oxidação do enxofre elementar, promovendo solubilização do P contido nas rochas.

Em pimentão, Nannetti (2001) verificou também aumento no teor de P disponível no solo, com o aumento no fornecimento de nitrogênio, associado ao nível mais baixo de potássio. Para a autora, esse fato deve ter ocorrido devido ao sinergismo existente entre o nitrogênio e o fósforo. Resende (2004) também observou aumentos significativos nos teores de fósforo quando utilizadas doses mais elevadas de nitrogênio.

A resposta para K disponível foi menos significativa. No 1º ciclo, com melhores resultados obtidos com aplicação de BNPK3 e FNPK, e, de uma maneira geral, houve redução na 2ª colheita, provavelmente em função da maior retirada de nutrientes pela alface no 1º ciclo. Resultados semelhantes foram observados por Lima et al. (2007). Os autores observaram a ausência de efeito residual (2º ciclo) para os biofertilizantes com P e K, também justificada pela diferença no teor de K<sub>2</sub>O solúvel.

Quanto ao efeito da aplicação de quitosana de camarão via foliar, não foi possível a avaliação, tendo em vista que não houve ocorrência de fitopatógenos radiculares durante o período experimental, por motivo de não ter sido adicionado o patógeno na área experimental. Assim, cada subparcela foi considerada como mais uma repetição para fins de análise estatística, em função de não ter ocorrido diferença nos resultados dentro do mesmo tratamento de fertilização.

## CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e nas condições em que foi realizado o experimento, conclui-se que a utilização do biofertilizante (BNPK) e do bioprotetor (PNPK) aumenta a produção da alface e os produtos podem ser aplicados como fonte alternativa em substituição a fertilizantes solúveis.

O tratamento BNPK3 foi o que mostrou maior produção e maior acúmulo de nutrientes na parte aérea e no solo tanto no primeiro como no segundo ciclo da alface, e apresenta potencial de maior efeito residual, mantendo nível adequado de nutrientes no solo.



## LITERATURA CITADA

- AIROLDI, C.A. A relevante potencialidade dos centros básicos nitrogenados disponíveis em polímeros inorgânicos e biopolímeros na remoção catiônica. *quim. nova*, 31:144-153, 2008
- ARAUJO, F.F.; SANTOS JÚNIOR, J.D. Desenvolvimento e nutrição de milho em solo degradado biofertilizado com fosfato natural, enxofre e *Acidithiobacillus*. *Caatinga*, 22:98-103, 2009.
- BERGER, L. R. R. Efeito da quitosana e do biofertilizante bioBioprotetor na murcha-defusário em caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp). 2010, 75f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.
- CAMPOS-TAKAKI, G.M. The versatility on copolymers chitin and chitosan production. In: DUTTA, P. K. Chitin and chitosan opportunities & challenges. India. 2005.
- CAVALCANTI, F. J. de A. Recomendações de adubação para o Estado de Pernambuco (2ª Aproximação), IPA, 1998. 198 p. Ilust.
- COSTA SILVA, H.S.R.; SANTOS, K.S.C.R. DOS; FERREIRA, E.I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Quim. Nova*, 29: 776-785, 2006.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema brasileiro de classificação de solos. 2.ed. Rio de Janeiro, 2006. 306p.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Manual de Análises Químicas de Solo, Plantas e Fertilizantes. 2ª ed. rev. ampl. – Brasília, DF: Embrapa Informações Tecnológicas, 627p., 2009.
- FAI, A.E.C.; STAMFORD T.C.M.; STAMFORD, T.L.M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. *Rev. Iberoamer. Polímeros*, 9:435-451, 2008.
- FILGUEIRA, F. A. R. 2003. Novo manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2. ed. Viçosa: Editora UFV. 412p.
- FRANCO, L.O.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, N.P.; CAMPOS - TAKAKI, G.M. *Cunninghamella elegans* como fonte de quitina e quitosana. *Analytica*, 13, 52-56, 2005.
- JANEGITZ, B.C.; MARCOLINO JUNIOR, L.H.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação voltamétrica por redissolução anódica de cu(ii) em águas residuárias empregando um eletrodo de pasta de carbono modificado com quitosana. *Quim. Nova*, 30:1673-1676, 2007
- LARANJEIRA, M.C.M.; FÁVERE, V.T. de. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Quim. Nova*, 32:672-678, 2009

- LIMA RCM; STAMFORD NP; SANTOS CERS; LIRA JÚNIOR MA; DIAS SH. Eficiência e efeito residual de biofertilizantes de rochas com PK e enxofre com *Acidithiobacillus* em alface. Horticult. Bras. 25: 402-407, 2007.
- LIMA, F.S.; STAMFORD, N.P.; SOUSA, C.S.; LIRA JUNIOR, M.A.; MALHEIROS, S.M.M.; VAN STRAATEN, P. Earthworm compound and rock biofertilizer enriched in nitrogen by inoculation with free living diazotrophic bacteria. World J. Microbiol. Biotechnol. 27:1-7, 2010.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, A.S. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. 201p., 1989.
- MELLO, J.C.; DIETRICH, R.; MEINERT, E.M.; TEIXEIRA, E.; AMANTE, E.R. Efeito do cultivo orgânico e convencional sobre a vida-de-prateleira de alface americana (*Lactuca sativa* L.) minimamente processada. Ci. Tecnol. Alim. 23: 418-426, 2003.
- NANNETTI, D.C. Nitrogênio e potássio aplicados via fertirrigação na produção, nutrição e pós-colheita do pimentão. Lavras: 2001. 184p. (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- OHTA, K.; ATARASHI, H.; SHIMATANI, Y.; MATSUMOTO, S.; ASAO, T.; HOSOKI, T. Effects of Chitosan with or without Nitrogen Treatments on Seedling Growth in *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. 'Kairyoku Wakamurasaki'. Japan Soc. Hort. Sci. 69:63-65, 2000.
- OLIVEIRA, A. E. S.; SÁ, J. R.; MEDEIROS, J. F.; NOGUEIRA, N. W.; SILVA, K. J. P. Interação da adubação organo-mineral no estado nutricional das plantas. **Revista Verde**. Mossoró – RN, v.5, n.3, p. 53 - 58 julho/setembro de 2010.
- RESENDE, G.M. Características produtivas, qualidade pós-colheita e teor de nutrientes em alface americana (*Lactuca sativa* L.) sob doses de nitrogênio e molibdênio, em cultivo de verão e de inverno. Lavras: 2004. 134p. (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- SAS INSTITUTE Inc. Sas's user guide. Version 6.12 edition. Cary, NC, SAS Institute Inc., 1996.
- SIGNINI, R. Estudo das relações estruturas/propriedades de quitina e quitosana, 2002. Tese (Doutorado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos-USP- São Paulo.
- STAMFORD, N.P.; IZQUIERDO, C. G.; FERNÁNDEZ, M.T.H. ; MORENO, M. DEL C.M. Biofertilizantes de rochas fosfatadas e potássicas com enxofre e *Acidithiobacillus*. In: Figueiredo, M. DO V.B.; Burity, H.A.; Stamford, N.P.; Santos, C.E. DE R. E S. (Ed.). Microorganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura. Guaíba: Agrolivros, 2008, p-401-421.
- STAMFORD, N.P., ANDRADE, I.P., SILVA JUNIOR, S., SANTOS, C. E.R.S., LIRA JÚNIOR, M.A., FREITAS, A.D.S., STRAATEN, V. P. Nutrient uptake by grape in a Brazilian soil affected by rock biofertilizer. J. Soil Sci. Plant Nutr. 11, 1 - 9, 2011.

- STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, T.L.M.; FRANCO, L. DE O. 2008. Produção, propriedades e aplicações da quitosana na agricultura e no ambiente. In: Figueiredo, M. do V.B.; Burity, H.A.; Stamford, N.P.; Santos, C.E. de R. e S. (Org.). Microbiologia e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura. 1 ed. São Paulo: Editora Agro livros. p.483-502.
- STAMFORD, N.P., ANDRADE, I.P., SILVA JUNIOR, S., SANTOS, C. E.R.S., LIRA JÚNIOR, M.A., FREITAS, A.D.S., STRAATEN, V. P. Nutrient uptake by grape in a Brazilian soil affected by rock biofertilizer. J. Soil Sci. Plant Nutr. 11, 1 - 9, 2011.
- VIDIGAL, S. M.; RIBEIRO, A.C.; CASALI, V.W.D.; FONTES, L.E.F. Resposta da alface (*Lactuca sativa* L.) ao efeito residual da adubação orgânica: I. Ensaio de campo. Rev. Ceres, 42:80-88, 1995

**Tabela 1.** Biomassa fresca e biomassa seca da alface em Latossolo Vermelho Amarelo, submetida a diferentes fontes de fertilização, em dois ciclos consecutivos.

Fertilização	Biomassa fresca		Biomassa seca	
	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 1	Ciclo 2
	g planta <sup>-1</sup>		g planta <sup>-1</sup>	
Biofertilizante BNPK1	212,7aA	145,0aB	11,0a	10,7a
Biofertilizante BNPK2	178,5cA	133,9cB	10,2a	11,0a
Biofertilizante BNPK3	211,4aA	153,3aB	9,6ab	9,2b
Bioprotetor PNPK1	195,0bA	166,2aA	9,7ab	11,6a
Bioprotetor PNPK2	187,9bA	133,7cB	9,7ab	9,8b
Bioprotetor PNPK3	156,0dA	127,5cA	10,6a	10,5a
Fertilizante FNPk	218,7aA	151,6aB	8,9b	11,4a
Controle (sem NPK)	152,4dA	116,8dB	8,1b	10,1a
CV %	13	11	9	7
DMS	23,8	15	0,9	0,8

Médias com a mesma letra minúscula para fertilização (coluna) e maiúscula para ciclos (linhas) não diferem no teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabela 2.** Largura das folhas e nº de folhas de alface em Latossolo Vermelho Amarelo, submetida a diferentes fontes de fertilização, em dois cultivos consecutivos.

Fertilização	Largura das folhas		Nº de folhas	
	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 1	Ciclo 2
	g planta <sup>-1</sup>		g planta <sup>-1</sup>	
Biofertilizante BNPK1	33,1 <sup>a</sup>	28,7a	26a	26b
Biofertilizante BNPK2	29,8b	26,2a	24a	28ab
Biofertilizante BNPK3	32,0a	28,8a	26a	27b
Bioprotetor PNPK1	31,6 <sup>a</sup>	28,2a	25a	31a
Bioprotetor PNPK2	30,5 <sup>a</sup>	26,3a	25a	26b
Bioprotetor PNPK3	29,1b	25,0a	24a	28ab
Fertilizante FNPK	32,0a	28,6a	27a	30a
Controle (sem NPK)	26,4b	29,6a	24a	27b
CV %	6	6	5	6
DMS	2,0	1,5	1,2	1,6

Médias com a mesma letra minúscula para fertilização (coluna) e maiúscula para ciclos (linhas) não diferem no teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabela 3.** Produtividade e Peso de biomassa fresca na área útil da alface em Latossolo Vermelho Amarelo, submetida a diferentes fontes de fertilização, em dois ciclos consecutivos.

Fertilização	Produtividade		Biomassa da área útil	
	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 1	Ciclo 2
	t ha <sup>-1</sup>		kg planta <sup>-1</sup>	
Biofertilizante BNPK1	15,7bA	16,4abA	2,15aA	2,11aA
Biofertilizante BNPK2	14,8bB	17,1abA	1,85bB	2,24aA
Biofertilizante BNPK3	16,4aB	18,3aA	2,06aB	2,31aA
Bioprotetor PNPk1	16,2aA	16,6abA	2,08aA	2,09aA
Bioprotetor PNPk2	13,8bA	14,6bA	1,74bA	1,99aA
Bioprotetor PNPk3	14,2bB	16,7abA	1,81bB	2,14aA
Fertilizante FNPk	17,7aA	18,0aA	2,50aA	2,28aA
Controle (sem NPK)	14,0bA	14,3bA	1,78bA	1,50bB
CV %	8	8	12	12
DMS	1,3	1,4	0,2	0,2

Médias com a mesma letra minúscula para fertilização (coluna) e maiúscula para ciclos (linhas) não diferem no teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabela 4.** N, P e K total acumulado na parte aérea da alface em Latossolo Vermelho Amarelo, submetida a diferentes fontes de fertilização, em dois ciclos consecutivos.

Fertilização	N total acumulado		P total acumulado		K total acumulado	
	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo
	kg ha <sup>-1</sup>					
Biofertilizante BNPK1	420,9aA	389,0bB	65,7bB	76,7bA	331,8bB	471,4bcA
Biofertilizante BNPK2	434,4aA	397,6bB	62,0bB	78,9bA	295,5dB	489,8bA
Biofertilizante BNPK3	357,1bB	445,8aA	86,8aB	96,5aA	370,6aB	549,1aA
Bioprotetor PNPk1	407,3aA	408,9aA	71,9bA	87,8aA	334,0bB	472,6bA
Bioprotetor PNPk2	361,3bA	348,0cA	53,9cB	75,2bA	304,4cB	416,3cdA
Bioprotetor PNPk3	394,2bA	377,6bA	64,5bB	79,2bA	295,1dB	448,0cA
Fertilizante FNPk	492,0aA	414,9aB	85,7aA	83,6aA	356,9aB	482,9bA
Controle (sem NPK)	327,4bA	332,1cA	57,7cA	66,2cA	307,1cB	369,8dA
CV (%)	12	9	17	11	8	11
DMS	48,5	34,3	11,4	8,5	26,8	49,7

Médias com a mesma letra minúscula para fertilização (coluna) e maiúscula para ciclos (linhas) não diferem no teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabela 5.** Efeitos dos tratamentos de fertilização no pH do solo em dois ciclos consecutivos com alface

Fertilização	1º ciclo	pH (H <sub>2</sub> O)	2º ciclo
Biofertilizante BNPK1	6,2 bA		6,5 aA
Biofertilizante BNPK2	5,8 cA		6,2 aA
Biofertilizante BNPK3	5,4 cA		6,0 bA
Bioprotetor PNPk1	6,5 abA		6,5 aA
Bioprotetor PNPk2	6,1 bA		6,2 aA
Bioprotetor PNPk3	5,4 cB		6,2 aA
Fertilizante FNPK	6,2 bA		6,5 aA
Controle	6,7 aA		6,7 aA
CV (%)	7,4		3
DMS	0,4		0,2

Médias com a mesma letra minúscula para fertilização (coluna) e maiúscula para ciclos (linhas) não diferem no teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).



**Tabela 6.** Efeitos dos tratamentos de fertilização no N total do solo em dois ciclos consecutivos com alface

Fertilização	1º ciclo	2º ciclo
	N total no solo, g kg <sup>-1</sup>	
Biofertilizante BNPK1	1,8bA	1,5aB
Biofertilizante BNPK2	1,6bA	1,2aB
Biofertilizante BNPK3	2,1aA	0,7cC
Bioprotetor PNPk1	1,6bA	0,7cC
Bioprotetor PNPk2	1,6bA	1,5aA
Bioprotetor PNPk3	1,7bA	1,1bB
Fertilizante FNPK	1,6bA	1,1bC
Controle	1,4bA	0,8cB
CV (%)	12	27
DMS	0,2	0,3

Médias com a mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não mostram diferença significativa ( $p \leq 0.05$ ) pelo teste de Tukey, para os diferentes fertilizantes e para as colheitas, respectivamente.

**Tabela 7.** Efeitos dos tratamentos de fertilização no P disponível do solo em dois ciclos consecutivos com alface

Fertilização	1º ciclo	2º ciclo
	P disponível no solo, mg kg <sup>-1</sup>	
Biofertilizante BNPK1	60,9 bA	28,0 cB
Biofertilizante BNPK2	54,6 bA	36,3 bB
Biofertilizante BNPK3	64,4 bB	50,2 aC
Bioprotetor PNPk1	35,5 cB	27,8 cC
Bioprotetor PNPk2	50,3 bA	42,2 aB
Bioprotetor PNPk3	127,6 aA	21,6 dC
Fertilizante FNPk	36,3 cA	24,3 dB
Controle	12,1 dB	10,1 eB
CV (%)	57	39
DMS	31,6	11,8

Médias com a mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não mostram diferença significativa ( $p \leq 0.05$ ) pelo teste de Tukey, para os diferentes fertilizantes e para as colheitas, respectivamente.

**Tabela 8.** Efeitos dos tratamentos de fertilização no K disponível do solo em dois ciclos consecutivos com alface

Fertilização	1º ciclo	2º ciclo
	K disponível no solo, mg kg <sup>-1</sup>	
Biofertilizante BNPK1	0,26 aB	0,29 aB
Biofertilizante BNPK2	0,20 bA	0,18 bA
Biofertilizante BNPK3	0,29 aA	0,18 bB
Bioprotetor PNPk1	0,21 bA	0,19 bA
Bioprotetor PNPk2	0,20 bA	0,18 bA
Bioprotetor PNPk3	0,21 bA	0,19 bA
Fertilizante FNPk	0,28 aA	0,16 bB
Controle	0,24 abA	0,20 bA
CV (%)	39	19
DMS	0,11	0,04

Médias com a mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não mostram diferença significativa ( $p \leq 0.05$ ) pelo teste de Tukey, para os diferentes fertilizantes e para as colheitas, respectivamente.

## CONCLUSÕES FINAIS

A inoculação com bactéria diazotrófica de vida livre, isolada de solo do estado de Pernambuco, para produção de biofertilizante promove incremento no N total.

A introdução de quitosana como Bioprotetor na agricultura consiste em um campo em expansão. No ensaio de laboratório com quitosana de crustáceo, para avaliar o efeito no crescimento micelial do *Pythium*, foi possível concluir que a atuação para inibição deste fitopatógeno radicular, inicia na concentração  $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ .

O experimento em campo com a cultura da alface evidencia a possibilidade do uso do bioprotetor (PNPK) e do biofertilizante misto (BNPK), para utilização como fonte alternativa em substituição a fertilizantes minerais solúveis, devido ao incremento na produtividade, e, especialmente, no aumento dos teores de nutrientes no solo.