

Produção de mudas de alface (*Lactuca sativa* L.) em presença de diferentes fontes fosfatadas e microrganismos solubilizadores de fosfatos

Lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedling production with different sources of phosphate and phosphate solubilizing microorganisms

Luciano Alves^{2*}; Germano Nunes Silva Filho³

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de microrganismos solubilizadores de fosfatos (fungos: 310A, 061, 062 e 251; bactérias: 163, 160 e 161) na promoção da nutrição e crescimento de mudas de alface (*Lactuca sativa* L.), cultivadas em bandejas com substrato esterilizado e adubadas com fontes fosfatadas. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, arranjo fatorial 4 x 8 (quatro tratamentos de adubação fosfatada e oito tratamentos de inoculação microrganismos solubilizadores de fosfatos) com quatro repetições por isolado. Cada repetição foi constituída de 10 células. Aos 35 dias de cultivo, as plantas foram colhidas avaliando-se a matéria seca, porcentagem de P e P total da parte aérea. A fonte superfosfato triplo (SFT) mostrou-se superior as demais, incluindo o tratamento testemunha em todos os parâmetros analisados. Na produção de matéria seca, foi observado efeito negativo da inoculação em cinco tratamentos fertilizados com SFT. Não foi observado efeito de isolados nos valores de porcentagem de fósforo. Nos valores de fósforo total, os isolados 061, 062 e 163 incrementaram os valores do parâmetro sobre o tratamento fertilizado com SFT. Os fosfatos naturais testados apresentaram baixa eficiência quando comparados ao fertilizante solúvel na disponibilidade de fósforo para as plantas.

Palavras-chave: Fósforo, fosfatos naturais, solubilização, fungos, bactérias

Abstract

The objective of this work was to evaluate the behaviour of phosphate solubilizing microorganisms (fungus: 310A, 061, 062 e 251, bacterias 163, 160 e 161) in promoting nutrition and growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedlings cultivated in trays with sterilized substrate fertilized and phosphates source. A randomized completely design was used, with a factorial 4x8 scheme (four treatments with phosphate nutrition and inoculated with eight phosphate solubilizing microorganisms) and four replications. Each replication was made of 10 cells. The experiment was evaluated 35 days after planting for dry matter, P percentage and total phosphorus of above ground parts. The triple super phosphate (SFT) had better results than the others, including the control treatment, in all analyzed parameters. On the dry matter production, it was observed negative effect from inoculation in five treatments fertilized with SFT. There was no effect of isolates on the phosphorus content values. In the values of total phosphorus, the isolates 061, 062 e 163 increased the parameter values on the fertilized treatment with SFT. The natural phosphates presented low efficiency when compared to dissolvable fertilizer on the availability of phosphorus to the plants.

Key words: Phosphorus, natural phosphates, solubilize, fungus, bacterias

¹ Pesquisa realizada com recursos de projeto financiado pela International Foundation for Science (IFS).

² Professor do Instituto Federal Catarinense – Campus Araquari. Engenheiro Agrônomo e Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC); E-mail: lcoalves@yahoo.com.br

³ Engenheiro Agrônomo, Doutor em Ciências do Solo e Professor Adjunto da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

* Autor para correspondência

Introdução

A problemática no suprimento de fósforo (P) nos solos do Brasil está relacionada aos processos de fixação das fontes solúveis e a baixa solubilidade e teores do elemento presentes nos fosfatos naturais brasileiros. Esses fatores limitam consideravelmente a absorção de P pelas plantas e contribuem para a utilização intensiva destas fontes de nutrientes em quantidades muito superiores às reais necessidades das culturas (VAN RAIJ, 1991), demandando, desta forma, a necessidade do desenvolvimento de estudos de novas tecnologias, visando otimizar a eficiência na utilização destas fontes (BRAGA et al., 1991; RESENDE et al., 2006).

Vários grupos de microrganismos do solo apresentam capacidade de solubilizar nutrientes de formas pouco solúveis, atuando na disponibilização de elementos essenciais para o crescimento vegetal, a exemplo do P (ALVES, 2006; ALVES; MENDOZA; SILVA FILHO, 2002; RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999; WHITELAW, 2000), por meio de mecanismos de solubilização ligados principalmente à produção de ácidos orgânicos (CUNNINGHAM; KUIACK, 1992; NARLOCH, 2002).

Apesar de seu potencial de uso agrícola, no Brasil, o estudo da interação entre fosfatos e microrganismos do solo tem merecido pouca atenção. Segundo Eira (1992), a população de microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) está entre 10^5 e 10^7 UFCs (unidades formadoras de colônia) por grama de solo, e a variação desta população pode ocorrer em função do tipo de solo, de fatores bióticos e abióticos, bem como do tipo de fosfato natural e, segundo Silva Filho e Vidor (2001), também devido aos fatores nutricionais do meio de cultura utilizado para os testes *in vitro*.

O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento de MSF (fungos e bactérias), na promoção da nutrição e crescimento de mudas de alface (*Lactuca sativa* L.), cultivadas em substrato esterilizado e adubados com fontes fosfatadas.

Material e métodos

Foram utilizados sete isolados de MSF pertencentes à coleção do laboratório de microbiologia do solo da Universidade Federal de Santa Catarina, isolados de amostras de solos de pomar, floresta ou lavoura de alface (fungos: 310A, 061, 062 e 251; Bactérias: 163, 160 e 161).

O inoculo foi preparado pelo cultivo individual de cada isolado em tubo rosqueável (1 cm Ø), inclinado, contendo 4mL de meio de cultura GL (glicose e extrato de levedura), modificado de Sylvester-Bradley et al. (1982), previamente esterilizado, seguido de incubação em estufa BOD a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 72 horas. Após o período de incubação, 3mL de solução salina (0,85%) foram adicionados em cada tubo rosqueável e feita a homogeneização através de agitação manual. A solução obtida de cada frasco contendo propágulos do isolado, foi transferida individualmente para frasco erlenmeyer, contendo 50mL de meio de cultura (GL), sem adição de Agar, e incubada em estufa BOD a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 120 horas.

Após o término desse período, cada cultura bacteriana foi centrifugada a 2.200 rpm por 5 minutos, e ressuspensa em 180mL de solução salina (0,85%). Para os isolados fúngicos, procedeu-se a transferência do micélio sobrenadante para frascos erlenmeyers contendo a mesma quantidade de solução salina utilizada para as bactérias, seguindo-se da fragmentação em aparelho ultratriturador a 24.000 rpm por 5 minutos.

Na sequência, para cada isolado, foi efetuada a contagem do número de UFC através do método das diluições sucessivas (10^{-3} a 10^{-8}), determinando-se, desta forma, o número de propágulos viáveis por mL de inóculo. A quantidade de inoculante utilizada foi padronizada em 10^5 UFC g^{-1} de substrato.

Para a instalação do experimento, foram utilizadas bandejas de isopor de 288 células, desinfestadas pela imersão em solução de hipoclorito de sódio (2,5%) por 15 minutos. Cada célula foi preenchida com

4,5g de substrato. Cada repetição foi constituída de 10 células. Foram utilizadas quatro repetições por isolado, inclusive para os tratamentos testemunha (inóculo e fontes de P). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 4 x 8 (quatro tratamentos de adubação fosfatada e oito tratamentos de inoculação com MSF).

Utilizou-se o substrato comercial MECPLANT® HORTA 1, com ou sem fertilização de base (superfosfato triplo), sendo os tratamentos sem P suplementados com fosfato de Catalão (9,4% de P_2O_5 e solubilidade em ácido cítrico de 2,5%) ou fosfato de Arad (33% de P_2O_5 e solubilidade em ácido cítrico de 10,5%) em quantidade de P_2O_5 equivalentes à adubação de base presente no substrato (930g de P_2O_5/m^3 de substrato). O substrato, juntamente com os fosfatos, foram autoclavados por três vezes a $121 \pm 1^\circ C$ por uma hora, em intervalos de 24 horas.

As sementes de alface – tipo solta, variedade Vera de verão – foram previamente desinfestadas em álcool 96° GL por um minuto e solução de hipoclorito de sódio (2,5%) por dois minutos, seguindo-se a tríplice lavagem com água destilada esterilizada para a retirada dos resíduos das substâncias desinfetantes.

A cada célula da bandeja foram adicionadas três sementes, 2mL de inóculo padronizado e a fonte de P homogeneizada ao substrato. A umidade do substrato foi mantida em 80% da capacidade de campo e após a germinação, feito o desbaste, mantendo-se uma planta por célula.

O experimento foi mantido em casa de vegetação por 35 dias após a germinação de 90% do *stand* total de plantas. Após este período, as plantas foram colhidas e secadas a $65 \pm 1^\circ C$ até a estabilização do peso, seguindo-se a determinação do peso da matéria seca da parte aérea.

Na seqüência, foi realizada a determinação do teor de P tecidual da parte aérea, segundo metodologia adotada por Tedesco et al. (1995). Para isso, o tecido vegetal seco foi moído em moinho de facas de aço inoxidável e, em seguida, homogeneizado, retirando-se uma amostra de 0,2g para a digestão.

Os resultados, transformados em valores de porcentagem e de P total da parte aérea, foram submetidos a análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%).

Resultados e discussão

Com relação à produção de matéria seca da parte aérea, não houve efeito da inoculação dos MSF (Tabela 1). Em relação às fontes de P, observou-se apenas efeito positivo do superfosfato triplo (SFT) sobre o crescimento das plantas. A superioridade desta fonte fosfatada sobre as demais, pode ser atribuída ao fato do P encontrar-se numa forma prontamente assimilável pelas plantas (HPO_4^{-2} ou $H_2PO_4^{-1}$), o que não ocorre com as demais fontes (VAN RAIJ, 1991).

Na interação isolados e fontes de P, observaram-se efeitos da inoculação dentro do SFT. A inoculação da maioria dos isolados provocou um decréscimo na produção de matéria seca da parte aérea, chegando, em alguns casos, como no isolado 310A, a uma redução de mais de 50% da matéria seca das plantas em relação ao tratamento testemunha sem inóculo (Tabela 1).

Não houve efeito da inoculação dos MSFs na porcentagem de P da parte aérea de plantas de alface (Tabela 2), sendo que, em relação às fontes fosfatadas, apenas as plantas adubadas com SFT apresentaram uma porcentagem de P superior às demais fontes (Tabelas 3).

Tabela 1. Matéria seca da parte aérea de plantas de alface (*Lactuca sativa* L.) cultivadas em substrato com diferentes fontes de fosfatos e inoculadas com microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF)*.

Fonte fosfatada	Isolados de MSF							Testemunha
	061	062	160	161	163	251	310A	
	----- mg planta ⁻¹ -----							
Arad	112aB	114aB	101aB	108aB	107aB	102aB	94aB	104aB
Catalão	108aB	113aB	90aB	116aB	102aB	98aB	100aB	100aB
Superfosfato triplo	653abc	536cA	572bcA	711abA	559bcA	564bcA	312dA	770aA
Testemunha	109aB	118aB	96aB	104aB	109aB	122aB	97aB	105aB

*Médias seguidas da mesma letra, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).

Tabela 2. Efeito da inoculação de isolados de microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) nos valores de porcentagem de P na parte aérea de plantas de alface (*Lactuca sativa* L.) cultivadas em substrato com diferentes fontes de fosfatos*.

	Isolados MSF							Test
	061	062	160	161	163	251	310A	
	----- % de P -----							
Média	0,0034a	0,0041a	0,0038a	0,0037a	0,0040a	0,0034a	0,0045a	0,0031a

*Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%)

Tabela 3. Efeito de diferentes fontes de fosfatos nos valores de porcentagem de P na parte aérea de plantas de alface (*Lactuca sativa* L.) cultivadas em substrato inoculado com microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF)*.

Fontes fosfatadas			
Arad	Catalão	Superfosfato triplo	Testemunha
----- % de P -----			
0,0035b	0,0033b	0,0050a	0,0034b

*Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%)

O teor de P total absorvido na parte aérea foi afetado pela fonte de P e pela interação fosfatos isolados. Em relação às fontes de P, observou-se efeito positivo do SFT sobre os demais. Na interação isolados e fontes fosfatadas, observou-se efeito positivo dos isolados 061, 062 e 163 sobre

os demais isolados, incluindo-se o tratamento testemunha, na presença de SFT (Tabela 4). Estes resultados, em parte, contradizem os resultados obtidos na produção de matéria seca da parte aérea, em que os isolados 062 e 163 desfavoreceram o crescimento das plantas na mesma fonte fosfatada.

Tabela 4. P total na parte aérea de plantas de alface (*Lactuca sativa* L.) cultivadas em substrato com diferentes fontes de fosfatos e inoculadas com microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF)*.

Fonte fosfatada	Isolados de MSF							Testemunha
	061	062	160	161	163	251	310A	
	-----mg planta ⁻¹ -----							
Arad	1,95aB	3,26aB	3,72aB	4,79aB	4,35aB	3,42aB	4,51aB	3,04aB
Catalão	2,74aB	4,73aB	5,06aB	4,79aB	1,40aB	3,80aB	2,25aB	2,16aB
Superfosfato triplo	35,88aA	31,70abA	13,26cA	21,29bcA	36,72aA	15,03cA	19,98cA	19,29cA
Testemunha	3,80aB	3,64aB	2,96aB	2,93aB	3,72aB	4,06aB	2,90aB	5,01aB

*Médias seguidas da mesma letra, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).

Diversos trabalhos têm demonstrado a eficiência dos MSF na produção de matéria seca, porcentagem de P e P total, no crescimento das plantas. Alguns resultados demonstram um incremento de 2 a 93% na produção de matéria seca, e de 3 a 380% na absorção de P (WHITELAW, 2000). Em alguns trabalhos, os efeitos ocorreram em todos os parâmetros avaliados (KUCEY, 1983; KUNDU; GAUR, 1984). Em outros, o efeito ocorreu apenas na produção de matéria seca (FREITAS; BANERJEE; GERMINA, 1997) ou na matéria seca e porcentagem de P (CHABOT; ANTOUN; CESCAS, 1996). Às vezes, com o mesmo microrganismo, são obtidos resultados diferentes. Kucey e Leggett (1989) obtiveram respostas na porcentagem de P e no P total em casa de vegetação e na matéria seca de canola e P total a campo. Em trabalhos de seleção, diferenças entre os isolados também são verificadas. Alguns isolados não apresentam qualquer efeito. Outros, afetam apenas a produção de matéria seca, sem alterar o teor de P absorvido e há os que incrementam a produção e o P absorvido (FREITAS; BANERJEE; GERMINA, 1997; WAHID; MEHANA, 2000).

Alguns dos resultados obtidos neste trabalho não se encontram relatados na literatura, como no caso dos isolados 062 e 163 que propiciaram um resultado positivo no teor de P total e um resultado negativo no incremento de matéria seca da parte aérea. Uma das hipóteses para explicar esse fato pode estar relacionada aos mecanismos de solubilização de fosfatos utilizados por estes microrganismos, dentre eles, a produção de ácidos orgânicos (KIM;

MCDONALD; JORDAN, 1997). A alta capacidade de solubilização de determinado microrganismo pode acarretar em expressiva quantidade de ácidos na rizosfera, o que pode inibir o crescimento das plantas, com conseqüente decréscimo na produção de matéria seca, embora haja uma alta disponibilidade de P. Também é provável que, em certas circunstâncias, esses microrganismos produzam substâncias tóxicas em níveis críticos para as plantas, ou mesmo que pela sua excessiva taxa de crescimento populacional, possam competir com a planta por nutrientes. Souhie et al. (2005) relatam que a inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato não foi benéfica ao desenvolvimento de *Enterofobium contortisiliquum*, sugerindo incompatibilidade entre os microrganismos inoculados e a espécie vegetal, ou mesmo entre os próprios microrganismos na rizosfera.

Mais estudos são necessários para a determinação dos fatores, bem como de técnicas de manejo, que possam favorecer a atividade solubilizadora de microrganismos edáficos.

Conclusões

A eficiência agrônômica das fontes de fosfatos naturais, comparada à adubação solúvel mostrou-se baixa;

A inoculação de microrganismos solubilizadores de fosfatos não contribuiu para aumentar a disponibilidade de P das fontes de fosfatos naturais;

Em altos níveis de fertilidade, os isolados 062 e 310A desfavoreceram a produção de matéria seca da parte aérea de plantas de alface.

Referências

- ALVES, L. *Solubilização de nutrientes contidos em rochas por fungos ectomicorrízicos*. 2006. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis: UFSC, 2006.
- ALVES, L.; MENDOZA, E. A.; SILVA FILHO, G. N. Microrganismos solubilizadores de fosfatos e o crescimento de Pímus e Eucalipto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 26, n. 4, p. 939-947, 2002.
- BRAGA, N. R.; MASCARENHAS, H. A. A.; BULISANI, E. A.; VAN RAIJ, B.; FEITOSA, C. T.; HIROCE, R. Eficiência agrônômica de nove fosfatos em quatro cultivos consecutivos de soja. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v. 15, n. 3. p. 315-319, 1991.
- CHABOT, R.; ANTOUN, H.; CESCAS, M. P. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Plant and Soil*, The Hague, v. 184, n. 2, p. 311-321, 1996.
- CUNNINGHAM, J. E.; KUIACK, C. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilajii*. *Applied and Environmental microbiology*, New York, v. 58, n. 5, p. 1451-1458, 1992.
- EIRA, A. F. Solubilização microbiana de fosfatos. In: CARDOSO, E. J. B.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. *Microbiologia do Solo*. Campinas: SBCS, 1992. p. 33-39.
- FREITAS, J. R.; BANERJEE, M. R.; GERMINA, J. J. Phosphates-solubilizing Rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biology and Fertility of Soils*, Berlim, v. 24, n. 2, p. 358-364, 1997.
- KIM, K. Y.; McDONALD, G. A.; JORDAN, D. Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. *Biology and Fertility of Soils*, Berlim, v. 24, n. 4, p. 347-352, 1997.
- KUCEY, R. M. N. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Canadian Journal of Soil Science*, Ottawa, v. 63, n. 4, p. 671-678, 1983.
- KUCEY, R. M. N.; LEGGETT, M. E. Increase yields and phosphorus uptake by Westar canola (*Brassica napus* L.) inoculated with a phosphate-solubilizing isolate of *Penicillium bilajii*. *Canadian Journal of Soil Science*, Ottawa, v. 69, n. 2, p. 425-432, 1989.
- KUNDU, B. S.; GAUR, A. C. Rice response to inoculation with N₂-fixing and P-solubilizing microorganisms. *Plant and Soil*, The Hague, v. 79, n. 2, p. 227-234, 1984.
- NARLOCH, C. *Interação microrganismos solubilizadores de fosfatos – Fungos ectomicorrízicos e o crescimento de pinus taeda L.* 2002. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis: UFSC, 2002.
- RESENDE, A. V.; NETO, A. E. F.; ALVES, V. M. C.; MUNIZ, J. A.; CURI, N.; FAQUIN, V.; KIMPORA, D. I.; SANTOS, J. Z. L.; CARNEIRO, L. F. Fontes e modos de aplicação de fósforo para o milho em solo cultivado da região do cerrado. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 30, n. 6, p. 453-466, 2006.
- RODRÍGEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, New York, v. 17, n. 4/5, p. 319-339, 1999.
- SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*: Brasília, v. 36, n. 12, p. 1495-1508, 2001.
- SOUCHIE, E. L.; CAMPELLO, E. F. C.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. Mudanças de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. *Revista Floresta*, Curitiba, v. 35, n. 2, p. 329-334, 2005.
- SYLVESTER-BRADLEY, R.; AKASAWA, N.; LATORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amazonica*, Manaus, v. 12, n. 1, p. 15-22, 1982.
- TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A. *Análise do solo, plantas e outros materiais*. Porto Alegre: UFRGS, 1995.
- VAN RAIJ, B. *Fertilidade do solo e adubação*. São Paulo: CERES; Piracicaba: POTEFOS, 1991.
- WAHID, O. A. A.; MEHANA, T. A. Impact of phosphate-solubilizing fungi on the yield and phosphorus-uptake by wheat and fava bean plants. *Microbiological Research*, Jena, v. 155, p. 221-227, 2000.
- WHITELAW, M. A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*, San Diego, v. 69, p. 99-151, 2000.