

VITHÓRIA CACIQUE ARAÚJO

DESENVOLVIMENTO DE BIOFERTILIZANTE CONTENDO O FUNGO
SOLUBILIZADOR DE FOSFATO *Aspergillus niger*

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL

2019

VITHÓRIA CACIQUE ARAÚJO

DESENVOLVIMENTO DE BIOFERTILIZANTE CONTENDO O FUNGO
SOLUBILIZADOR DE FOSFATO *Aspergillus niger*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia, como parte das exigências do Programa
de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área
de concentração em Fitotecnia, para obtenção do
título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Gilberto de Oliveira Mendes

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL

2019

DESENVOLVIMENTO DE BIOFERTILIZANTE CONTENDO O FUNGO
SOLUBILIZADOR DE FOSFATO *Aspergillus niger*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia, como parte das exigências do Programa
de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área
de concentração em Fitotecnia, para obtenção do
título de “Mestre”.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2019

Prof. Dr. Lucas Silva de Faria

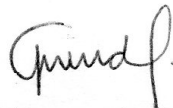
FUCAMP

Profa. Dra. Gleice Aparecida de Assis

UFU

Prof. Dr. Bruno Sérgio Vieira

UFU



Prof. Dr. Gilberto de Oliveira Mendes

ICIAG - UFU

(orientador)

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

A663d Araújo, Vithória Cacique, 1992
2019 Desenvolvimento de biofertilizante contendo o fungo solubilizador
de fosfato *Aspergillus niger* [recurso eletrônico] / Vithória Cacique
Araújo. - 2019.

Orientador: Gilberto de Oliveira Mendes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Agronomia.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1312>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Agronomia. 2. Adubos e fertilizantes líquidos. 3. Solos - Teor de
fósforo. 4. *Aspergillus niger*. I. Mendes, Gilberto de Oliveira, 1983,
(Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU: 631

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

*“Algo só é impossível até que alguém duvide e
resolva provar o contrário.”
(Albert Einstein)*

À comunidade científica,

OFEREÇO.

A Deus,

Pela vida, saúde e sabedoria.

Aos meus pais, Geraldo e Viviane,

Pela educação, ensinamentos, paciência, e por serem
exemplos de coragem e perseverança.

À minha irmã, Eduarda,

Pelo fraterno convívio e estímulo ao longo da vida.

À minha avó, Celina,

Pelo amor, experiências e apoio.

Aos familiares e amigos,

Pela amizade e compreensão.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que me iluminou, dando-me força e coragem durante esta caminhada e permitiu uma realização na minha vida profissional.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo fomento, apoio financeiro e consolidação do programa de pós-graduação *stricto sensu* em Agronomia e demais programas no Brasil.

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia (UFU), à Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPP-UFU), ao Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA) pelo incentivo à pesquisa e a oportunidade de aprendizado e aprimoramento.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gilberto de Oliveira Mendes, pela orientação, atenção, amizade, carinho, dedicação, confiança e ensinamentos.

À Equipe do viveiro Santa Clara, principalmente ao senhor Luiz Henrique e Luiz Felipe Bordin, que não mediram esforços para que realizássemos o experimento em seu viveiro, e estão sempre apoiando ideias vindas da Universidade.

Aos meus colegas de pesquisa Kamila Rossati, Laura Vieira e Vinicius Amaral, pelo apoio, colaboração nos experimentos, amizade e companheirismo.

Ao Thúlio Mattos, técnico do Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia, pela colaboração, ensinamentos e paciência.

Aos amigos de Mestrado e estrada, Renan Zampiroli, Camila Soares, Patrícia Diniz, que foram mais que companheiros de viagem em dias de aula, mas me ensinaram lições que levarei para o resto da minha vida, além da amizade, carinho e respeito.

Aos membros da banca avaliadora, Prof. Dr. Lucas Silva de Faria, Profa. Dra. Gleice Aparecida de Assis e ao Prof. Dr. Bruno Sérgio Vieira pela disponibilidade e compreensão.

Ao membro suplente da banca examinadora, Prof. Dr. Ênio Tarso de Sousa Costa, por se mostrar disponível. Além de ceder em vários momentos do experimento equipamentos e disponibilidade de uso ao seu laboratório.

À toda Equipe do Educampo/AMOCA, consultores, coordenador e produtores que sempre me apoiaram e compreenderam meus momentos de ausência.

À minha família, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Aos amigos por estarem comigo em todos os momentos da minha vida.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	i
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 O fósforo e a produção vegetal	3
2.2 Fertilizantes fosfatados	4
2.3 Microrganismos solubilizadores de fosfato	5
2.4 Biofertilizantes	7
2.5 Microrganismos na produção de mudas de cafeeiro	9
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Descrição do local	12
3.2 Desenvolvimento de formulação de biofertilizante com o fungo solubilizador de fosfato <i>Aspergillus niger</i>	12
3.3 Vida de prateleira da formulação	13
3.4 Quantificação de conídios viáveis na formulação armazenada	13
3.5 Desempenho da formulação na solubilização de mineral fosfatado externo ..	14
3.6 Produção de mudas de cafeeiro inoculadas com formulação granular de <i>Aspergillus niger</i>	15
3.7 Análises Estatísticas	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1 Caracterização da formulação	17
4.2 Avaliação da formulação no desenvolvimento de mudas de cafeeiro	20
5 CONCLUSÕES	25

RESUMO

ARAÚJO, VITHÓRIA CACIQUE. **Desenvolvimento de biofertilizante contendo o fungo solubilizador de fosfato *Aspergillus niger***. 2019. 45p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia¹.

A adubação fosfatada é um dos componentes centrais para se alcançar altas produtividades das culturas agrícolas, tendo em vista que o fósforo (P) é um elemento que apresenta baixos níveis de disponibilidade na maioria dos solos. Por outro lado, a produção dos fertilizantes para corrigir essa situação é baseada totalmente em fontes não renováveis. Dessa maneira, microrganismos capazes de solubilizar P a partir de minerais de baixa solubilidade apresentam-se como alternativa promissora para o manejo da adubação fosfatada. Um dos gargalos da utilização de microrganismos é o desenvolvimento de inoculantes que garantam a chegada e permanência do organismo no alvo. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma formulação de biofertilizante contendo o fungo solubilizador de fosfato *Aspergillus niger*. A vida de prateleira da formulação foi avaliada mensalmente em duas condições de temperatura: ambiente e geladeira, de modo a verificar a capacidade de germinação do fungo ao longo do tempo. A formulação foi avaliada *in vitro* quanto ao seu poder de solubilização de fosfato de cálcio na presença e ausência de sacarose e em condições de campo como inoculante na produção de mudas de cafeeiro. A formulação foi inoculada 2 cm abaixo as sementes e o desenvolvimento das mudas foi acompanhado mensalmente, utilizando-se como referência variáveis de crescimento vegetal: altura, diâmetro de coleto, número de folhas, volume de raiz, massa seca de parte aérea e raiz e clorofila. Os resultados obtidos para a vida de prateleira mostraram que a formulação manteve a viabilidade até o sexto mês de avaliação, germinando 100% dos grânulos e com contagem de $1,1 \times 10^5$ UFC g⁻¹. Quanto à capacidade de solubilização de fosfato de cálcio, a formulação produziu halo de solubilização 292% maior na presença de sacarose. No experimento em viveiro, onde houve a inoculação do fungo, obteve-se uma altura de plantas de 5,6%, diâmetro de coleto de 6,1% e número de folhas de 8,5% superior ao não inoculado, além de maior desenvolvimento de sistema radicular.

Palavras-chave: inoculante, fósforo, promoção de crescimento vegetal.

¹ Orientador: Gilberto de Oliveira Mendes – UFU

ABSTRACT

ARAÚJO, VITHÓRIA CACIQUE. **Development of biofertilizer containing the phosphate-solubilizing fungus *Aspergillus niger***. 2019. 45p. Dissertation (Master Program Agronomy/Crop Science) – Federal University of Uberlândia, Uberlândia¹.

Phosphate fertilization is one of the main components to achieve high crop yields, since phosphorus (P) is a limiting element in most soils. On the other hand, the production of fertilizers used to overcome this limitation is based on nonrenewable sources. Thus, microorganisms able to solubilize P from sparingly-soluble minerals are a promising alternative for the management of phosphate fertilization. One of the bottlenecks to apply these microorganisms is the development of inoculants that guarantee the arrival and permanence of the organism in the target. The present work had as objective to develop a formulation of biofertilizer containing the phosphate-solubilizing fungus *Aspergillus niger*. The shelf life of the formulation was evaluated monthly in two temperature conditions: environment and refrigerator, in order to verify the germination capacity of the fungus over time. The formulation was evaluated *in vitro* to characterize its capacity to solubilize calcium phosphate in the presence and absence of sucrose, and under field conditions as an inoculant in the production of coffee seedlings. The formulation was inoculated 2 cm below the seeds and the development of the seedlings was monitored monthly, using as reference plant growth variables: height, stem diameter, number of leaves, root volume, shoot and root dry mass and chlorophyll. The results obtained for the shelf life showed that the formulation remained viable until the sixth month of evaluation, germinating 100% of the granules and counting 1.1×10^5 UFC g⁻¹. As to the capacity to solubilize calcium phosphate, the formulation produced a P-solubilization halo 292% higher in the presence of sucrose. In the soil-plant experiment, inoculated seedlings showed, height of 5.6%, stem diameter of 6.1%, and a number of leaves of 8.5% higher to the non-inoculated ones, besides a greater development of root system.

Keywords: inoculant, phosphorus, plant growth promotion.

¹ Advisor: Gilberto de Oliveira Mendes - UFU

1 INTRODUÇÃO

Acredita-se que até 2050 a população humana chegue a 9,5 bilhões de pessoas, ocasionando, assim, uma maior demanda por alimentos (GLICK, 2015). Para atender essa demanda crescente são necessárias culturas agrícolas mais produtivas (GODFRAY et al., 2010; TILMAN et al., 2011). O suprimento adequado de fósforo (P) para as culturas é um dos requisitos para a garantia da produção. Esse nutriente interage com os colóides do solo, de forma que sua concentração na solução é muito baixa, podendo limitar a produção de muitas culturas, principalmente em solos tropicais (AZEVEDO et al., 2004). Alguns solos são deficientes em P, pois apresentam baixa quantidade de fosfato solúvel prontamente disponível para as plantas, mesmo tendo altos níveis de P total (ROBERTS, 2009). Quando se aplica um fertilizante fosfatado, até 53,3% do P pode ficar retido nos constituintes do solo, ficando indisponível às plantas, principalmente em solos brasileiros, com clima tropical (CUNHA et al., 2014). Além disso, estima-se que a fonte natural para a produção de fertilizantes fosfatados, as rochas fosfáticas, se esgotará até 2100 (SATTARI et al., 2012).

De modo a tentar aumentar a efetividade desses fertilizantes, microrganismos do solo que são capazes de solubilizar P a partir de minerais fosfatados estão sendo utilizados para aumentar a absorção do fosfato pelas plantas (AZCON et al., 1976; FREITAS et al., 1997; GYANESHWAR et al., 2002). Esses microrganismos possuem mecanismos que interferem na estrutura química, física e fisiológica da rizosfera (DIMKPA et al., 2009a; GROVER et al., 2011; GLICK, 2012). Os gêneros fúngicos *Aspergillus* e *Penicillium* são os que possuem maior capacidade de solubilização de fosfatos inorgânicos de baixa solubilidade (NAHAS, 1996; SILVA FILHO et al., 2002; MENDES et al., 2014). A solubilização de fosfato pelos microrganismos decorre da produção e secreção de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, que disponibilizam o P para as plantas, podendo contribuir para a diminuição da quantidade de fertilizante aplicada (XIAO et al., 2013). Além disso, esses organismos ainda podem apresentar outros benefícios para as culturas agrícolas, atuando como promotores do crescimento vegetal por meio da produção de fitormônios, proteção contra fitopatógenos e disponibilização de nutrientes (SANTOS, 2011).

Contudo, um dos gargalos da utilização de microrganismos benéficos em larga escala é o desenvolvimento de inoculantes eficazes e com efeitos consistentes em campo. Em muitos casos, é notada uma grande variabilidade e inconsistência de

resultados entre estudos em laboratório, casa de vegetação e campo (MALUSÁ et al., 2012). Isso é devido à falta de entendimento das relações dos envolvidos: planta, microrganismo e condições ambientais. Na inoculação direta no solo muitas vezes não há sucesso, pois alguns fatores como temperatura, umidade, pH, disponibilidade de nutrientes, presença de compostos tóxicos e competição com outros organismos podem interferir na sobrevivência dos microrganismos (JAIN et al., 2010; VASSILEV et al., 2005). Por causa disso, para um efetivo processo de inoculação é indicada a utilização de carreadores para proteção do microrganismo, garantindo seu estabelecimento no local (JAIN et al., 2010; VASSILEV et al., 2005). A escolha da tecnologia para produção do inoculante e do veículo para a formulação do produto são essenciais para obtenção de sucesso na aplicação (MALUSÁ et al., 2012).

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi desenvolver formulação de biofertilizante contendo o fungo solubilizador de fosfato *A. niger*. Especificamente, objetivava-se avaliar a formulação quanto ao poder de solubilização *in vitro*, vida de prateleira e na produção de mudas de cafeeiro.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O fósforo e a produção vegetal

Atualmente, a população humana global é de aproximadamente 7 bilhões de habitantes. Acredita-se que em 2050 esse número tenha crescido e atingido cerca de 9,5 bilhões (GLICK, 2015), aumentando, assim, a demanda por alimentos. Esse crescimento de demanda, segundo a FAO (2009), aumentará em torno de 70%, tornando mandatória a obtenção de culturas agrícolas mais produtivas (GODFRAY et al., 2010; TILMAN et al., 2011). O uso de fertilizantes nos sistemas agrícolas inovou a produção de alimentos no mundo moderno e proporcionou aumentos de produtividade inatingíveis sem o uso desse recurso. No entanto, a resposta das culturas depende muito da eficiência do uso de fertilizantes. Características físicas, químicas e físico-químicas específicas de cada fertilizante sob condições adversas do solo podem influenciar sua eficiência na nutrição das plantas (CHIEN et al., 2011). Quando se faz adubações com fertilizantes minerais, estes podem ser perdidos por uma série de processos, tais como, lixiviação, erosão, volatilização, fixação, escoamento, desnitrificação e precipitação (ROBERTS, 2008; POWELL et al., 2010).

Para aumentar a produtividade das culturas agrícolas e, assim, suprir a demanda crescente de alimentos, o suprimento adequado de fósforo (P) para as culturas está entre os componentes essenciais de manejo de sistemas produtivos agrícolas. Por causa disso, a agricultura é responsável pelo consumo de 90% de todo o P extraído. Isso é consequência da baixa disponibilidade natural do elemento e sua forte interação com os colóides do solo, que o retiram da solução do solo (adsorção ou precipitação) e fazem com que a sua concentração seja muito baixa, podendo limitar a produção em solos tropicais (AZEVEDO et al., 2004). Acredita-se que nas próximas décadas haverá um pico de produção de fertilizantes fosfatados, dobrando a demanda mundial até 2050 (CORDELL; WHITE, 2011). Estima-se que pode haver esgotamento das fontes fosfáticas em 2100 ou posteriormente (SATTARI et al., 2012).

O P é um macronutriente importante para o desenvolvimento e crescimento das plantas, sendo muitas vezes o fator limitante dos solos para se atingir grandes produtividades (RICHARDSON et al., 2009). Participa do metabolismo, na transferência de energia da célula, na respiração e na fotossíntese. É também componente estrutural dos ácidos nucleicos, coenzimas, fosfoproteínas e fosfolipídios.

O P está também relacionado à eficiência de absorção de nutrientes e água, pois estimula o crescimento radicular, que amplia a exploração do solo pelas raízes (BAHL; PARISCHA, 1998).

O P encontra-se na fase sólida do solo nas formas orgânicas e inorgânicas e na fase líquida em formas inorgânicas. As plantas absorvem tanto H_2PO_4^- como HPO_4^{2-} (ortofosfato) dependendo do pH do solo (HAVLIN et al., 2005). Muitos solos são deficientes em P, pois apresentam baixa quantidade de fosfato solúvel prontamente disponível para as plantas, mesmo tendo altos níveis de P total. Portanto, o emprego de fertilizantes é inevitável para solucionar as limitações dos solos e garantir maiores produções (ROBERTS, 2009). Nas aplicações com fertilizantes à base de P, uma fração é assimilada pelas plantas e o restante, cerca de 50% do P, forma complexos com outros constituintes do solo, tornando-se indisponível para as plantas (CUNHA et al., 2014). Em solos ácidos o P forma compostos insolúveis com Fe, Al, e em solos alcalinos, liga-se ao Ca e Mg formando compostos moderadamente solúveis (HOLFORD, 1997; LÓPEZ-BUCIO et al. 2002). Estima-se que 8 a 12% dos solos do mundo possuem alta capacidade de fixação de fósforo, principalmente nos trópicos (ROY et al., 2016). O problema da fixação de P é sanado por aplicações de altas doses de adubos fosfatados, porém a eficiência de utilização do P é baixa. Além disso, altas taxas de aplicação ocasionam impactos ambientais inesperados na estrutura do solo, composição, microbiota e outras propriedades do solo (AKANDE et al., 2005).

2.2 Fertilizantes fosfatados

A matéria-prima para a produção de fertilizantes fosfatados são as rochas fosfáticas (RF), classificadas como apatitas, que são fosfatos de cálcio contendo OH, F e Cl, ou fosforitas, que são fosfatos de cálcio com substituição parcial do PO_4^{3-} por CO_3^{2-} . As apatitas são formadas por ação vulcânica em zonas acidentadas, encontradas no Canadá, Rússia, África do Sul e no Brasil, e representam 15% da produção mundial. Já as fosforitas originam-se de depósitos sedimentares nos oceanos, nas áreas costeiras rasas, sendo encontradas na África, China, Oriente Médio e Estados Unidos, e representam a maior parte da produção, 85% (LOPES et al., 2004).

As fontes de P utilizadas na agricultura são classificadas como solúveis, pouco solúveis e insolúveis (MOREIRA et al., 1997; LANA et al., 2004). As fontes solúveis

têm sido as mais utilizadas, principalmente devido à sua alta porcentagem de P prontamente disponível para as plantas (PROCHNOW et al., 2003). Na produção desses fertilizantes fosfatados solúveis, a RF passa por tratamento químico com ácido sulfúrico ou fosfórico para solubilização do P. Em contrapartida, passar por esse processo químico aumenta o custo do fertilizante (BOLAN et al., 1990; REDDY et al., 1999; ZAPATA; ROY, 2004; STAMFORD et al., 2007). Dentre as fontes solúveis, as mais empregadas no campo são o superfosfato simples (SPS), o superfosfato triplo (SPT) e os fosfatos de amônio (monoamônico – MAP e diamônico – DAP) (BOLAN et al., 1990). Essas diferentes fontes solúveis podem apresentar eficiência divergente sob condições adversas, dependente de características texturais e mineralógicas do solo (CHIEN et al., 2011).

O fosfato natural, que consiste na aplicação da RF *in natura* após moagem, pode ser considerado como alternativa para a adubação fosfatada, pois tem custo reduzido (KOLAWOLE; TIAN, 2007). No entanto, apresenta boa solubilidade somente em solos ácidos e sua disponibilidade varia com o manejo, propriedades do solo e tipo de cultivo (HAMMOND et al., 1986). Por apresentarem baixa solubilidade, os fosfatos naturais disponibilizam o P de forma lenta, muitas vezes abaixo da demanda das plantas. Uma alternativa promissora e favorável ao meio ambiente para melhorar a efetividade desse tipo de fertilizante é o uso de microrganismos capazes de realizar a solubilização de fósforo de forma sustentável (KUCEY, 1983; GAIND, 2013).

2.3 Microrganismos solubilizadores de fosfato

Dentro os microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) se destacam os seguintes gêneros: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter*, *Mesorhizobium*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Micromonospora* (HALDER et al., 1990, RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999; PEIX et al., 2001; ALIKHANI et al., 2006; RICHA et al., 2007; EL-TARABILY et al., 2008; HAMEEDA et al., 2008; FARHAT et al., 2009; MARRA et al., 2011; MARRA et al., 2012; ZENG et al., 2012).

Em vários relatos, os fungos têm sido mais eficientes que as bactérias na conversão de fosfatos inorgânicos insolúveis em solúveis (KHAN et al., 2010). Estes representam cerca de 0,1 a 0,5% das populações de fungos totais (CHEN et al., 2006).

Os gêneros fúngicos *Aspergillus* e *Penicillium* são os que possuem maior capacidade de solubilização (NAHAS, 1996; SILVA FILHO et al., 2002; MENDES et al., 2014).

A efetividade da solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis pelos microrganismos tem sido correlacionada com a diminuição do pH (STUMM; MORGAN, 1995; WHITELAW, 2000). A ação desses microrganismos decorre da produção e secreção de ácidos orgânicos de baixo peso molecular (XIAO et al., 2013), que podem tornar o meio mais ácido, ou agirem como agentes complexantes dos elementos acompanhantes do íon fosfato (Ca, Al e Fe) (BOLAN et al., 1994; LIN et al., 2006). Em trabalho realizado por Mendes et al. (2014), o mecanismo primordial utilizado por alguns fungos para solubilizar fosfatos foi a liberação de ácidos orgânicos.

Existe uma variedade de ácidos orgânicos que pode ser produzida por fungos, dentre eles, ácidos butírico, cítrico, glicônico, 2-cetoglicônico, fumárico, láctico, málico, maleico, malônico, oxálico, propiônico, succínico e tartárico (CHEN et al., 2006; FARHAT et al., 2009; SCERVINO et al., 2010). A natureza do ácido orgânico produzido é uma característica específica de cada isolado fúngico e pode variar de acordo com as condições de cultivo. Esses ácidos produzidos reagem com os minerais fosfatados e liberam o P à solução do solo, disponibilizando o fosfato para o melhor suprimento das plantas (AZCON et al., 1976; FREITAS et al., 1997; GYANESHWAR et al., 2002).

A ação dos microrganismos na disponibilização do P para as plantas pode contribuir para a diminuição da quantidade de fertilizante aplicada, reduzindo assim o custo da produção e a poluição ambiental. Os microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) possuem alto potencial biotecnológico para a utilização industrial. Alguns países como a Austrália e o Canadá já possuem empresas que produzem em larga escala produtos utilizando os microrganismos como inoculantes. No Canadá, o produto JumpStart é à base de *Penicillium bilaii*, e na Austrália, o PR-70 Release utiliza *Penicillium radicum*. Estes produtos são registrados para as culturas soja, milho, sorgo, trigo, ervilha, feijão, girassol, beterraba, grão de bico, canola, mostarda, alfafa, lentilha e cravo doce (RICHARDSON, 2001).

Aspergillus niger é um fungo filamentoso haploide das espécies mais comuns do gênero *Aspergillus*. Normalmente é encontrado em ambientes comuns mesófilos, como solos, plantas e ambientes de ar fechado. Além de ser um fungo xerófilo (não necessita de água livre para seu crescimento, e podem crescer em ambientes úmidos), podem crescer em uma ampla faixa de temperatura (6 a 47 °C), sendo as mínimas de 6 – 8 °C,

as máximas de 45 – 47 °C e a faixa ótima de 35 – 37 °C (READ, 1991; WILLIAMS; HALLSWORTH, 2009; PANASENKO, 1967). Seu crescimento ocorre em uma variedade de substratos e muito rápido, com a produção de colônias que consistem de um compacto basal branco ou amarelo, coberto por uma densa camada de marrom-escuro ao preto, que correspondem aos conídios formados no ápice de conidióforos (BAYTAK et al., 2007). É um microrganismo muito importante no campo da biotecnologia e recebe destaque na literatura por sua capacidade de produzir várias enzimas tais como, amilases, lipases, celulasas, xilanases e proteases (BASU et al., 2007; ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

Vários pesquisadores têm verificado a capacidade de *A. niger* em remover contaminantes metálicos, como cobre, zinco e outros metais de cinzas de resíduos sólidos urbanos incinerados via lixiviação com ácidos orgânicos (AKTHAR et al., 1995; BOSSHARD et al., 1996; PRICE et al., 2001). Ácidos orgânicos, tais como cítrico, oxálico e glucônico são obtidos pela fermentação aeróbia de distintos substratos orgânicos por *A. niger* (PAPAGIANNI, 2007).

2.4 Biofertilizantes

O biofertilizante é uma substância que contém microrganismos vivos em veículos (sólidos ou líquidos) que podem ser aplicados às sementes, superfície da planta, ou no solo, ajudando na colonização da rizosfera ou interior da planta e proporcionando o crescimento por meio do aumento dos níveis de nutrientes a planta (VESSEY, 2003; CHEN, 2006). No entanto, alguns obstáculos tanto para a produção quanto para a formulação dos biofertilizantes podem acarretar a falta de sucesso nos produtos, que são feitos para atuarem em funções específicas. Para Vassilev et al. (2015), alguns passos são importantes no desenvolvimento de um biofertilizante:

- (a) isolamento e seleção de um microrganismo indígena efetivo, competitivo e multifuncional para um sistema solo-planta específico (ou para uma variedade de culturas);
- (b) caracterização dos microrganismos selecionados em meio de crescimento otimizado e dos parâmetros do processo de fermentação;
- (c) estudos de aplicação em campo;

(d) desenvolvimento de um método de formulação para garantir a persistência microbiana no solo, inclusive sob condições de estresse;

(e) transferência do *know-how* tecnológico para a produção do biofertilizante em nível industrial;

(f) desenvolvimento de sistema de controle de qualidade para a produção e o armazenamento;

(g) desenvolvimento de métodos de aplicação em campo para garantir os benefícios reivindicados.

Na tecnologia de fabricação dos biofertilizantes a formulação deve seguir alguns estágios, que vão desde a produção do organismo até sua ação no alvo. A metodologia de produção é determinante nas atividades das formulações, que se não seguida à risca pode levar a alterações nos processos produtivos e à não viabilidade. Quatro princípios básicos devem guiar o processo de formulação (JONES; BURGUES, 1998):

1. O organismo deve ter estabilidade durante a produção, distribuição e armazenamento;

2. O manuseio e aplicação do produto devem ser realizados de forma simples, colocando o produto no local correto;

3. De modo a aumentar a persistência do organismo, este deve ser protegido de fatores ambientais que o prejudiquem;

4. Deve ter a capacidade de aumentar a atividade do organismo, reprodução, contato e interação com o meio inserido.

Normalmente os organismos têm sido formulados e divididos em dois grupos, sólidos secos e líquidos. Os mais utilizados na atualidade foram classificados por Rhodes (1993), e separados em produtos secos (pó, grânulos e briquetes) e suspensões (à base de óleo, água ou emulsões).

Para chegar ao produto, algumas condições são necessárias para determinação da formulação, tal como o tipo e localização do alvo, disponibilidade de material para a fabricação, o equipamento que será utilizado na aplicação ao alvo, bem como a opção do usuário. Problemas e desafios são enfrentados pelo formulador para se chegar ao produto em cada uma das suas fases e seus objetivos (JONES; BURGUES, 1998):

- a) Na estabilização deve-se evitar o crescimento de agentes e microrganismos contaminantes, que podem desnaturar as proteínas dos agentes ativos;

b) No armazenamento deve-se evitar que o produto a base de pó se aglomere pela absorção de umidade, controlar a viscosidade dos líquidos e manutenção das partículas em suspensão, além de manter a viabilidade do mesmo;

c) Na aplicação assegurar um bom desempenho da tecnologia de aplicação de acordo com a formulação escolhida, seja ela pó ou grânulo. Manutenção da viscosidade dos produtos líquidos de modo a formarem gotículas na pulverização, quando pulverizado que este não forme espuma e consiga obter uma boa cobertura ao alvo;

d) Na pós-aplicação, que a perda física por chuva ou outros seja reduzida, que seja protegido contra agentes de inativação e depositado perto ao local de realização de suas atividades.

Portanto, a formulação busca minimizar os efeitos adversos, levando em consideração as divergências climáticas e ambientais, preferências e objetivos de usuários, de tal forma que um único organismo pode ser formulado em várias diferentes formas, atendendo a diversas demandas. Todas as formulações, no entanto, devem ser viáveis do ponto de vista prático e econômico (JONES; BURGUES, 1998).

Para o desenvolvimento de biofertilizantes com microrganismos solubilizadores de P deve-se selecionar aqueles que possuem capacidade de solubilizar diferentes fontes de P inorgânico, além de mineralizar fontes orgânicas (BASHAN et al., 2013). Ter um isolado com diferentes características dentro do ecossistema é uma grande vantagem, pois a realização de diversas funções pode resultar em vários benefícios para as plantas. Esses microrganismos com várias funcionalidades são considerados organismos promotores do crescimento de plantas, podendo colonizar a rizosfera ou a superfície da raiz. A promoção do crescimento vegetal pode ocorrer por meio da ampliação da resistência a estresses bióticos e abióticos (DIMKPA et al., 2009a; GROVER et al., 2011; GLICK, 2012). Dentre os estresses bióticos há a indução de resistência sistêmica das plantas, capaz de torná-las mais resistentes a patógenos e herbívoros (VAN WEES et al., 2008). Outros mecanismos de promoção são a síntese de fitormônios, reguladores de crescimento vegetal e o aumento da disponibilidade de nutrientes, tal como a solubilização de fosfatos e a produção de compostos voláteis (SANTOS, 2011).

2.5 Microrganismos na produção de mudas de cafeeiro

A formação de mudas de café sadias e bem desenvolvidas é uma etapa fundamental para que o cafeicultor tenha sucesso (TAVARES JUNIOR, 2004; TORRES et al., 2000). A instalação da maioria das lavouras cafeeiras principalmente de *Coffea arabica* L. é realizada por meio de mudas obtidas através de sementes. A semeadura deve ser feita diretamente nos saquinhos, usando-se duas sementes por recipiente, a uma profundidade de 1-2 cm, cobertas com uma fina camada de substrato. Ao iniciar a germinação, efetua-se imediatamente a cobertura do viveiro, proporcionando inicialmente 50% de insolação, caso não seja na modalidade a pleno sol. Na semeadura efetuada de forma direta com duas sementes por saquinho, quando as mudas atingirem a fase de “orelha de onça”, deverá ser deixada apenas uma plântula, a mais vigorosa (BERGO et al., 2002). Esse tipo de semeadura proporciona a manutenção do sistema radicular, causando menor incidência de *Rhizoctoniose* (tombamento). Em regiões frias do Sul de Minas, a semeadura feita em abril a maio resulta em mudas boas (5 pares de folhas definitivas) cerca de 210 dias após plantio (MATIELLO et al., 2005).

O processo de germinação ocorre entre 30 a 90 dias, dependendo da temperatura junto à semente, que é influenciada pela altitude, época do ano, insolação, profundidade de semeio, entre outros (MATIELLO et al., 2005). Já a emergência ocorre entre 50 e 60 dias após a semeadura, sendo que, sob temperaturas abaixo de 25°C pode levar de 90 a 120 dias (GUIMARÃES et al., 1998).

A germinação lenta de sementes de cafeeiro tem sido atribuída a alguns fatores, à baixa absorção de água e O₂ (BENDAÑA, 1962), ao balanço hormonal (SILVA, 2002), à presença de substâncias inibidoras (FRIEDMAN; WALLER, 1983; WALLER et al., 1986) e a presença do endocarpo (GUIMARÃES, 1995; RENA; MAESTRI, 1986; VALIO, 1976). As reservas da semente são constituídas principalmente de hemicelulose e substâncias graxas que vão sendo digeridos pelos cotilédones dentro do endosperma à medida que vão crescendo. O hipocótilo e a radícula rompem e crescem, mais tarde, a alça hipocotiledonária endireita-se levantando os cotilédones para fora, formando mais tarde os “palitos de fósforos” (Figura 1A). Estes crescem um pouco mais e logo surgem as folhas cotiledonares, que mais tarde dão origem à “orelha de onça” (Figura 1B) (SANTINATO et al., 2001).



FIGURA 1. Diferentes estágios na germinação das sementes de café: palito de fósforo (A) orelha de onça (B). Fonte: Araújo, V. C., 2018.

As mudas devem estar isentas de pragas e moléstias consideradas impeditivas pelo regulamento de defesa sanitária do país, adaptado a cada lei estadual. A qualidade das mudas de cafeeiro pode ser verificada por meio das seguintes características: número de pares de folhas verdadeiras, estas devem ter de 3 a 6 pares de folhas definitivas, diâmetro do caule, espessura de aproximadamente de 0,4mm, e bom desenvolvimento radicular (MELO, 1999; MATIELLO et al., 2005).

Portanto, o fungo *Aspergillus niger* para a aplicação do manejo da atividade agrícola, como um biofertilizante, possui alguns benefícios importantes para proporcionar um maior desenvolvimento das mudas de cafeeiro. Dentre seus mecanismos a solubilização de minerais fosfatados, aumenta a concentração de fósforo disponível para a absorção das plantas. Essa melhoria na absorção promove o crescimento vegetativo, por meio do maior desenvolvimento radicular que garante a planta abrangência e capacidade de exploração da rizosfera.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição do local

O presente trabalho foi realizado e conduzido no viveiro Santa Clara, coordenadas 18°44'59.23" S e 47°31'23.46" O, com altitude aproximada de 904 metros, e no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia (LAMIF) da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Monte Carmelo, situados no município de Monte Carmelo – Minas Gerais.

3.2 Desenvolvimento de formulação de biofertilizante com o fungo solubilizador de fosfato *Aspergillus niger*

O fungo solubilizador de fosfato *A. niger* FS1 utilizado no experimento foi obtido previamente por Mendes et al. (2014b) a partir de solo na região de Viçosa – MG. Os conídios de *A. niger* foram coletados em solução de Tween 80 a 0,01 % (v/v) a partir de culturas de até 7 dias de idade em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA). Posteriormente, essa suspensão foi filtrada a vácuo por meio de membrana com poros de 0,45 µm e o filtro com os conídios foi seco em dessecador com sílica gel no período de 24 h em temperatura ambiente (25 °C). Os conídios já secos foram armazenados em tubos eppendorf em temperatura ambiente. Durante a formulação, 36 mg de conídios, em média, foram misturados em água estéril e adicionados aos demais ingredientes (Tabela 1), formando-se uma massa uniforme. Posteriormente, a massa foi aberta e passada em máquina da marca Marcato para fabricação de macarrão estilo “bigoli” para extrusão de filamentos com diâmetro de aproximadamente 2 mm. Os filamentos foram cortados em fragmentos de 5 mm de comprimento. Os grânulos foram secos em estufa de circulação forçada de ar a 50 °C durante 48 h, até atingirem uma umidade resultante de 3%.

TABELA 1. Componentes de formulação granular de biofertilizante com *Aspergillus niger*.

Componente	Quantidade
<i>Aspergillus niger</i>	36 mg
Farinha de trigo	26,5 g
Amido de milho	3,8 g
Sacarose	2,25 g
Água	15 mL

3.3 Vida de prateleira da formulação

Os grânulos da formulação contendo *A. niger* foram acondicionados em sacos plásticos de cor preta e vedados, os quais foram armazenados em duas condições de temperatura: ambiente e geladeira, 25 °C e 4 °C, respectivamente. O período de acompanhamento foi de 180 dias, sendo a primeira amostragem realizada no 30º dia e as seguintes a cada 30 dias, totalizando-se seis avaliações. Para cada avaliação, dez grânulos foram plaqueados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e incubados em BOD a 30 °C durante três dias. Posteriormente era contabilizada a porcentagem de grânulos que geraram colônias do fungo. No dia de cada avaliação, 1 g dos grânulos era colocado em estufa a 105 °C por 24 h para obtenção de umidade na base seca. O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo que cada placa de Petri correspondeu a uma repetição. Amostras destrutivas foram coletadas em cada tempo de avaliação.

3.4 Quantificação de conídios viáveis na formulação armazenada

Ao final do período de armazenamento de 180 dias, amostras da formulação armazenadas à temperatura ambiente e geladeira foram submetidas a contagem de unidades formadoras de colônias viáveis em placa. As amostras foram colocadas à temperatura ambiente por 30 a 40 minutos antes do início da análise. As amostras foram diluídas em solução salina [NaCl 0,9 % (m/v)] com adição de 1 mL L⁻¹ de Tween 80.

Pesou-se 10 g da formulação em Erlenmeyer de 250 mL e completou-se com 90 g do diluente (corresponde à diluição 10^{-1}). A partir dela foram realizadas diluições decimais (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8}), as quais foram distribuídas em placas sobre meio BDA e incubadas em BOD a 25 °C no escuro durante 3 dias para posterior contagem do número de colônias formadas pelo *A. niger*. O resultado foi expresso em unidades formadoras de colônia por grama de formulação (UFC g⁻¹).

3.5 Desempenho da formulação na solubilização de mineral fosfatado externo

Esse experimento objetivou avaliar o efeito da formulação na solubilização de mineral fosfatado insolúvel no ambiente que circunda o grânulo. O experimento foi realizado em placas de Petri contendo meio de cultura composto por solução salina [NaCl 0,9 % (m/v)] adicionada de 5 g L⁻¹ de Ca₃(PO₄)₂ e ágar (15 g L⁻¹). O meio de cultura foi suplementado ou não com sacarose (10 g L⁻¹) para simular o efeito de exsudatos radiculares aos quais o microrganismo teria acesso na condição de campo. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave e vertido nas placas. Após solidificação do meio, foi acrescentado um grânulo da formulação no centro da placa. As placas foram incubadas em BOD a 30 °C durante 7 dias. Após esse período, os diâmetros da colônia e do halo de solubilização (Figura 2) do mineral fosfatado foram medidos.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 5 repetições.



FIGURA 2. Halo de solubilização de Ca₃(PO₄)₂ da colônia fúngica formada a partir da formulação contendo o fungo *A. niger*.

3.6 Produção de mudas de cafeeiro inoculadas com formulação granular de *Aspergillus niger*

O experimento foi conduzido no viveiro Santa Clara, entre os meses de maio e novembro de 2018. A estrutura do local para o acondicionamento das mudas apresenta altura de 2,2 m, sendo utilizada tela de sombreamento com 50% de retenção de luminosidade solar a partir da fase “palito de fósforo”. A irrigação foi feita por aspersão. A precipitação acumulada no período do experimento foi de 730,4 mm e a temperatura média foi de 21,6 °C, sendo a máxima de 24,1 °C e a mínima de 19,7 °C (dados meteorológicos da estação da empresa Cooxupé). Os tratamentos consistiram na formulação granular contendo *A. niger* mais um controle não inoculado. Dois grânulos da formulação foram dispostos antes da semeadura, em saquinhos de polietileno de 11 cm de largura e 20 cm de altura com 84 furos preenchidos com substrato, colocando os grânulos a dois centímetros abaixo de onde se colocou a semente de café da cultivar Topázio MG 1190, em profundidade de 1 cm. O substrato foi composto de esterco bovino e solo, na proporção de 1:1, e adicionado de 40 kg de fosfato monoamônio (MAP) para cada 100 m³ de substrato. A análise química do substrato pronto para semeio está descrita na Tabela 2. Os tratamentos fitossanitários, quando necessários, foram realizados de acordo com o padrão do viveiro, com exceção da aplicação de fungicida de solo.

TABELA 2. Análise química do substrato utilizado para produção de mudas de cafeeiro.

pH H ₂ O	P meh.	K	S-SO ₄ ²⁻	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H + Al	M.O	C.O
1 : 2,5		mg dm ⁻³				cmolc dm ⁻³				dag kg ⁻¹
6,9	118,7	105	18	0,27	3,4	1,4	0	2,5	2,4	1,4
SB	t	T	V	m	B	Cu	Fe	Mn	Zn	
	cmolc dm ⁻³		%				mg dm ⁻³			
5,08	5,08	7,58	67	0	0,43	2,8	20	3,3	3,6	

Aos 71 dias após a semeadura (DAS) começou a ser avaliada a porcentagem de germinação de plântulas de café. As fases “palito de fósforo” e “orelha de onça”

também foram contabilizadas, quantificando-se nos tempos de avaliação o percentual de plântulas que estava em cada fase. Quando todas as plântulas se encontraram na fase “orelha de onça”, o que levou aproximadamente 125 dias após a semeadura, quinzenalmente foram avaliadas as variáveis de crescimento vegetativo: a) altura da parte aérea, expressa em cm, medida com régua milimetrada a partir do coleto até a gema apical; b) diâmetro do coleto, expresso em mm, medido utilizando-se paquímetro com precisão de 0,01 mm; c) número de folhas, contadas do primeiro ao último par de folhas definitivas com exceção do par de folhas cotiledonares. Essas avaliações foram feitas até que as plantas fossem consideradas satisfatórias para sua inserção no campo, ou seja, contendo entre 4 a 6 pares de folhas. Ao final do período de desenvolvimento das mudas foram determinadas as seguintes características: a) volume do sistema radicular, obtido pelo deslocamento de água em proveta; b) massa seca de parte aérea e massa seca de raízes, expressas em gramas, determinadas em estufa de circulação forçada a 70 °C até peso constante; c) clorofila, expressa em SPAD, com medidor de clorofila SPAD-502 Plus (Konica Minolta). As amostras de parte aérea e de raízes, após pesagem, foram agrupadas por parcela e submetidas à análise do teor de P no tecido vegetal após digestão nitro perclórica, sendo o P determinado por ICP/AES (espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições por tratamento. Cada parcela foi composta por 10 mudas.

3.7 Análises Estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$) utilizando-se o programa Sigma Plot[®] (versão 11.0).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da formulação

Após seis meses de manutenção em temperatura ambiente ou geladeira os grânulos contendo a formulação de *A. niger* permaneceram viáveis, com índice de germinação dos mesmos de 100% (Tabela 3). A temperatura de armazenamento é um fator que afeta a vida de prateleira de biofertilizantes. Utilizando uma formulação granular com bioplástico, Accinelli et al. (2009) relataram diminuição da viabilidade dos propágulos de *Aspergillus flavus* maior a 25 °C do que em 5 °C durante o período de seis meses, esse declínio foi de 95% e 75%, respectivamente.

Formulações secas com teor de umidade acima de 5% têm sua deterioração progressivamente aumentada (COUCH; IGNOFFO, 1981). Em todos os momentos da avaliação em temperatura ambiente, exceto após 30 dias, a primeira avaliação, a umidade esteve acima de 5% (Tabela 3). No entanto, não houve inviabilização da germinação do fungo, pois ao final do período de armazenamento, a contagem de conídios viáveis foi $1,4 \times 10^5$ e 8×10^4 UFC g⁻¹ para a formulação armazenada à temperatura ambiente e geladeira, respectivamente. Esses valores podem ser considerados satisfatórios, uma vez que um único propágulo viável já seria suficiente para garantir a germinação do fungo a partir do grânulo.

A viabilidade do fungo em condição ambiente, mesmo em alguns momentos com umidade maior que a ideal, demonstrou o potencial da formulação para esse tipo de armazenamento, podendo assim ser uma opção para as empresas, de modo a diminuir o preço final do produto.

TABELA 3. Número de colônias formadas a partir de grânulos contendo *Aspergillus niger* e umidade dos grânulos submetidos a dois tipos de armazenamento e avaliados mensalmente.

Tempo (Dias)	Armazenamento	% Colônias	% Umidade
30	Ambiente	100	3,81
	Geladeira	100	2,26
60	Ambiente	100	6,41
	Geladeira	100	4,32
90	Ambiente	100	6,69
	Geladeira	100	4,99
120	Ambiente	100	5,65
	Geladeira	100	2,29
150	Ambiente	100	7,30
	Geladeira	100	4,98
180	Ambiente	100	6,11
	Geladeira	100	4,14

A formulação feita e armazenada durante seis meses foi capaz de produzir colônia do fungo *A. niger* e promover a solubilização de fosfato em meio desprovido de nutrientes (Figura 3). O halo de solubilização foi 292% maior no meio com a presença de sacarose (Figura 3A). Por outro lado, o diâmetro da colônia apresentou crescimento 156% maior em meio sem adição de sacarose (Figura 3B). Esse resultado não era esperado, já que carboidratos simples como a sacarose estimulam o crescimento fúngico por serem fontes prontamente assimiláveis de C e energia. Isso pode ser devido ao critério de avaliação adotado. As medições foram feitas até onde eram verificados os últimos conídios nas placas, dada à dificuldade de verificar a presença de hifas, que são muito finas e hialinas. Quando as condições ambientais são limitantes, por exemplo, ausência de C orgânico, o processo de conidiogênese é iniciado (JUNG et al., 2014). Dessa forma, é provável que a conidiogênese iniciou mais tardiamente na presença de sacarose e, assim, como os conídios foram usados como referência na medição, é possível que o tamanho da colônia tenha sido subestimado nessa condição.

No meio sem adição de sacarose, observa-se solubilização de fosfato ao redor do grânulo (Figura 3A). Isso demonstra que o grânulo é capaz de sustentar o crescimento e atividade do fungo, já que o meio externo não possui qualquer nutriente. A formulação possui compostos orgânicos (Tabela 1) que, além de colaborarem para a formação e estabilidade do grânulo, fornecem nutrientes e energia para o fungo. Por outro lado, pode-se constatar que a adição de sacarose no meio potencializa a solubilização de fosfato pelo fungo (Figura 3B). A solubilização de fosfatos está relacionada à capacidade dos microrganismos em produzir ácidos orgânicos (OMAR, 1998; KIM et al., 1997). Por sua vez, a produção de ácidos orgânicos é altamente dependente da disponibilidade de nutrientes, em especial o carbono orgânico (AHUJA, 2007; PAPAGIANNI et al., 2005). As fontes de carbono utilizadas são variáveis; no entanto, glicose, frutose, sacarose e xilose favorecem mais a solubilização do que maltose, galactose, celulose e amido (VORA; SHELAT, 1998; REYES et al., 1999; SILVA FILHO; VIDOR, 2000). Apesar da formulação possuir sacarose em sua composição (Tabela 1), é possível que o aumento da concentração desse componente na formulação resulte em maior eficiência em solubilização. Por outro lado, no solo, essas fontes de carbono podem ser providas pela planta por meio de exsudatos radiculares. Essa interação potencializaria a atividade do fungo, resultando em maior suprimento de P para a planta (AZCON et al., 1976; FREITAS et al., 1997; GYANESHWAR et al., 2002; GRAYSTON et al., 1996). Os exsudatos aumentam de 100 a 1000 vezes a atividade de microrganismos rizosféricos comparados aos que residem fora da rizosfera (TROEH; THOMPSON, 2007). Esses valores são compatíveis com os observados pela aplicação de sacarose no ensaio *in vitro* do presente trabalho, onde se alcançou aumento de 292% na atividade de solubilização de fosfato pelo fungo (Figura 1A).

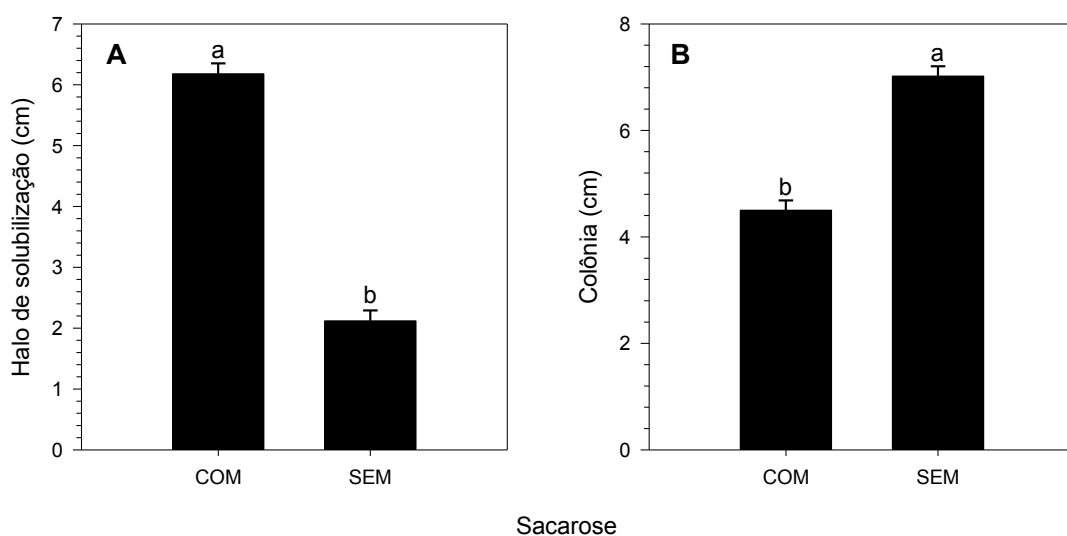


FIGURA 3. Diâmetro do halo de solubilização de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (A) e da colônia fúngica (B) formada a partir da formulação de *A. niger* na presença ou ausência de sacarose no meio. Para ambas as variáveis, colunas com letras iguais dos tratamentos com e sem sacarose não diferem significativamente entre si (teste F, $p < 0,05$). Barras de erros representam o desvio padrão da média ($n = 5$).

4.2 Avaliação da formulação no desenvolvimento de mudas de cafeeiro

A inoculação do fungo não interferiu na germinação das sementes nem nas fases posteriores de desenvolvimento da plântula, classificadas como “palito de fósforo” e “orelha de onça” (Figura 4). A germinação começou aos 70 dias após a semeadura, dentro dos parâmetros normais para a cultura do cafeeiro. Em condições de campo, um fator determinante para a germinação é a temperatura, dependendo desta variável a emergência pode ocorrer entre 50 a 120 dias após a semeadura (GUIMARÃES et al., 1998).

Assim como constatado em nosso estudo, trabalhos realizados com isolados de *Trichoderma sp.* não promoveram a emergência de plântulas de cambará-do-mato (*Gochnatia polymorpha*) (MACHADO et al., 2015). Em contradição, Kleifeld e Chet (1992) observaram a ação positiva de *Trichoderma harzianum*, em tratamento de semente e de solo, na emergência de plântulas de feijão (*Phaseolus vulgaris*), rabanete (*Raphanus sativus*), tomate (*Solanum lycopersicum*) e pepino (*Cucumis sativus*).

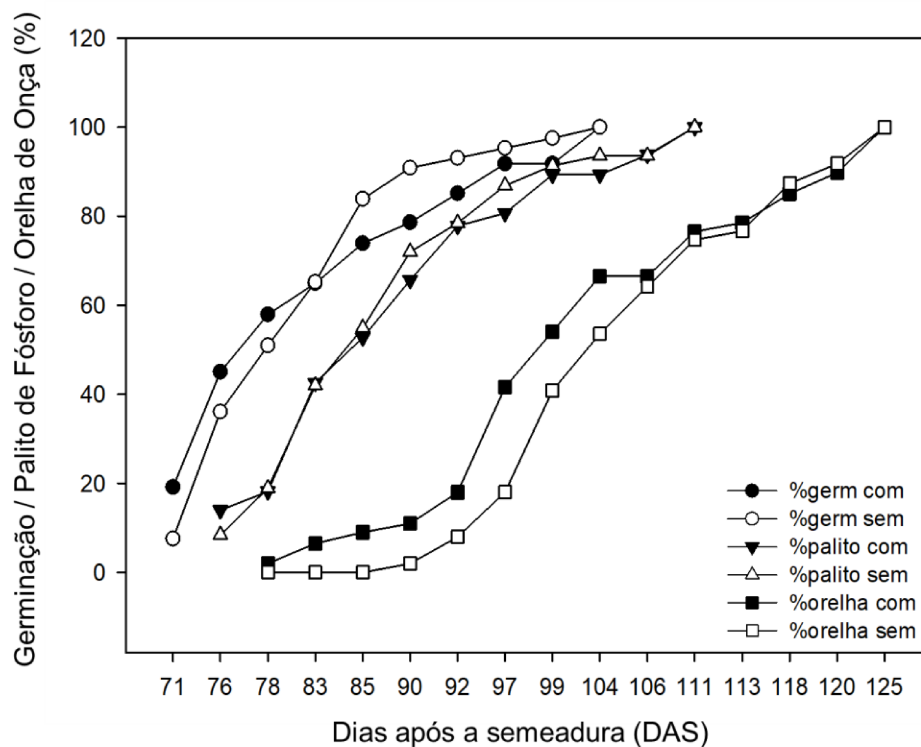


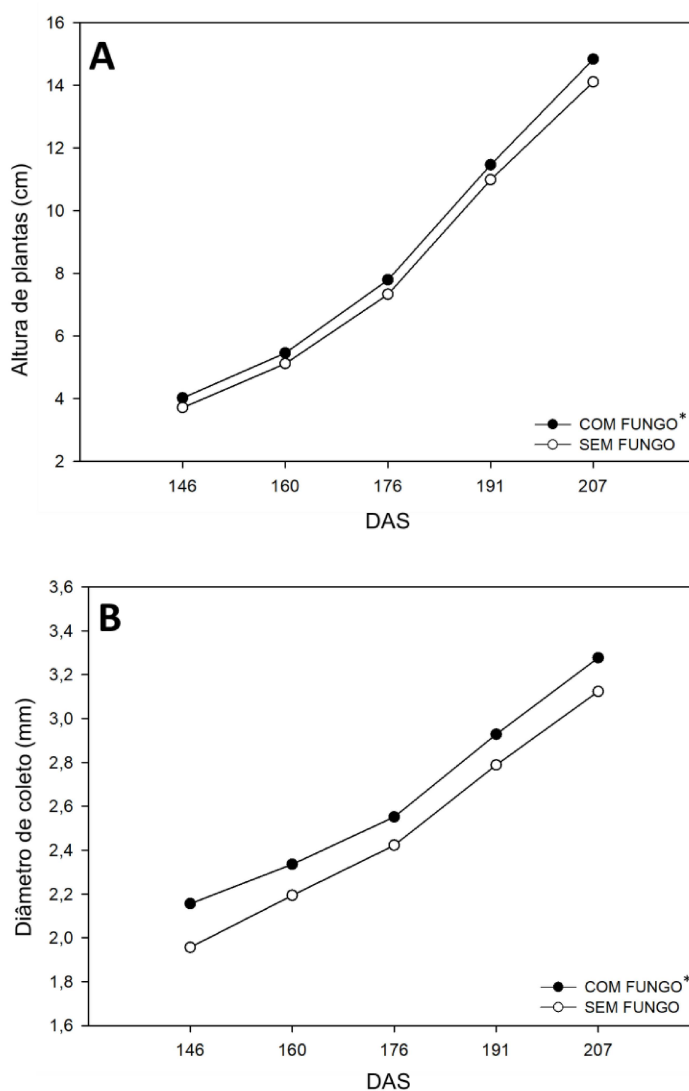
FIGURA 4. Percentagem de germinação, fase “palito de fósforo” e “orelha de onça” de plântulas de café inoculadas ou não com formulação granular contendo *Aspergillus niger*. As avaliações foram realizadas durante 54 dias, com intervalo de 5 dias. Tratamentos não diferem significativamente de acordo com o teste F ($p > 0,05$).

As plantas de café inoculadas com o isolado fúngico apresentaram, ao longo de 207 dias de crescimento em viveiro, altura, diâmetro de coleto e número de folhas superiores às plantas não inoculadas (Figura 5). Uma vez que o efeito promotor de crescimento de plantas de diversos microrganismos é reconhecido, trabalhos relatando este efeito a partir da inoculação de microrganismos de diversos gêneros podem ser encontrados para várias culturas. Entretanto, estudos com espécies perenes e, em especial, o café, são raros na literatura. No entanto, segundo Freitas e Vildoso (2004), a cultura do café é uma das espécies que podem ser beneficiadas por microrganismos promotores de crescimento.

No decorrer das avaliações as plantas inoculadas apresentaram maior altura em relação às não inoculadas, com aumento de até 5,6% (Figura 5A). Resultados semelhantes, proporcionando maior altura de mudas de café, foram observados quando inoculadas com *Azospirillum brasiliense* estirpe Cd (RICCI et al., 2005). Tendo a altura

como um dos parâmetros mais comumente avaliados no controle de qualidade de mudas (CARNEIRO, 1995; CARNEIRO et al., 2007) observa-se um satisfatório efeito da inoculação do *A. niger* sobre essa variável.

Observaram-se, em relação às plantas não inoculadas, aumentos de até 6,1% em diâmetro de coleto (Figura 5B) e 8,5% no número de folhas (Figura 5C), demonstrando a eficiência da aplicação de fungos promotores de crescimento nesse estágio tão importante para a cultura do café, que é a formação da muda. É importante salientar que o diâmetro do caule é um parâmetro de grande valor na avaliação da qualidade das mudas de cafeeiro, por representar, em parte, a capacidade de sobrevivência das mudas no campo, estando relacionada com o crescimento da parte aérea e o desenvolvimento do sistema radicular (SOUZA et al., 2006).



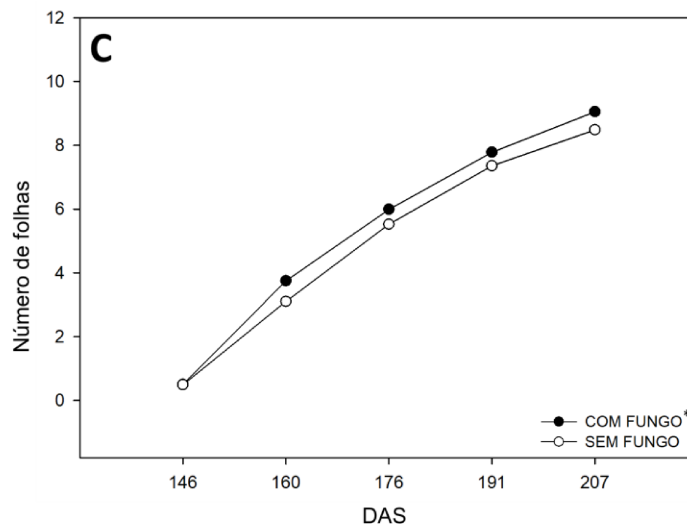


FIGURA 5. Altura de plantas (A), diâmetro de coleto (B) e número de folhas (C) de mudas de café inoculadas ou não com formulação granular contendo fungo *Aspergillus niger*. * Diferença significativa entre tratamentos (teste F, $p < 0,05$).

A melhoria no desenvolvimento das mudas em função da inoculação com o fungo também foi observada no sistema radicular. Foi constatado aumento de 13,3% na massa seca de raiz das mudas inoculadas, e de até 15,1% no volume de raízes das mesmas em comparação àsquelas não inoculadas (Tabela 4). O aumento do volume de raízes é um dos principais resultados da promoção de crescimento de plantas proporcionada por microrganismos (HARMAN, 2000). Um elevado desenvolvimento radicular pode ser um fator determinante para a sobrevivência e crescimento das mudas no campo, pois proporciona melhor eficiência no aproveitamento da água e dos nutrientes minerais do solo.

Para as variáveis Spad, massa seca de parte aérea, quantidade de fósforo no tecido da raiz e parte aérea não foi notado qualquer diferença entre o controle e o inoculado. Além disso, foi observado que o fungo não influenciou o acúmulo de P nos tecidos da parte aérea e raiz (Tabela 4). Como o substrato não apresentava limitação de P disponível, não foi possível constatar benefício da capacidade de solubilização de fosfato do fungo. Contudo, em solos com limitação de P, a inoculação de fungos solubilizadores de fosfato proporcionou aumentos de até 870 % do conteúdo total de P em plantas de *Eucalyptus grandis* (SANTOS, 2011).

TABELA 4. Características vegetativas ao final do ciclo de produção de mudas de cafeeiro inoculadas ou não com formulação contendo o fungo *Aspergillus niger*.

Tratamento	Spad	VR (cm ³)	MSR (g)	MSPA (g)	P-Raiz (g Kg ⁻¹)	P-PA (g Kg ⁻¹)
Com <i>A. niger</i>	48,20 ^{ns}	5,03 [*]	0,51 ⁺	1,71 ^{ns}	1,72 ^{ns}	2,62 ^{ns}
Sem <i>A. niger</i>	46,91 ^{ns}	4,37 [*]	0,45 ⁺	1,59 ^{ns}	1,76 ^{ns}	2,48 ^{ns}

* Significativo pelo teste F ($p < 0,05$). ⁺ Significativo pelo teste F ($p < 0,10$). ^{ns} não significativo pelo teste F. VR: volume de raiz; MSR: massa seca de raiz; MSPA: massa seca de parte aérea; P-raiz: fósforo no tecido da raiz; P-PA: fósforo no tecido da parte aérea.

Dentre os parâmetros destacados como importantes em uma muda de cafeeiro, foram alcançados valores significativos que poderão influenciar na sobrevivência da muda no solo para garantir uma boa formação da lavoura. Os parâmetros que foram incrementados pela inoculação do fungo foram altura, o diâmetro de coleto, o número de folhas, o volume e a massa seca de raízes. Dada as condições do substrato utilizado, com alta disponibilidade de P, sugere-se que os efeitos no crescimento decorrem de outros mecanismos de promoção de crescimento vegetal, que não a solubilização de fosfato. É provável que os incrementos em parte aérea e raízes decorram da síntese de fitormônios e reguladores de crescimento, tal como a giberelina, bem como de compostos voláteis estimulantes ao crescimento, conforme já demonstrado para a outro isolado de *A. niger* (SANTOS, 2011).

Os resultados obtidos demonstram grande potencial de utilização de formulação de biofertilizante com o fungo *A. niger* para a promoção de crescimento de cafeeiros. Além da capacidade de solubilização de fosfato, sugere-se que o fungo apresenta outros mecanismos de promoção do crescimento vegetal, caracterizando-se como um potencial microrganismo multifuncional, o que é altamente desejável para um biofertilizante (VASSILEV et al. 2015). O impacto do biofertilizante no cafeeiro nas etapas após o desenvolvimento da muda é uma instigante pergunta a ser respondida em experimentos futuros.

5 CONCLUSÕES

1. A formulação granular de biofertilizante contendo *A. niger* mantém alta viabilidade após armazenamento por seis meses em temperatura ambiente ou sob refrigeração, apresentando germinação de 100% dos grânulos contendo o fungo.
2. A formulação proporciona solubilização de fosfato pelo fungo no ambiente ao redor do grânulo, sendo essa atividade potencializada na presença de sacarose.
3. As mudas de cafeeiro inoculadas com *A. niger* são superiores em altura, diâmetro de coleto e número de folhas quando comparadas às não inoculadas.
4. As mudas de cafeeiro inoculadas com *A. niger* apresentam volume e massa seca de raiz superior às não inoculadas, demonstrando maior potencial para exploração do solo em busca de nutrientes e água.

REFERÊNCIAS

- ACCINELLI, C.; LUDOVICA, S. M.; ABBAS, H. K.; ZABLOTOWICZ, R. M.; WILKINSON, J. R. Use of a granular bioplastic formulation for carrying conidia of a non-aflatoxigenic strain of *Aspergillus flavus*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 17, p. 3997–4004, 1 set. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.010>
- AHUJA, A.; GHOSH, S. B.; D'SOUZA, S. F. Isolation of a starch utilizing, phosphate solubilizing fungus on buffered medium and its characterization. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 17, p. 3408–3411, dez. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.041>
- AKANDE, M. O.; ADEDIRA, J. A.; OLUWATOYINBO, F. I. **Effects of rock phosphate amended with poultry manure on soil available p and yield of maize and cowpea**. Academic Journals, 2002. v. 4
- ALIKHANI, H. A.; SALEH-RASTIN, N.; ANTOUN, H. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. In: **First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p. 35–41. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5765-6_4
- AZCON, R.; BAREA, J. M.; HAYMAN, D. S. Utilization of rock phosphate in alkaline soils by plants inoculated with mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 8, n. 2, p. 135–138, 1 jan. 1976. DOI: [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(76\)90078-X](https://doi.org/10.1016/0038-0717(76)90078-X)
- AZEVEDO, W. R.; FAQUIN, V.; FERNANDES, L. A.; OLIVEIRA JUNIOR, A. C. Disponibilidade de fósforo para o arroz inundado sob efeito residual de calcário, gesso e esterco de curral aplicados na cultura do feijão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, n. 6, p. 995–1004, dez. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832004000600008>
- BAHL, G. S.; PASRICHA, N. S. Efficiency of P utilization by pigeonpea and wheat grown in a rotation. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 51, n. 3, p. 225–229, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1009764503975>
- BASHAN, Y.; ALEXANDER, A. K.; DE BASHAN LUZ, E. A proposal for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth. **Biol Fertil Soils**, v. 49, p. 1–2, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0756-4>
- BASU, B.; BANIK, A.; DAS, M. "Produção e caracterização de protease extracelular do mutante de *Aspergillus niger* AB100 crescido em escama de peixe". **Mundial Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2007.
- BAYTAK, S.; KOÇYIGIT, A.; TÜRKER, A. R. Determination of Lead, Iron and Nickel in Water and Vegetable Samples after Preconcentration with *Aspergillus niger* Loaded on Silica Gel. **Clean - Soil, Air, Water**, v. 35, p. 607–611, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1002/clen.200700124>

- BENDAÑA, F. E. Fisiologia de las semillas de café: problemas relativos al almacenamiento, café. **Turrialba**, Turrialba, v. 4, n. 15, p. 99-106, 1962.
- BERGO, C. L.; SÁ, C. P.; SALES, F. Produção de Mudanças de Cafeeiros por Sementes e Estacas. **Circular Técnica**, Rio Branco, AC, v. 44, p. 1-10, 2002.
- BOLAN, N. S.; WHITE, R. E.; HEDLEY, M. J. A review of the use of phosphate rocks as fertilizers for direct application in Australia and New Zealand. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 30, n. 2, p. 297, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1071/EA9900297>
- BOLAN, N. S.; NAIDU, R.; MAHIMAIRAJA, S.; BASKARAN, S. Influence of low-molecular-weight organic acids on the solubilization of phosphates. **Biology and Fertility of Soils**, v. 18, n. 4, p. 311–319, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00570634>
- BOSSHARD, P.; BACHOFEN, R.; BRANDL, H. Metal leaching of fly ash from municipal waste incineration by *Aspergillus niger*. **Environmental Science and Technology**, v. 30, p. 3066-3070, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1021/es960151v>
- CARNEIRO, J. G. A. **Produção e controle de qualidade de mudas florestais**. Curitiba: UFPR/FUPEF, 1995, 451 p.
- CARNEIRO, J. G. A.; BARROSO, D. G.; SOARES, L. M. S. Crescimento de mudas em raiz nua de *Pinus taeda* L., sob cinco espaçamentos no viveiro e seu desempenho no campo. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 13, n. 3, p. 305-310, 2007.
- CHEN, Y. P.; REKHA, P. D.; ARUN, A. B.; SHEN, F. T.; LAI, W. A.; YOUNG, C. C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied Soil Ecology**, v. 34, n. 1, p. 33–41, 1 nov. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.12.002>
- CHIEN, S. H.; PROCHNOW, L. I.; TU, S.; SNYDER, C. S. Agronomic and environmental aspects of phosphate fertilizers varying in source and solubility: an update review. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 89, n. 2, p. 229–255, 28 mar. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10705-010-9390-4>
- CORDELL, D.; WHITE, S. Peak phosphorus: clarifying the key issues of a vigorous debate about long-term phosphorus security. **Sustainability**, v. 3, p. 2027–2049, 24 out. 2011. DOI: <https://doi.org/10.3390/su3102027>
- COUCH, T. L.; IGNOFFO, C. M. Formulation of insect pathogens. **Microbial control of pests and plant diseases**, p. 621-635, 1981.
- CUNHA, J. F.; CASARIN, V.; PROCHNOW, L. I. **Balanco de nutrientes na agricultura brasileira no período de 1988 a 2010**: Informações Agronômicas. Piracicaba: [s.n.]. Disponível em: <[http://www.ipni.net/publication/ia-brasil.nsf/0/9CA193D11CE9775583257A8F005D3F2C/\\$FILE/Page1-7-135.pdf](http://www.ipni.net/publication/ia-brasil.nsf/0/9CA193D11CE9775583257A8F005D3F2C/$FILE/Page1-7-135.pdf)>. Acesso em: 10 ago. 2017

DIMKPA, C.; WEINAND, T.; ASCH, F. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. **Plant, Cell & Environment**, v. 32, n. 12, p. 1682–1694, dez. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x>

EL-TARABILY, K. A.; NASSAR, A. H.; SIVASITHAMPARAM, K. Promotion of growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a calcareous soil by a phosphate-solubilizing, rhizosphere-competent isolate of *Micromonospora endolithica*. **Applied Soil Ecology**, v. 39, n. 2, p. 161–171, 1 jun. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.12.005>

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. DE. Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 2ª Edição. **Editora da Universidade de Caxias do Sul - RS: EDUCS**, 2010.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. How to feed the World in 2050. Disponível em http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050, Acesso em: 03 mar. 2018.

FARHAT, M. B.; FARHAT, A.; BEJAR, W.; KAMMOUN, R.; BOUCHAALA, K.; FOURATI, A.; ANTOUN, H.; BEJAR, S.; CHOUAYEKH, H. Characterization of the mineral phosphate solubilizing activity of *Serratia marcescens* CTM 50650 isolated from the phosphate mine of Gafsa. **Archives of Microbiology**, v. 191, p. 815-824, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00203-009-0513-8>

FREITAS, J. R.; BANERJEE, M. R.; GERMIDA, J. J. Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not uptake of canola (*Brassica napus* L.). **Biology and Fertility of Soils**, v. 24 p. 358-364, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1007/s003740050258>

FREITAS, S. S.; VILDOSO, C. I. A. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, n. 6, p. 987–994, dez. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832004000600007>

FRIEDMAN, J.; WALLER, G. R. Caffeine hazards and their prevention in germinating seeds of coffee (*Coffea arabica* L.). **Seed Science Research**, v. 9, p. 1099-1106, 1983. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00982214>

GAIND, S. *Pseudomonas striata* for Improving phosphorus availability in soil under pearl millet cultivation. **Journal of Crop Improvement**, v. 27, n. 3, p. 255–271, 4 maio 2013. DOI: <https://doi.org/10.1080/15427528.2012.760026>

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1–15, 11 out. 2012. DOI: <https://doi.org/10.6064/2012/963401>

GLICK, B. R. Introduction to plant growth-promoting bacteria. In: **Beneficial Plant-Bacterial Interactions**. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 1–28. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-13921-0_1

GODFRAY, H. C. J.; BEDDINGTON, J. R.; CRUTE, I. R.; HADDAD, L.; LAWRENCE, D.; MUIR, J. F.; PRETTY, J.; ROBINSON, S.; THOMAS, S. M.;

TOULMIN, C. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. **Science (New York, N.Y.)**, v. 327, n. 5967, p. 812–818, 12 fev. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1185383>

GRAYSTON, S. J.; VAUGHAN, D.; JONES, D. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. **Applied Soil Ecology**, v. 5, n. 1, p. 29–56, 1 jan. 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(96\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(96)00126-6)

GROVER, M.; ALI, S. K. Z.; SANDHYA, V.; RASUL, A.; VENKATESWARLU, B. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 1231–1240, 5 maio 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0572-7>

GUIMARÃES, R. J. **Formação de mudas de cafeeiro: (*Coffea arabica* L.): efeitos de reguladores de crescimento e remoção do pergaminho na germinação de sementes e do uso de N e K em cobertura, no desenvolvimento de mudas.** 1995. 133 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1995.

GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G. Produção de mudas de cafeeiro. In: MENDES, A. N. G.; GUIMARÃES, R. G. (Eds.). **Cafeicultura empresarial: produtividade e qualidade.** Lavras: UFLA/FAEPE, p. 1-60, 1998.

GYANESHWAR, P.; KUMAR, G. N.; PAREKH, L. J.; POOLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v. 245, n. 1, p. 83–93, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1020663916259>

HALDER, A. K.; MISHRA, A. K.; BHATTACHARYYA, P.; CHAKRABARTTY, P. K. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. **Journal Genetics Applied Microbiology**, v. 36, p. 81-92, 1990. DOI: <https://doi.org/10.2323/jgam.36.81>

HAMEEDA, B.; HARINI, G.; RUPELA, O. P.; WANI, S. P.; REDDY, G. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. **Microbiological Research**, v. 163, n. 2, p. 234–242, mar. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.05.009>

HAMMOND, L. L.; CHIEN, S. H.; EASTERWOOD, G. W. Agronomic effectiveness of bayovar phosphate rock in soil with induced phosphorus retention1. **Soil Science Society of America Journal**, v. 50, n. 6, p. 1601-1606, 1986. DOI: <https://doi.org/10.2136/sssaj1986.03615995005000060044x>

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v.84, n.4, p.376-393, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.4.377>

HAVLIN, J. L.; TISDALE, S. L.; NELSON, W.L.; BEATON, J.D. **Soil fertility and fertilizers : an introduction to nutrient management.** Pearson Prentice Hall, 2005.

HOLFORD, I. C. R. Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. **Soil**

- Research**, v. 35, n. 2, p. 227-239, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1071/S96047>
- JAIN, R.; SAXENA, J.; SHARMA, V. The evaluation of free and encapsulated *Aspergillus awamori* for phosphate solubilization in fermentation and soil-plant system. **Applied Soil Ecology**, v. 46, n. 1, p. 90-94, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.06.008>
- JONES, K. A.; BURGESS, H. D. Technology of formulation and application. In: **Formulation of Microbial Biopesticides**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1998. p. 7-30. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-011-4926-6_2
- JUNG, B.; KIM, S.; LEE, J. Microcycle conidiation in filamentous fungi. **Mycobiology**, v. 42, n. 1, p. 1-5, mar. 2014. DOI: <https://doi.org/10.5941/MYCO.2014.42.1.1>
- KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; AHMED, M.; OVES, M.; WANI, P. A. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 56, n. 1, p. 73-98, fev. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1080/03650340902806469>
- 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**, v. 24, n. 4, p. 347-352, 5 maio 1997. DOI: <https://doi.org/10.1007/s003740050256>
- KLEIFELD, O.; CHET, I. *Trichoderma harzianum*? interaction with plants and effect on growth response. **Plant and Soil**, v. 144, n. 2, p. 267-272, ago. 1992. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00012884>
- KOLAWOLE, G. O.; TIAN, G. Phosphorus fractionation and crop performance on an alfisol amended with phosphate rock combined with or without plant residues. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 1972-1978, 2007. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB2007.000-2301>
- KUCEY, R. M. N. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin alberta soils. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 63, n. 4, p. 671-678, nov. 1983. DOI: <https://doi.org/10.4141/cjss83-068>
- LANA, R. M. Q.; ZANÃO JUNIOR, L. A.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, J. C. Produção da alface em função do uso de diferentes fontes de fósforo em solo de cerrado. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 525-528, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-05362004000300004>
- LIN, T. F.; HUANG, H.; SHEN, F. T.; YOUNG, C. C. The protons of glucônico acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-A174. **Bioresource Tecnology**, v. 97, p. 957-960, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.017>
- LOPES, A. S.; SILVA, C. A. P da; BASTOS, A. R. Reservas de fosfatos e produção de fertilizantes fosfatados no Brasil e no Mundo. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. S. e (Ed.). **Anais do Simpósio sobre Fósforo na Agricultura Brasileira**. Piracicaba:

POTAFOS, 2004. p. 13-34.

LÓPEZ-BUCIO, J.L.; HERNÁNDEZ-ABREU, E.; SÁNCHEZ-CALDERÓN, L.; NIETO-JACOBO M.F.; SIMPSON, J.; HERRERA-ESTRELLA, L. Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the Arabidopsis root system. **Plant physiology**, v. 129, n. 1, p. 244–56, 1 maio 2002. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.010934>

MACHADO, D. F. M.; TAVARES, A. P.; LOPES, S. J.; SILVA, A. C. F. *Trichoderma* spp. na emergência e crescimento de mudas de cambará (*Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabrera)¹. **Revista Árvore**, v. 39, n. 1, p. 167–176, fev. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-67622015000100016>

MALUSÁ, E.; SAS-PASZT, L.; CIESIELSKA, J. Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. **TheScientificWorldJournal**, v. 2012, p. 491206, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1100/2012/491206>

MARRA, L. M.; OLIVEIRA, S. M.; SOARES, C. R. F. S.; MOREIRA, F. M. S. Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 5, p. 603–609, out. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-90162011000500015>

MARRA, L. M.; SOARES, C. R. F. S.; OLIVEIRA, S. M.; FERREIRA, P. A. A.; SOARES, B. L.; CARVALHO, R. F.; LIMA, J. M.; MOREIRA, F. M. S. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, v. 357, n. 1–2, p. 289–307, 3 ago. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1157-z>

MATIELLO, J. B.; SANTINATO, R.; GARCIA, A.W.R.; ALMEIDA, S. R.; FERNANDES, D.R. **Cultura do café no Brasil: novo manual de recomendações**. Varginha: PROCAFÉ, 2005, 438p.

MELO, B. **Estudos sobre produção de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) em tubetes**. 1999. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MENDES, G. O.; FREITAS A. L. M.; PEREIRA O. L.; SILVA, I. R.; VASSILEV, N. B.; COSTA, M. D. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 239–249, 2014b. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0656-3>

MENDES, G. O.; FREITAS A. L. M.; PEREIRA O. L.; SILVA, I. R.; VASSILEV, N. B.; COSTA, M. D. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 239–249, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0656-3>

MOREIRA, A.; MALAVOLTA, E.; VIRGENS FILHO, A. C.; SILVEIRA, R. L. V. A.; ABREU, J. B. R. Avaliação da disponibilidade do fósforo no solo por métodos isotópico, químicos e biológicos. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 54, p. 1-2, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-90161997000100011>

NAHAS, E. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 12, n. 6, p. 567–572, nov. 1996. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00327716>

OMAR, S. A. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular–arbuscular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 211–218, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1008830129262>

PAPAGIANNI, M.; WAYMAN, F.; MATTEY, M. Fate and role of ammonium ions during fermentation of citric acid by *Aspergillus niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7178–7186, 1 nov. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7178-7186.2005>

PAPAGIANNI, M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 244–263, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.01.002>

PEIX, A.; RIVAS, R.; MATEOS, P. F.; MOLINA-MARTÍNEZ, E.; BARRUECO RODRIGUEZ, C.; VELÁZQUEZ, E. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 103–110, 1 jan. 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00120-6](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00120-6)

POWELL, J. M.; GOURLEY, C. J. P.; ROTZ, C. A.; WEAVER, D. M. Nitrogen use efficiency: A potential performance indicator and policy tool for dairy farms. **Environmental Science & Policy**, v. 13, n. 3, p. 217–228, maio 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2010.03.007>

PRICE, M. S.; CLASSEN, J. J.; PAYNE, G. A. *Aspergillus niger* absorbs copper and zinc from swine wastewater. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 41–49, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00135-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00135-8)

PROCHNOW, L. I.; ALCARDE, J. C.; CHIEN, S. H. Eficiência agrônômica dos fosfatos totalmente acidulados. In: SIMPÓSIO FÓSFORO NA AGRICULTURA BRASILEIRA, 2003, São Pedro. **Anais...** São Pedro: POTAFOS; ANDA, 2003. 726 p.

REDDY, D. D.; RAO, A. S.; REDDY, K. S.; TAKKAR, P. N. Yield sustainability and phosphorus utilization in soybean-wheat system on Vertisols in response to integrated use of manure and fertilizer phosphorus. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 62, p. 181–190, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00019-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00019-2)

RENA, A. B.; MAESTRI, M. Fisiologia do Cafeeiro. In: SIMPÓSIO SOBRE FATORES QUE AFETAM A PRODUTIVIDADE DO CAFEEIRO, 1986, Poços de Caldas. **Anais...** Piracicaba: POTAFÓS, 1986. p. 13–85.

REYES, I.; BERNIER, L.; SIMARD, R. R.; TANGUAY, P.; ANTOUN, H. Characteristics of phosphate solubilization by an isolate of a tropical *Penicillium rugulosum* and two UV- induced mutants. **Microbiology. Ecology**, v.28, p.291–295,

1999. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00584.x>

RHODES, D. J. Formulation of biological control agents. *In: Exploitation of Microorganisms*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1993. p. 411–439. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-011-1532-2_16

RICCI, M. S. F.; COSTA, J. R.; REIS, V. M.; OLIVEIRA, F. F.; SILVA, M. F.; RODRIGUES, L. F. C. Promoção de Crescimento de Mudas de Café (*Coffea arabica*) Inoculadas com *Azospirillum brasilense* Estirpe Cd. **Circular Técnica**, Seropédica, RJ, v. 11, p. 1-6, 2005.

RICHA, G.; KHOSLA, B.; REDDY, M. S. Improvement of maize plant growth by phosphate solubilizing fungi in rock phosphate amended soils. **World Journal of Agricultural Sciences**, Oxford, v. 3, p. 481-484, 2007

RICHARDSON, A. E. Prospects for using soli microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 28, p. 897-906, 2001.

RICHARDSON, A.; BAREA, J. M.; MCNEILL, A.; PRIGENT-COMBARET, C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and Soil**, v. 321, p. 305-339, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9895-2>

ROBERTS, T. L. Improving nutrient use efficiency. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 32, p. 177–182, 2008.

ROBERTS, T. L. The role of fertilizer in growing the world's food. **Better Crops**, v. 93, p. 12–15, 2009.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 4–5, p. 319–339, 1 out. 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2)

ROY, E. D.; RICHARDS, P. D.; MARTINELLI, L. A.; COLETTA, L. D.; LINS, S. R. M.; VAZQUEZ, F. F.; WILLIG, E.; SPERA, S. A.; VANWEY, L. K.; PORDER, S. The phosphorus cost of agricultural intensification in the tropics. **Nature Plants**, v. 2, n. 5, p. 16043, 18 maio 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.43>

SANTINATO, R.; SILVA, V.A. **Tecnologias para produção de mudas de café**. Belo Horizonte: O Lutador, 2001. 116p.

SANTOS, M. L. **Prospecção de fungos promotores de crescimento vegetal na rizosfera de eucalipto**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011.

SATTARI, S. Z.; BOUWMAN, A. F.; GILLER, K. E.; VAN ITTERSUM, M. K. Residual soil phosphorus as the missing piece in the global phosphorus crisis puzzle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 16, p. 6348–6353, 17 abr. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1113675109>

SCERVINO, J. M.; MESA, M. P.; MONICA, I. D.; RECCHI, M.; MORENO, N. S.; GODEAS, A. Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. **Biology and Fertility of Soils**, v. 46, n. 7, p. 755–763, 14 set. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0482-8>

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fostatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, n. 2, p. 311–319, jun. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832000000200008>

SILVA FILHO, G. N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 6, p. 847–854, jun. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2002000600014>

SILVA, E. A. A. **Coffee (*Coffea arabica* L., cv. Rubi) seed germination: mechanism and regulation**. 2002. Thesis (PhD) - Wageningen University, Wageningen, 2002.

SOUZA, C.A.M.; OLIVEIRA, R.B.; MARTINS FILHO, S.; LIMA, J.S.S. Crescimento em campo de espécies florestais em diferentes condições de adubação. **Ciência Florestal**, Curitiba, v. 16, n. 3, p. 243–249, 2006. DOI: <https://doi.org/10.5902/198050981905>

STAMFORD, N. P.; SANTOS, P. R.; SANTOS, C. E. S.; FREITAS, A. D. S.; DIAS, S. H. L.; LIRA JUNIOR, M. A. Agronomic effectiveness of biofertilizers with phosphate rock, sulphur and *Acidithiobacillus* for yam bean grown on a Brazilian tableland acidic soil. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 6, p. 1311–1318, abr. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.04.037>

STUMM, W.; MORGAN, J. J. **Aquatic Chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters**. 3.ed. Wiley, New York, 1995. 1022 p.

TAVARES JUNIOR, J. E. **Volume e granulometria do substrato na formação de mudas de café**. 2004. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)—Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2004.

TILMAN, D.; BALZER, C.; HILL, J.; BEFORT, B. L. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 50, p. 20260–20264, 13 dez. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1116437108>

TORRES, V. L.; OLIVEIRA NETO, J. D.; KASSAI, S. **Gestão de custos na cafeicultura: uma experiência na implantação de projetos**. 2000. Disponível em: <http://www.cpq.fearp.usp.br/pdf/cont/wpc05.pdf>. Acesso em: 13 maio 2019.

TROEH, R. F.; THOMPSON, L. M. **Solos e fertilidade do solo**. São Paulo: Andrei, 2007. 718p.

VALIO, I. F. M. Germination of coffee seeds (*Coffea arabica* L.), cv. Mundo Novo. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 27, n. 100, p. 983–991, Oct. 1976. DOI:

<https://doi.org/10.1093/jxb/27.5.983>

VAN WEES, S. C.; VAN DER ENT, S.; PIETERSE, C. M. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 4, p. 443–448, ago. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.05.005>

VASSILEV, N.; NIKOLAEVA, I.; VASSILEVA, M. Polymer-based Preparation of Soil Inoculants: Applications to Arbuscular Mycorrhizal Fungi. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 4, n. 4, p. 235–243, nov. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11157-005-2098-2>

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; LOPEZ, A.; MARTOS, V.; REYES, A.; MAKSIMOVIC, I.; EICHLER- LÖBERMANN, B.; MALUSA, E. Unexploited potential of some biotechnological techniques for biofertilizer production and formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 12, p. 4983–4996, 9 jun. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6656-4>

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571–586, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>

VORA, M. S.; SHELAT, H. N. Impact of addition of different carbon and nitrogen sources on solubilization of rock by phosphate-solubilizing micro-organisms. **Indian Journal Agricultural Science.**, v. 68, n.6, p.292-294, 1998.

WALLER, G. R.; KUMARI, D.; FRIEDMAN, J.; FRIEDMAN, N.; CHOU, C. H. Caffeine Autotoxicity in *Coffea arabica* L. In: _____. **The science of allelopathy**. New York: J. Wiley and Sons, 1986. p. 243-263.

WHITELAW, M. A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. **Advances in Agronomy**, v. 69, p. 99–151, 1 jan. 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60948-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60948-7)

WILLIAMS, J. P.; HALLSWORTH, J. E. Limits of life in hostile environments: no barriers to biosphere function? **Environmental Microbiology**, v. 11: p. 3292–3308, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02079.x>

XIAO, C. Q.; ZHANG, H. X.; FANG, Y. J.; CHI, R. A. Evaluation for rock phosphate solubilization in fermentation and soil–plant system using a stress-tolerant phosphate-solubilizing *Aspergillus niger* WHAK1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 1, p. 123–133, 16 jan. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9967-2>

ZAPATA, E.; ROY, R. N. Use of phosphate rocks for sustainable agriculture. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2004, 172 p.

ZENG, Q.; LUO, F.; ZHANG, Z.; YAN, R.; ZHU, D. Phosphate solubilizing rhizosphere bacterial T21 isolated from dongxiang wild rice species promotes cultivated rice growth. **Applied Mechanics and Materials**, v. 108, p. 167–175, out. 2011. DOI: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.108.167>