

PATRICK VIEIRA SILVA

CARACTERIZAÇÃO E USO DE FORMULAÇÃO DE BIOFERTILIZANTE À BASE DE
Aspergillus niger

MONTE CARMELO
MINAS GERAIS – BRASSIL

2022

PATRICK VIEIRA SILVA

CARACTERIZAÇÃO E USO DE FORMULAÇÃO DE BIOFERTILIZANTE À BASE DE
Aspergillus niger

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agricultura e informações Geoespaciais para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador:

Prof. Dr. Gilberto de Oliveira Mendes

MONTE CARMELO
MINAS GERAIS – BRASSIL
2022

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S586 2022	<p>Silva, Patrick Vieira, 1993- Caracterização e uso formulação de biofertilizante à base de <i>Aspergillus niger</i> [recurso eletrônico] / Patrick Vieira Silva. - 2022.</p> <p>Orientador: Gilberto de Oliveira Mendes. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.144 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Agronomia. I. Mendes, Gilberto de Oliveira, 1983-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 631</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Agricultura e Informações Geoespaciais				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico				
Data:	25/02/2022	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	16:50
Matrícula do Discente:	32012AIG011				
Nome do Discente:	Patrick Vieira Silva				
Título do Trabalho:	Caracterização e uso de formulação de biofertilizante à base de <i>Aspergillus niger</i>				
Área de concentração:	Informações geoespaciais e tecnologias aplicadas à produção agrícola				
Linha de pesquisa:	Sistemas integrados de produção vegetal				

Reuniu-se na sala virtual <https://teams.live.com/meet/9360549697336> a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais, assim composta: Dr. Bruno Sérgio Vieira (UFU), Dr. Carlos Marcelo Silveira Soares (NOOA Ciência e Tecnologia Agrícola Ltda), Dr. Gilberto de Oliveira Mendes (UFU) – orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Gilberto de Oliveira Mendes, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu a discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.





Documento assinado eletronicamente por **Bruno Sergio Vieira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 25/02/2022, às 17:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Marcelo Silveira Soares, Usuário Externo**, em 07/03/2022, às 06:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3403431** e o código CRC **0D2C76BA**.

Dedico

A Deus como alicerce e Maria por sua intercessão.

Aos meus filhos Caíque e Henrique, que nesse momento estão na UTI neonatal lutando para se recuperarem da prematuridade.

A minha esposa Jessica Santos da Silva, aos meus pais Valtemir Vieira Diniz e Divina Rosa da Silva Diniz, meu irmão Valdemir Vieira Silva, meus avós Jair Rosa da Silva e Virginia Alves da Silva,

*“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos
dia após dia.” (Robert Collier)*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por iluminar meus caminhos trilhados e pelas infinitas bênçãos. A Maria Santíssima por interceder sobre mim.

A todos que contribuíram direta e indiretamente na construção deste manuscrito, amigos, familiares, profissionais, professores, técnicos e demais contribuintes, pessoas incríveis que me auxiliaram e muito me ensinaram.

A minha esposa Jessica Santos Silva que me ajudou em diversos momentos na coleta de resultados em laboratório e a campo, por seu incentivo e compreensão da minha ausência. Aos meus filhos, Caique e Henrique, como incentivadores para a conclusão deste trabalho. A prima de minha esposa Larissa Mendes, pela contribuição na montagem do experimento de tempo de prateleira do biofertilizante.

Aos meus pais Valtemir Vieira Diniz e Divina Rosa da Silva Diniz, meu irmão Valdemir Vieira Silva, avós Jair Rosa da Silva e Virginia Alves da Silva, pelo incentivo, acolhimento e carinho. Em destaque para minha mãe, que me auxiliou na coleta de dados no campo, agradeço.

Ao meu professor Dr. Gilberto de Oliveira Mendes pela orientação deste manuscrito, pelo incentivo, dedicação, sugestões, apoio e conselhos que levarei para o resto de minha vida.

Aos professores Dr. Gabriel Mascarenhas Maciel e Dr. Rodrigo Gallis pelo auxílio na montagem dos experimentos, execução de análises e colaboração.

Aos professores Dr. Enio Tarso de Souza Costa e Dr. Edmar Isaias de Melo pelo empréstimo de equipamentos de laboratório e pelas conversas e conselhos.

Aos técnicos de laboratório Thúlio Mattos e Paulo Magalhães pelo auxílio na execução de análises, momentos de conversas e conselhos.

Aos membros do Grupo de Estudos em Melhoramento Genético de Hortaliças (GEN-HORT), na execução e coleta de dados de campo para o trabalho com a cultura da alface, em especial aos amigos Gustavo Mundim, Lucas Medeiros, Thúlio Mattos e Camila Soares. Ao meu amigo e padrinho Jhonatta Miato pelo auxílio no manejo da alface. Aos funcionários da Estação Experimental de hortaliças, em especial ao senhor Jose Marques Vilela, ao qual muito auxiliou na condução do experimento.

Ao amigo Renan Zampirolli pelo auxílio e disponibilização do equipamento e de seu tempo para a captação de imagens aéreas do experimento de alface.

A empresa NOOA, pelo financiamento do projeto, à toda equipe no auxílio na condução do experimento com a cultura do feijão em estufa, em especial aos profissionais Marcelo, Cícero e Aurélio.

Ao grupo de estudos em Microbiologia Agrícola, com os discentes e amigos Ana Laura, Gustavo Mundim, Jordana Stein, Larissa Rocha e Pedro, pelos momentos de reuniões, reflexões e amizade.

Aos demais participantes do Laboratório em Microbiologia e Fitopatologia, professores Dr. Bruno Sergio Vieira e Dr. André Luiz Firmino, discentes Adrianly Pena, Analis, Claudia e Vínicius, pelos auxílios, conversas e reflexões.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais, aos professores, técnicos e demais funcionários, pela disponibilização do espaço físico, área experimental, materiais para o desenvolvimento da pesquisa e por todo o conhecimento a mim repassado.

Muito obrigado a todos!

BIOGRAFIA

Patrick Vieira Silva nasceu em 24 de outubro de 1993. Cresceu na cidade de Monte Carmelo com seus pais Valtemir Vieira Diniz e Divina Rosa da Silva Diniz, irmão Valdemir Vieira Silva e avós maternos Jair Rosa da Silva e Virginia Alves da Silva. Sempre estudou em escolas públicas cursando o ensino básico na Escola Estadual Ordália Rocha entre 2000 e 2003 e o ensino fundamental e médio na Escola Estadual Gregoriano Canedo entre os anos 2004 e 2010. Começou a trabalhar desde novo, logo aos 13 anos de idade passando por uma loja de utilidades, farmácia e venda de bilhetes rodoviários até 2011, ano na qual ingressou na primeira turma do curso de Agronomia do Campus Monte Carmelo da Universidade Federal de Uberlândia. Durante o período de graduação participou de diversos eventos como seminários, simpósios e congressos, realizou monitorias nas disciplinas de Matemática 1 e Química Orgânica, participou de projetos de iniciação científica com bolsa na área de química do solo. Concluiu a graduação no ano de 2015. Ingressou no mercado de trabalho no ano de 2016 na empresa Suprema Agronegócios, localizada em Monte Carmelo, lugar onde realizou o estágio supervisionado. No ano de 2017, foi promovido a assistente técnico de vendas da Microgeo exclusivo da mesma empresa e, ficou responsável pelo desenvolvimento técnico e prospecção do produto na região de Monte Carmelo até o ano de 2020, ao qual ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais no Campus Monte Carmelo da Universidade Federal de Uberlândia. Participou de diversos eventos como simpósios, congressos, cursos online e presenciais, contribuiu na organização do Simpósio de Ciências Agrárias e Ambientais 2021, projetos de extensão e foi bolsista da NOAA/FAU. Atuou nas áreas de microrganismos promotores de crescimento e solubilização de fósforo, agricultura de precisão e sensoriamento remoto. Casou-se em novembro de 2021 com sua esposa Jessica Santos da Silva, e teve os filhos Caíque e Henrique no dia 06 de fevereiro de 2022. Iniciou uma jornada de trabalho em dezembro de 2021 na empresa Santa Clara Agrociência desenvolvendo trabalhos de campo na região de Monte Carmelo e São Gotardo, com culturas de café, cereais e hortifruti.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1	2
Referencial teórico geral	2
1.1 Fósforo	2
1.2 Microrganismos solubilizadores de fosfato	3
1.3 Formulações de biofertilizantes	4
REFERÊNCIAS	7
CAPÍTULO 2	12
Vida de prateleira e compatibilidade de fertilizantes com o biofertilizante à base de <i>Aspergillus niger</i>	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1 Caracterização da formulação.....	14
2.1.1 Desenvolvimento da formulação do biofertilizante.....	14
2.2.2 Número de propágulos viáveis do fungo e capacidade de solubilização	15
2.3 Compatibilidade com fertilizantes	18
2.4 Análise estatística	19
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
3.1 Caracterização da formulação.....	19
3.2 Compatibilidade com fertilizantes	22
4 CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS	24
CAPÍTULO 3	27
Produção de alface inoculada com <i>Aspergillus niger</i> sob diferentes doses de fósforo	27
1 INTRODUÇÃO	28
2 MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1 Local do experimento	29
2.2 Produção dos inoculantes com o fungo <i>Aspergillus niger</i>	31
2.3 Delineamento experimental	32
2.4 Fenotipagem por imagem e avaliação agronômica no campo	34
2.5 Análises estatísticas.....	35

2.6 Processamento de imagem	35
3 RESULTADOS	36
4 DISCUSSÃO	44
REFERÊNCIAS	47
CAPÍTULO 4	52
Desenvolvimento de feijoeiro inoculado com <i>Aspergillus niger</i> sob diferentes doses de adubos fosfatados.....	52
1 INTRODUÇÃO	53
2 MATERIAL E MÉTODOS	54
2.1 Local do experimento	54
2.2 Delineamento experimental	54
2.3 Produção e aquisição dos inoculantes de microrganismos solubilizadores de fósforo	55
2.4 Desenvolvimento do experimento.....	56
2.5 Avaliações	57
2.6 Análises estatísticas.....	57
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4 CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS	62

RESUMO

SILVA, PATRICK VIEIRA. **Caracterização e uso de formulação de biofertilizante à base de *Aspergillus niger***. 2022, 64 páginas. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Informações Geoespaciais) – Universidade Federal de Uberlândia, *Campus* Monte Carmelo, Minas Gerais, Brasil¹.

Aspergillus niger apresenta potencial para solubilizar compostos de fosfato inorgânico insolúveis e para a promoção de crescimento de plantas. Diante disso, este trabalho teve como objetivo caracterizar uma formulação granular a base de *A. niger* quanto ao seu tempo de prateleira, avaliar a compatibilidade com fertilizantes e determinar o seu potencial na promoção de crescimento de plantas de alface e feijão. Os resultados indicam que a formulação pode ser armazenada em temperatura ambiente ou geladeira por, no mínimo, 6 meses. O biofertilizante se mostra compatível para crescimento do fungo com ureia, cloreto de potássio, superfosfato simples, superfosfato triplo e organomineral. Para a compatibilidade em meio líquido, a ureia inibiu a solubilização de fosfato. Demais fertilizantes foram compatíveis, enquanto o cloreto de potássio e o organomineral contribuíram para maior porcentagem de solubilização. A inoculação de sementes com *A. niger* pode ser utilizada em diferentes doses de P para a promoção de crescimento de alface. Na dose de 100%, os diferentes métodos de inoculação contribuíram para valores superiores nos parâmetros de diâmetro da planta, índice SPAD, peso fresco e quantidade de folhas. No feijoeiro, o microrganismo *A. niger* contribuiu para o desenvolvimento das plantas, promovendo maior número de folhas, altura, quantidade de nódulos, peso seco da parte aérea e das raízes. A formulação WG usada no tratamento de sementes foi superior à formulação granular. *Aspergillus niger* se mostra compatível com o inoculante de fixação biológica de nitrogênio, além de contribuir no acréscimo de quantidade de nódulos por planta. A fonte e dose de adubo fosfatado que garantiu maiores incrementos nos parâmetros avaliados foi o superfosfato triplo com 100% da necessidade da planta. O biofertilizante contendo o fungo *A. niger* apresenta potencial para armazenamento durante o período de 6 meses sem perder suas características, compatibilidade com fertilizantes e promoção de crescimento de plantas de alface e feijão.

Palavras-chave: Promoção de crescimento; solubilização de fosfato; nutrição; sustentabilidade; orgânico; bioinsumo.

¹Orientador: Prof. Dr. Gilberto de Oliveira Mendes - UFU

ABSTRACT

SILVA, PATRICK VIEIRA. **Characterization and use of a biofertilizer formulation with *Aspergillus niger***. 2022, 64 pages. Dissertation (Master in Agriculture and Geospatial Information) – Federal University of Uberlândia, Campus Monte Carmelo, Minas Gerais, Brazil¹.

Aspergillus niger has the potential to solubilize insoluble inorganic phosphate compounds and to promote plant growth. Therefore, this work aimed to characterize a granular formulation based on *A. niger* in terms of its shelf life, evaluate its compatibility with fertilizers and determine its potential in promoting the growth of lettuce and bean plants. The results indicate that the formulation can be stored at room temperature or in the refrigerator for at least 6 months. The biofertilizer is compatible for fungal growth with urea, potassium chloride, single superphosphate, triple superphosphate and organomineral. For compatibility in liquid medium, urea inhibited phosphate solubilization. Other fertilizers were compatible, while potassium chloride and organomineral contributed to a higher percentage of solubilization. Seed inoculation with *A. niger* can be used at different doses of P to promote lettuce growth. At the 100% dose, the different inoculation methods contributed to higher values in the parameters of plant diameter, SPAD index, fresh weight and number of leaves. In common bean, the microorganism *A. niger* contributes to plant development, promoting greater number of leaves, height, number of nodules, dry weight of shoots and roots. The WG formulation used in the seed treatment was superior to the granular formulation. *Aspergillus niger* is compatible with the inoculant for biological nitrogen fixation, in addition to contributing to the increase in the number of nodules per plant. The source and dose of phosphate fertilizer that ensured greater increases in the parameters evaluated was triple superphosphate with 100% of the plant's need. The biofertilizer containing the fungus *A. niger* has potential for storage during the period of 6 months without losing its characteristics, compatibility with fertilizers and growth promotion of lettuce and beans plants.

Keywords: Growth promotion; phosphate solubilization; nutrition; sustainability; organic; bioinput.

¹Adviser: Prof. Dr. Gilberto de Oliveira Mendes - UFU

INTRODUÇÃO GERAL

A absorção e utilização do nutriente fósforo (P) pelas plantas representa papel importantíssimo no rendimento final de produção das culturas (FILIPPELLI, 2008; SHEN et al., 2011). A baixa disponibilidade deste é realidade em grande parte dos solos (NIU et al., 2013). Microrganismos são capazes de solubilizar compostos de fosfato inorgânico insolúveis, demonstrando potencial de disponibilizar o P para as plantas no solo. De maneira geral, os fungos possuem maior capacidade de liberar P quando comparados às bactérias (SHARMA et al., 2013).

Visto a importância do nutriente P para as plantas e o uso promissor de microrganismos para solubilização deste nutriente, o primeiro capítulo deste trabalho apresenta um referencial teórico mais detalhado sobre o nutriente, o microrganismo solubilizador de P *Aspergillus niger* (MENDES et al., 2014) e sobre as formulações de biofertilizantes. Esse referencial representa embasamento e suporte para os demais capítulos apresentados. O segundo capítulo visa caracterizar uma formulação de biofertilizante contendo *A. niger* quanto ao seu tempo de prateleira durante o período de 6 meses e a compatibilidade de uso e aplicação com fertilizantes minerais e um organomineral.

Sendo a alface uma das hortaliças mais consumidas no mundo e no Brasil (FILGUEIRA, 2013), o terceiro capítulo deste trabalho propõe determinar o potencial de promoção de crescimento dessa cultura em diferentes formulações e concentrações de um biofertilizante a base de *A. niger* com diferentes doses de adubo fosfatado. No quarto capítulo deste trabalho avaliou-se o potencial de diferentes formulações do biofertilizante a base de *A. niger* com diferentes fontes e doses de adubo fosfatado na cultura do feijoeiro, a terceira cultura mais importante para nutrição humana e animal no mundo (FAGERIA et al., 2015).

De maneira geral, o objetivo desse trabalho foi caracterizar uma formulação granular de *A. niger*, determinar o tempo de prateleira, avaliar compatibilidade com fertilizantes e determinar seu potencial uso na cultura da alface e no feijão.

CAPÍTULO 1

Referencial teórico geral

1.1 Fósforo

Estima-se que a população mundial alcance a marca aproximada de 9,7 bilhões de pessoas em 2050 e, conseqüentemente, uma maior demanda por alimentos será observada ao longo do tempo. Contudo, vê-se atualmente diversos efeitos adversos que comprometem o desenvolvimento e produção das culturas, tais como estresses bióticos e abióticos, como o ataque de insetos e patógenos, secas e a deficiência de nutrientes (CEASAR, 2018). Dentre os nutrientes, a baixa disponibilidade de fósforo é realidade em grande parte dos solos. Calcula-se que 5,7 bilhões de hectares de solo em todo o mundo são deficientes desse elemento (NIU et al., 2013). Por isso, a adubação fosfatada é necessária para aumentar os níveis de P no solo. Em contrapartida, existe uma preocupação a longo prazo, visto que as reservas de minério fosfatado de alta qualidade são limitadas (LYNCH, 2011; WELLMER; SCHOLZ, 2015).

O fósforo provido das jazidas de rocha fosfática pode ter origem tanto sedimentar (87%) quanto ígnea (13%) (GEISSLER et al., 2018). De todo o volume produzido, cerca de 83% são destinados à produção de adubos. Os depósitos atualmente conhecidos estão amplamente espalhados pelo mundo em grandes números, mas não necessariamente em quantidades comercialmente viáveis de rocha fosfática (GEISSLER et al., 2018; GEISSLER; MEW; STEINER, 2019). Estima-se que em 2019 o consumo mundial de P_2O_5 contido em ácido fosfórico, fertilizantes e outros produtos foi 47 milhões de toneladas. Calcula-se que a reserva mundial de rocha fosfática seja de aproximadamente 69 bilhões de toneladas e no Brasil tenha-se 1,7 bilhões, com produção anual de 5,3 mil toneladas (U. S. GEOLOGICAL SURVEY, 2020).

Presente em pelo menos 170 minerais das rochas fosfáticas em todo o mundo, o fósforo é liberado gradativamente pelo processo de intemperismo. É um nutriente altamente fixado pelo solo que possui difusão muito lenta e limita sua disponibilidade aos vegetais e organismos ali presentes. A absorção e utilização desse nutriente pelas plantas tem papel importante no rendimento das culturas (FILIPPELLI, 2008; SHEN et al., 2011). Nos solos ácidos, o P pode formar compostos insolúveis com íons e óxidos de Al e Fe, já em neutros e alcalinos, forma compostos moderadamente solúveis com Ca e Mg, além de ser adsorvido nas superfícies de carbonato de Ca e Mg (HOLFORD, 1997).

Nas plantas, o fósforo participa de inúmeras funções fisiológicas, como a fotossíntese, armazenamento e transferência de energia, respiração e a divisão celular (MULLINS, 2009). Além disso, promove o crescimento e desenvolvimento das raízes, melhora a qualidade de frutas, verduras, culturas graníferas e tem papel importante na formação das sementes (INSTITUTO DA POTASSA E FOSFATO, 1998). Visto a importância desse macronutriente e a deficiência na maior parte dos solos, faz-se necessário a utilização da adubação fosfatada visando suprir a demanda das plantas (SINGH; SATYANARAYANA, 2011). Devido às ligações químicas com componentes no solo, estima-se uma eficiência de apenas 60% para os fertilizantes fosfatados, o que faz promover altas dosagens para suprir a demanda das culturas (CUNHA; CASARIN; PROCHNOW, 2011).

1.2 Microrganismos solubilizadores de fosfato

Microrganismos são capazes de solubilizar compostos de fosfato inorgânico insolúveis, demonstrando potencial de disponibilizar o P para as plantas no solo (SHARMA et al., 2013). Dentre as bactérias, podem-se citar os gêneros *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Delftia*, *Gordonia*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia* e *Xanthomonas* (BABALOLA; GLICK, 2012; IGUAL et al., 2001; CHEN et al., 2006; KUMAR; BEHL; NARULA, 2001; FREITAS; BANERJEE; GERMIDA, 1997). De todos os microrganismos presentes no solo, as bactérias solubilizadoras de fosfato podem representar uma população entre 1–50%. Já os fungos com o mesmo potencial, compreendem em torno de apenas 0,1 a 0,5% (CHEN et al., 2006). Dentre eles, destacam-se os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* (ALAM, 2000; MENDES et al., 2014).

De maneira geral, os fungos solubilizadores de fosfato possuem maior capacidade de liberar P quando comparados às bactérias (SHARMA et al., 2013). Além disso, possuem a capacidade de colonizar longas distâncias com maior facilidade como a exemplo as micorrizas e, portanto, podem ser mais importantes e eficientes para a solubilização nos solos (KUCEY, 1983). O processo de solubilização consiste em liberar o fósforo presente em minerais para a solução do solo, enquanto que o processo de mineralização consiste na liberação daquele fósforo presente na fração orgânica (SHARMA et al., 2013).

A solubilização de P através da produção de ácidos orgânicos pelos microrganismos resulta da redução do pH do solo, da quelação dos cátions ligados ao P, por competição com P para sítios de adsorção no solo e pela formação de complexos com íons metálicos associados ao P insolúvel como o Ca, Fe e Al (WHITELAW, 2000; RASHID et al., 2004). Dentre os

ácidos orgânicos produzidos pelos microrganismos, destacam-se os ácidos cítrico, glicônico, láctico, oxálico, propiônico e succínico (CHEN et al., 2006; RASHID et al., 2004). Já a solubilização de P orgânico resulta da liberação de enzimas pelos microrganismos, como as fosfatases ácidas, fitases e fosfonatases. Cada organismo pode atuar de uma ou até mais maneiras para contribuir na disponibilização do P no solo. Apesar de ser difícil selecionar dentre os diversos mecanismos o mais eficiente, a produção de ácidos orgânicos e a consequente redução do pH caracterizam ser a de maior importância (SHARMA et al., 2013). Mendes e colaboradores (2014) reportaram a capacidade de *Aspergillus niger* em solubilizar P insolúvel em compostos de $AlPO_4$, $FePO_4$, $Ca_3(PO_4)_2$ e rocha fosfática. Dentre os mecanismos empregados por esse microrganismo se enquadram a acidificação do meio e a produção de ácidos orgânicos como o cítrico, glicônico e oxálico. Esses relatos reforçam a ideia do potencial uso de *A. niger* na solubilização de P insolúvel e seu uso como biofertilizante. Outros estudos evidenciam a capacidade de *A. niger* em produzir ácidos orgânicos tais como ácido cítrico, glucônico, málico, oxálico e tartárico (SCHRICKX et al., 1995; ANJUM et al., 2010; BAHALOO-HOREH; MOUSAVI, 2017).

Aspergillus niger é um dos mais importantes microrganismos usados em biotecnologia. Há décadas é utilizado em indústrias para produzir enzimas extracelulares e ácido cítrico. É um fungo filamentosos que cresce aerobicamente em matéria orgânica. Na natureza, é encontrado no solo principalmente em materiais vegetais em decomposição (SCHUSTER et al., 2002). Possui ampla temperatura de crescimento, mínimo de 6-8° C, máximo 45-47° C e ideal de 35-37° C. Apresenta caráter xerófilo e se distingue pela coloração preta e forma esférica de seus conídios. Os esporos negros fornecem proteção da luz solar e da luz ultravioleta, proporcionando uma vantagem competitiva em campo. *Aspergillus niger* geralmente tem sido considerado um fungo benigno e tem sido amplamente usado na produção em diversas indústrias, porém algumas cepas podem produzir micotoxinas prejudiciais aos seres humanos (PITT; HOCKING, 2009).

1.3 Formulações de biofertilizantes

O interesse e potencial uso de biofertilizantes para uma agricultura sustentável cresce gradativamente (HERRMANN; LESUEUR, 2013). Estes podem ser definidos como sendo substâncias que contém microrganismos vivos que, quando aplicados em sementes, superfícies vegetais ou no solo, podem colonizar a rizosfera ou o interior da planta e promover o crescimento por meio do aumento da oferta ou aproveitamento da capacidade de

nutrientes primários para a planta hospedeira (VESSEY, 2003; BRAHMAPRAKASH; SAHU, 2012; MALUSÁ; VASSILEV, 2014). O seu uso está ganhando destaque com ênfase na agricultura orgânica e para a agricultura sustentável. Estes quando aplicados no solo, podem trazer os seguintes benefícios (VESSEY, 2003; BRAHMAPRAKASH; SAHU, 2012):

- Tecnologia de baixo custo com ótimo benefício;
- Aumenta o crescimento das plantas e o rendimento das culturas por meio de aumento da disponibilidade de nutrientes e melhora na fertilidade do solo;
- Reduz a poluição ambiental pela diminuição e/ou substituição de insumos químicos;
- Melhora o condicionamento do solo;
- Protege as plantas contra patógenos do solo;
- Ajuda a planta a crescer sob condições de estresse.

O manejo dos nutrientes para as plantas é componente vital da agricultura sustentável. Assim, o uso de microrganismos como biofertilizante é considerado o melhor substituto dos fertilizantes minerais. Este atua de forma ecológica para o crescimento das plantas e fertilidade do solo. Os microrganismos solubilizadores de fosfato são conhecidos pela capacidade de promover o crescimento de plantas através da conversão da forma insolúvel de fósforo em forma solúvel (KOUR et al., 2020).

A formulação de um biofertilizante é um processo de várias etapas, compreendendo aspecto crucial para a produção e sucesso do agente biológico. Ela resulta de uma ou várias cepas de microrganismos incluídos em um transportador adequado, além de aditivos que têm a função de auxiliar na estabilização e proteção das células microbianas. Tudo isso deve proporcionar um ambiente seguro para proteger os agentes biológicos das condições durante o armazenamento e garantir a sobrevivência e o estabelecimento após a introdução nos solos (BRAHMAPRAKASH; SAHU, 2012; HERRMANN; LESUEUR, 2013; VASSILEV et al., 2020). Alguns problemas e desafios devem ser enfrentados desde a produção até a pós-aplicação dos biofertilizantes (JONES; BURGESS, 1998):

- Estabilização: evitar o crescimento de microrganismos contaminantes. Estes quando presentes no meio, podem acarretar na desnaturação das proteínas dos agentes ativos;

- Armazenamento: evitar que os produtos à base de pó se aglomerem pela absorção de umidade. Para os produtos líquidos, controlar a viscosidade e manutenção das partículas em suspensão, além de manter a viabilidade dos mesmos;
- Aplicação: deve-se garantir boa performance da tecnologia na aplicação conforme formulação escolhida (pó/grânulo). Manter viscosidade dos produtos líquidos adequada de modo a formarem pequenas gotículas na pulverização. Assegurar que no momento da pulverização não seja formada espuma, garantindo ótimo cobertura e eficiência no alvo;
- Pós-aplicação: garantir boa cobertura do alvo e boa retenção do produto. Reduzir a perda física por chuva ou outros agentes. Deve-se proteger contra os diversos agentes de inativação e que seja depositado próximo ao local de realização das atividades dos microrganismos.

Os biofertilizantes podem possuir formulação líquida ou sólida (SINGH; SINGH; PRABHA, 2016; SIDDIQUI, 2006). As formulações líquidas são baseadas em óleos minerais ou orgânicos, suspensões à base de óleo ou de polímeros, enquanto que as sólidas são aquelas na forma de pó, seco ou úmido, grânulo e cápsula (MALUSÁ; SAS-PASZT; CIESIELSKA, 2012; HERRMANN; LESUEUR, 2013). Biofertilizantes granulares podem apresentar vantagens aos demais, principalmente sob condições de estresse do solo como acidez e estresse hídrico, garantindo uma maior viabilidade dos microrganismos (HERRMANN; LESUEUR, 2013). O sucesso das formulações granuladas está relacionado diretamente quanto à composição dos grânulos, ao tipo do propágulo e a concentração de inóculo, tipo de transportador, a dosagem e ao método de aplicação dos grânulos (MORETINI; DE MELO, 2007).

O transportador como veículo de transferência de inóculo, afeta diretamente o desempenho do biofertilizante. Os transportadores podem ser divididos em seis categorias que são à base de solos, resíduos de plantas, materiais inertes, culturas microbianas, líquidos e aqueles baseados em cápsulas (SAHU; BRAHMAPRAKASH, 2016). Um bom transportador deve ser (BRAHMAPRAKASH; SAHU, 2012; SOUMARE et al., 2020):

- Não tóxico para os organismos;
- Facilmente pulverizado e esterilizado;
- Capaz de transportar números microbianos excepcionalmente altos;

- Facilmente disponíveis e econômicos;
- Biodegradável e não poluente;
- Apresentar boa capacidade de absorção.

A qualidade do biofertilizante é um dos fatores mais importantes que pode resultar no sucesso ou fracasso, aceitação ou rejeição pelos produtores que farão uso. A qualidade pode ser definida a partir de dois caracteres: a presença do número necessário de microrganismos e se estes se encontram na forma ativa (GHOSH et al., 2001; FNCA, 2006; HARZEVILI; CHEN, 2015).

Considera-se importante e essencial prever alguns requisitos para assegurar a qualidade do produto: a contagem mínima de células / propágulos viáveis, a eficiência na solubilização e/ou fixação de nutrientes, a eficiência na inoculação de plantas, a validade, o nível de contaminação admissível, pH, a forma física, o teor de carbono e de água. Vale destacar que a umidade ideal para a formulação seca é que esteja a baixo de 5%, acima deste valor pode culminar em atividade do microrganismo e perda da viabilidade (MALUSÁ; VASSILEV, 2014).

REFERÊNCIAS

ALAM, G. A study of biopesticides and biofertilisers in Haryana, India. Gatekeeper series, no. 93, n. 93, p. 24, 2000.

ANJUM, F. et al. Applied Clay Science Leaching of metal ions from black shale by organic acids produced by *Aspergillus niger*. Applied Clay Science, v. 47, n. 3-4, p. 356-361, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2009.11.052>

BABALOLA, O. O.; GLICK, B. R. The use of microbial inoculants in African agriculture: Current practice and future prospects. Journal of Food Agriculture and Environment, v. 10, p. 540-549, 2012.

BAHALOO-HOREH, N.; MOUSAVI, S. M. Enhanced recovery of valuable metals from spent lithium-ion batteries through optimization of organic acids produced by *Aspergillus niger*. Waste Management, v. 60, p. 666-679, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.10.034>

BRAHMAPRAKASH, G. P.; SAHU, P. K. Biofertilizers for sustainability. Journal of the Indian Institute of Science, v. 92, n. 1, p. 37-62, 2012.

CEASAR, S. A. Feeding World Population Amidst Depleting Phosphate Reserves: The Role

of Biotechnological Interventions. The Open Biotechnology Journal, v. 12, n. 1, p. 51-55, 2018. DOI: <https://doi.org/10.2174/1874070701812010051>

CHEN, Y. P. et al. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. v. 34, p. 33-41, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.12.002>

CUNHA, J. F. DE; CASARIN, V.; PROCHNOW, L. I. Balanço de Nutrientes na Agricultura Brasileira no Período de 1988 a 2010. Informações Agronômicas, v. 135, n. 19, p. 1-7, 2011.

FAGERIA, N. K. et al. Nutrição mineral do feijoeiro. Brasília - DF: EMBRAPA, 2015.

FILGUEIRA, F. A. R. Novo manual de olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV: 2013.

FILIPPELLI, G. M. The global phosphorus cycle: Past, present, and future. Elements, v. 4, n. 2, p. 89-95, 2008. DOI: <https://doi.org/10.2113/GSELEMENTS.4.2.89>

FNCA. Biofertilizer Manual. Toquio: Japan Atomic Industrial Forum (JAIF), 2006.

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

GEISSLER, B. et al. Striving toward a circular economy for phosphorus: The role of phosphate rock mining. Minerals, v. 8, n. 9, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/min8090395>

GEISSLER, B.; MEW, M. C.; STEINER, G. Phosphate supply security for importing countries: Developments and the current situation. Science of the Total Environment, v. 677, p. 511-523, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.356>

GHOSH, T. K. et al. A review on quality control of biofertilizers in India. Fertilizer Marketing News, v. 32, n. 8, p. 1-9, 2001.

HARZEVILI, F. D.; CHEN, H. MICROBIAL BIOTECHNOLOGY: Progress and Trends. Nova York: CRC Press, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1201/b17587>

HERRMANN, L.; LESUEUR, D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 97, n. 20, p. 8859-8873, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5228-8>

HOLFORD, I. C. R. Soil phosphorus: Its measurement, and its uptake by plants. Australian Journal of Soil Research, v. 35, n. 2, p. 227-239, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1071/S96047>

IGUAL, J. M. et al. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. Agronomie, v. 21, n. September, p. 561-568,

2001. DOI: <https://doi.org/10.1051/agro:2001145>

INSTITUTO DA POTASSA E FOSFATO. Manual internacional de fertilidade do solo. 2o. ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1998.

JONES, K. A.; BURGESS, H. D. Technology of Formulation and Application. Formulation of Microbial Biopesticides, p. 7-30, 1998. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-011-4926-6_2

KOUR, D. et al. Microbial biofertilizers: Bioresources and eco-friendly technologies for agricultural and environmental sustainability. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 23, p. 11, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101487>

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, 1983. DOI: <https://doi.org/10.4141/cjss83-068>

KUMAR, V.; BEHL, R. K.; NARULA, N. Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under green house conditions. Microbiological Research, v. 156, p. 87-93, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00081>

LYNCH, J. P. Root phenes for enhanced soil exploration and phosphorus acquisition: Tools for future crops. Plant Physiology, v. 156, n. 3, p. 1041-1049, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.111.175414>

MALUSÁ, E.; SAS-PASZT, L.; CIESIELSKA, J. Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. The Scientific World Journal, v. 2012, p. 12, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1100/2012/491206>

MALUSÁ, E.; VASSILEV, N. A contribution to set a legal framework for biofertilisers. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 98, n. 15, p. 6599-6607, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5828-y>

MENDES, G. DE O. et al. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. Ann Microbiol, v. 34, n. 1, p. 239-249, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0656-3>

MORETINI, A.; DE MELO, I. S. Formulação do fungo *Coniothyrium minitans* para controle do mofo-branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 42, n. 2, p. 155-161, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2007000200003>

MULLINS, G. Phosphorus, Agriculture & The Environment. Virginia: College of Agriculture and Life Sciences, 2009.

NIU, Y. F. et al. Responses of root architecture development to low phosphorus availability: A review. Annals of Botany, v. 112, n. 2, p. 391-408, 2013. DOI:

<https://doi.org/10.1093/aob/mcs285>

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and food spoilage. Third ed. New York: Springer, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>

RASHID, M. et al. Organic Acids Production and Phosphate Solubilization by Phosphate Solubilizing Microorganisms (PSM) Under in vitro Conditions. Pakistan Journal of Biological Sciences, v. 7, p. 187-196, 2004. DOI: <https://doi.org/10.3923/pjbs.2004.187.196>

SAHU, P. K.; BRAHMAPRAKASH, G. P. Formulations of Biofertilizers - Approaches and Advances. In: Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity,. India: Springer, 2016. p. 179-198. DOI: https://doi.org/10.1007/978-81-322-2644-4_12

SCHRICKX, J. M. et al. Organic acid production by aspergillus niger in recycling culture analyzes by capillary electrophoresis. Analytical Biochemistry, v. 231, p. 175-181, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1006/abio.1995.1518>

SCHUSTER, E. et al. On the safety of *Aspergillus niger* - a review. Appl Microbiol Biotechnol, v. 59, p. 426-435, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1032-6>

SHARMA, S. B. et al. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. SpringerPlus, v. 2, n. 587, p. 14, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>

SHEN, J. et al. Phosphorus dynamics: From soil to plant. Plant Physiology, v. 156, n. 3, p. 997-1005, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.111.175232>

SIDDIQUI, Z. A. PGPR: Biocontrol and biofertilization. India: Springer, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/1-4020-4152-7>

SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. Microbial phytases in phosphorus acquisition and plant growth promotion. Physiology and Molecular Biology of Plants, v. 17, n. 2, p. 93-103, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12298-011-0062-x>

SOUMARE, A. et al. From Isolation of Phosphate Solubilizing Microbes to Their Formulation and Use as Biofertilizers: Status and Needs. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, v. 7, n. January, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00425>

U. S. GEOLOGICAL SURVEY. Mineral Commodity Summaries 2020. Virginia: U.S Department OF The Interior, 2020.

VASSILEV, N. et al. Formulation of Microbial Inoculants by Encapsulation in Natural Polysaccharides: Focus on Beneficial Properties of Carrier Additives and Derivatives. Frontier in Plant Science, v. 11, p. 1-9, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00270>

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>

WELLMER, F. W.; SCHOLZ, R. W. The Right to Know the Geopotential of Minerals for Ensuring Food Supply Security: The Case of Phosphorus. *Journal of Industrial Ecology*, v. 19, n. 1, p. 3-6, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/jiec.12230>

WHITELAW, M. A. GROWTH PROMOTION OF PLANTS INOCULATED WITH PHOSPHATE-SOLUBILIZING FUNGI. In: *Advances in Agronomy*. Australia: Academic Press, 2000. v. 69p. 99-151. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60948-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60948-7)

CAPÍTULO 2

Vida de prateleira e compatibilidade de fertilizantes com o biofertilizante à base de

Aspergillus niger

RESUMO

Formulações sólidas de biofertilizantes compreendem aquelas na forma de pó, seco ou úmido, grânulo e cápsula. O sucesso das formulações granuladas está relacionado à composição dos grânulos, ao tipo do propágulo e a concentração de inóculo, tipo de transportador, à dosagem e ao método de aplicação. O objetivo deste trabalho foi avaliar o tempo de prateleira de um biofertilizante granular à base de *A. niger* e sua compatibilidade com fertilizantes. O experimento foi composto em delineamento inteiramente casualizado (DIC), fatorial duplo ($7 \times 2 + 1$), sendo 7 períodos de avaliação (0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias) e 2 formas de armazenamento (ambiente, geladeira) + controle. Como controle, foi realizada a produção do grânulo sem fungo, que foi armazenado à temperatura ambiente. Foram avaliados mensalmente a viabilidade de propágulos, umidade, unidades formadoras de colônias, solubilização de fosfato e crescimento do fungo em meio sólido e solubilização de fosfato em meio líquido. Adicionalmente foi avaliada a compatibilidade do biofertilizante em meio sólido com os fertilizantes superfosfato simples, superfosfato triplo, cloreto de potássio, ureia e um organomineral. Para isso, foi adicionado um grânulo do biofertilizante e um de fertilizante em placas de Petri contendo BDA, que foi incubada a 30 °C, e determinado diariamente o diâmetro da colônia. Além disso, foi determinada a solubilização de fosfato de rocha em meio líquido com os mesmos fertilizantes. A formulação manteve a viabilidade do fungo, capacidade de solubilização em meio sólido e líquido durante o período de avaliação. A formulação pode ser armazenada em temperatura ambiente ou geladeira pelo período de 6 meses. O biofertilizante se mostra compatível para crescimento com os fertilizantes avaliados. Para a compatibilidade em meio líquido, a ureia inibiu a solubilização de fosfato pelo biofertilizante. Demais fertilizantes foram compatíveis, enquanto o cloreto de potássio e o organomineral contribuíram para maior porcentagem de solubilização.

Palavras-chave: Bioinsumo; solubilização; armazenamento; sustentabilidade; nutrição.

1 INTRODUÇÃO

Calcula-se que a população mundial alcance a marca aproximada de 9,7 bilhões de pessoas no ano de 2050, culminando numa maior demanda de alimentos. Contudo, vê-se atualmente diversos efeitos adversos que comprometem o desenvolvimento e a produção das culturas, tais como estresses bióticos e abióticos, como o ataque de insetos e patógenos, secas e a deficiência de nutrientes (CEASAR, 2018). Dentre os nutrientes, a baixa disponibilidade de fósforo (P) é realidade em grande parte dos solos (NIU et al., 2013). A absorção e utilização desse nutriente pelas plantas representa papel importante no rendimento final de produção das culturas (FILIPPELLI, 2008; SHEN et al., 2011). Visto a importância do P e a deficiência na maior parte dos solos, faz-se necessária a utilização da adubação fosfatada visando suprir a demanda das plantas (SINGH; SATYANARAYANA, 2011). Em contrapartida, existe uma preocupação em longo prazo, pois as reservas de minério fosfatado de alta qualidade são limitadas (LYNCH, 2011; WELLMER; SCHOLZ, 2015).

Microrganismos são capazes de solubilizar compostos de fosfato inorgânico insolúveis, demonstrando potencial de disponibilizar o P para as plantas no solo. De maneira geral, os fungos possuem maior capacidade de liberar P quando comparados às bactérias (SHARMA et al., 2013). Além disso, possuem a capacidade de colonizar longas distâncias com maior facilidade e, portanto, podem ser mais importantes e eficientes para a solubilização nos solos (KUCEY, 1983). O processo de solubilização empregado pelos microrganismos consiste em liberar o fósforo presente em minerais para a solução do solo, enquanto que o processo de mineralização consiste na liberação daquele fósforo presente na fração orgânica (SHARMA et al., 2013).

Aspergillus niger é um dos mais importantes microrganismos usados em biotecnologia. Esse fungo tem a capacidade de produzir ácidos orgânicos tais como ácido cítrico, glicônico, málico, oxálico e tartárico (SCHRICKX et al., 1995; ANJUM et al., 2010; BAHALOO-HOREH; MOUSAVI, 2017). Por isso, apresenta o potencial de solubilizar fosfatos insolúveis em compostos de $AlPO_4$, $FePO_4$, $Ca_3(PO_4)_2$ e rocha fosfática (MENDES et al., 2014). Esses relatos reforçam a ideia do potencial uso de *Aspergillus niger* como biofertilizante para disponibilização de P para plantas por meio de solubilização de P insolúvel.

O interesse e potencial uso de biofertilizantes para uma agricultura sustentável cresce gradativamente (HERRMANN; LESUEUR, 2013). Os biofertilizantes podem ser definidos como sendo substâncias que contêm microrganismos vivos que, quando aplicados em

sementes, superfícies vegetais ou no solo, podem colonizar a rizosfera ou o interior da planta e promover o crescimento através do aumento da oferta ou aproveitamento da capacidade de utilização nutrientes primários para a planta (VESSEY, 2003; BRAHMAPRAKASH; SAHU, 2012; MALUSÁ; VASSILEV, 2014). O seu uso está ganhando destaque com ênfase na agricultura orgânica e para a agricultura sustentável. Quando aplicados no solo, os biofertilizantes podem trazer benefícios como melhoria na fertilidade, aumento do crescimento das plantas, acréscimo no rendimento das culturas, redução da poluição ambiental causada desde a fabricação dos fertilizantes e diminuição e/ou substituição de insumos químicos, dentre outros benefícios (VESSEY, 2003; BRAHMAPRAKASH; SAHU, 2012).

Os biofertilizantes podem possuir formulação líquida ou sólida (SAHU; BRAHMAPRAKASH, 2016; SIDDIQUI, 2006). Biofertilizantes granulares podem apresentar vantagens como o fácil manuseio e armazenagem. Além disso, o microrganismo não possui contato direto com compostos químicos quando aplicado em solo. Essa formulação se destaca das demais sob condições de estresse do solo como acidez, estresse hídrico, garantindo uma maior viabilidade dos microrganismos (HERRMANN; LESUEUR, 2013). A qualidade do biofertilizante é um dos fatores mais importantes que pode resultar no sucesso ou fracasso, aceitação ou rejeição pelos agricultores. A qualidade pode ser definida a partir de dois caracteres: a presença do número necessário de microrganismos e se estes se encontram na forma ativa (GHOSH et al., 2001; HARZEVILI; CHEN, 2015). Caracterizar a formulação e determinar o potencial do biofertilizante compreendem etapas importantes para aceitação no mercado e sucesso no campo. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o tempo de prateleira de um biofertilizante granular à base de *A. niger* e sua compatibilidade com fertilizantes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização da formulação

2.1.1 Desenvolvimento da formulação do biofertilizante

Para o desenvolvimento da formulação granular do fungo solubilizador de fosfato, utilizou-se a cepa de *Aspergillus niger* obtida previamente por Mendes et al. (2014) em solos da região de Viçosa – MG. Os conídios do fungo foram coletados em solução de Tween 80 a

0,01 % (v/v) a partir de culturas de até 7 dias de idade em placas de petri contendo o meio de cultura batata dextrose ágar (BDA). A suspensão foi então filtrada por meio de uma bomba a vácuo e uma membrana com poros de 0,45 µm. Em seguida, o filtro contendo os conídios foi seco em dessecador com sílica gel pelo período de 24 h em temperatura ambiente (25 °C). Os conídios secos foram armazenados em tubos eppendorf à temperatura ambiente. Para a formulação, foram pesados 36 mg de conídios, misturados em água estéril (15 mL), farinha de trigo (26,5 g), amido de milho (3,8 g) e sacarose (2,25 g), formando-se uma massa uniforme. Para a produção dos grânulos, a massa formada foi aberta e passada em máquina para fabricação de macarrão estilo “bigoli” para extrusão de filamentos com diâmetro aproximado de 2 mm. Os filamentos foram cortados em fragmentos de 2 mm de comprimento (ARAÚJO et al., 2020). Os grânulos foram colocados em placas de Petri em um secador de ar convectivo, no qual havia ventilação forçada de ar a 50° C durante o período 48 horas, até atingir a umidade abaixo de 5%.

2.2.2 Número de propágulos viáveis do fungo e capacidade de solubilização

Cinco subamostras foram mantidas para determinação da sobrevivência após a secagem. O restante das amostras foi armazenado em sacos plásticos pretos em temperatura ambiente (~25 °C) e em geladeira a 4 °C. A viabilidade e a capacidade de solubilização de fósforo foram determinadas durante 6 meses a cada 30 dias de armazenamento. As amostras usadas para avaliação se dispuseram em 5 repetições. O experimento foi composto em delineamento inteiramente casualizado (DIC), fatorial duplo (7x2 + 1), sendo 7 períodos de avaliação (0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias) e 2 formas de armazenamento (ambiente, geladeira) + controle. Como controle, foi realizada a produção do grânulo sem a presença do fungo, que foi armazenado à temperatura ambiente.

- **Viabilidade dos propágulos, umidade e determinação de UFC**

Para cada avaliação mensal, dez grânulos foram plaqueados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e incubados em BOD a 30 °C durante três dias. Posteriormente foi contabilizada a porcentagem de grânulos que geraram colônias do fungo. O delineamento experimental empregado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo que cada placa de Petri correspondeu a uma repetição. No dia de cada avaliação, 1 g

dos grânulos foram colocados em estufa a 105 °C por 24 h para obtenção de umidade na base seca.

Para determinação do número de propágulos viáveis, foram pesados 10 g de cada amostra em 5 repetições, adicionadas em Erlenmeyer de 250 mL e diluídas em 90 mL de solução salina [NaCl 0,9 % (m/v)] com adição de 1 mL L⁻¹ de Tween 80. As amostras permaneceram sob agitação durante 60 min a 180 rpm em agitador orbital. Posteriormente, foi realizada a diluição em série (10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³), retirada uma amostra de 0,1 mL da última diluição e espalhada em duas placas de Petri contendo BDA suplementado com 1 mL L⁻¹ Triton X-100 por meio de uma alça de Drigalsky estéril. As placas inoculadas foram mantidas por dois dias a 30 °C para posterior contagem das colônias. A quantidade de colônias foi expressa em unidades formadoras de colônias por grama (UFC g⁻¹). Para cada unidade experimental, foi realizada a média de UFC das duas placas. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC).

- **Capacidade de solubilização de fosfato em meio sólido**

Para determinação do desempenho de solubilização de fosfato em meio sólido, foram preparadas placas de Petri contendo meio de cultura composto por solução salina adicionada a 5 g L⁻¹ de fosfato de cálcio [Ca₃(PO₄)₂] e ágar (15 g L⁻¹). No meio de cultura foi adicionado sacarose (10 g L⁻¹) com o objetivo de simular o efeito de exsudatos radiculares aos quais o microrganismo tem acesso sob condição de campo. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave e vertido nas placas. Após o meio de cultura ser solidificado na placa, foi acrescentado um grânulo da formulação ao centro da placa. As placas foram seladas e incubadas a 30° C durante o período de 5 dias. Em seguida, os diâmetros da colônia do fungo e o halo de solubilização foram mensurados (Figura 1). O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) composto por 5 repetições.

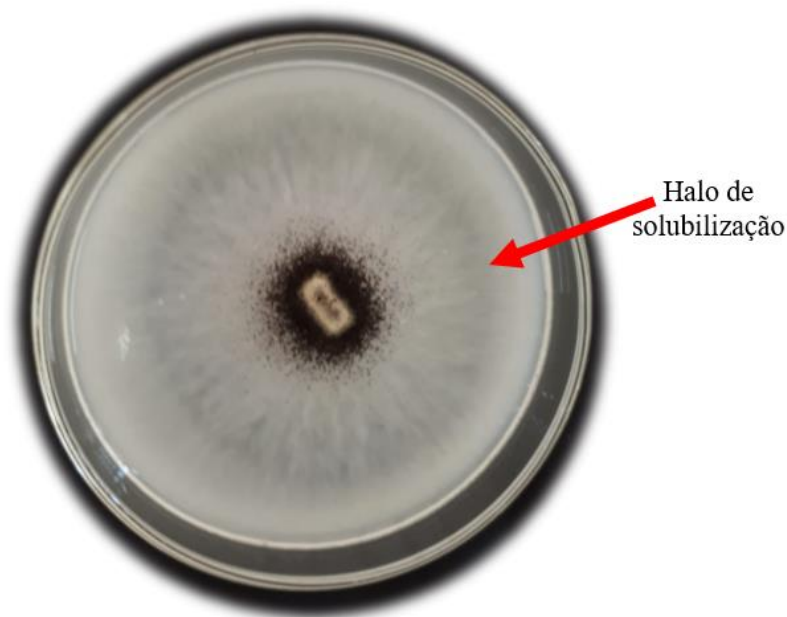


FIGURA 1. Halo de solubilização de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ da colônia fúngica a partir da formulação granular contendo o fungo *A. niger*.

- **Capacidade de solubilização de fosfato em meio líquido**

Para determinação do desempenho de solubilização de fosfato em meio líquido, adicionou-se a quantidade de 3 grânulos (peso aproximado de 23 mg cada grânulo) em frascos de 125 mL contendo 50 mL de meio NBRIP (10 g glicose, 5 g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 5 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g KCl, 0,1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 L água destilada, pH 7). Os frascos foram dispostos em um agitador orbital por 7 dias a 28 °C e 150 rpm. Ao final do experimento, foram determinados os teores de fósforo solúvel pelo método colorimétrico (Figura 2). O experimento foi composto em delineamento inteiramente casualizado (DIC) composto por 5 repetições.



FIGURA 2. Solução ao final do período de 7 dias de incubação a 28 °C e 150 rpm de agitação. Erlenmeyer esquerdo: Controle; Erlenmeyer direito: tratamento com o biofertilizante.

2.3 Compatibilidade com fertilizantes

- **Determinação do crescimento e tamanho da colônia**

Nessa etapa foi avaliada a compatibilidade do biofertilizante em meio sólido com os fertilizantes superfosfato simples, superfosfato triplo, cloreto de potássio, ureia e um organomineral (26% de P_2O_5). Para isso, foi adicionado um grânulo do biofertilizante e um de fertilizante, espaçados em ~5 mm, ao centro de placas de Petri contendo BDA. As placas foram incubadas em BOD a 30 °C durante 5 dias e determinado diariamente o diâmetro da colônia. Posteriormente foi determinada a taxa de crescimento diária e tamanho da colônia ao final do experimento. O experimento foi montado em DIC com 4 repetições.

- **Capacidade de solubilização em meio líquido**

Em erlenmeyers de 125 mL foram adicionados 50 mL de solução salina [$NaCl$ 0,85% (m/v)] com sacarose (10 g L^{-1}), 5 g de solo com alta capacidade de retenção de P (Latosolo), 190,6 mg de rocha fosfática (Bayóvar) referente à dose de 150% da capacidade máxima de

adsorção de P (CMAP de 1.666,67 mg P Kg⁻¹) do solo, 3 grânulos de biofertilizante à base de *A. niger* (70 mg) e 50 mg do fertilizante. O delineamento experimental foi montado em DIC com 5 repetições. Foi realizada a incubação dos erlenmeyers por 7 dias em agitador orbital a 28 °C sob agitação de 150 rpm. Após a incubação, foi feita a filtragem das amostras, determinado o pH e a concentração de P solúvel pelo método colorimétrico (BRAGA; DEFELIPO, 1974). Em triplicata, foi realizado um teste com os tratamentos de solo + rocha fosfática, solo + superfosfato simples, solo + superfosfato triplo e solo + organomineral, todos sem a adição de grânulos do biofertilizante, a fim de avaliar a quantidade de P disponível após a adsorção pelo solo no final do período de incubação. Esse valor gerado foi utilizado para descontar do valor da concentração de P solúvel do experimento principal, determinando assim o valor real de porcentagem de P solubilizado.

2.4 Análise estatística

Os dados de tempo de prateleira foram coletados mensalmente. Os dados de compatibilidade com fertilizante em meio sólido foram processados e geradas regressões lineares entre o tempo (dia) e o diâmetro de crescimento do fungo (mm). O valor de inclinação das regressões lineares correspondeu à taxa de crescimento diária pelo fungo. Todos os dados coletados foram submetidos a análise estatística através do software Sisvar (FERREIRA, 2008). Os resultados foram submetidos à ANAVA, teste F e comparou-se as médias pelo teste t (LSD) a nível de 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização da formulação

A formulação granular do biofertilizante contendo o fungo *A. niger* permaneceu viável em temperatura ambiente e em geladeira ao longo do período de 180 dias de armazenamento, com índice de germinação e formação de colônias em 100% (Tabela 1). A temperatura de armazenamento de um biofertilizante representa fator chave para a vida de prateleira. Em um trabalho, Wong e colaboradores (2019) avaliaram a viabilidade microbiana e estabilidade de armazenamento de consórcio entre *Pseudomonas aeruginosa* e *Trichoderma harzianum*. Segundo os autores, as bioformulações secas com grânulos, talco em pó e à base de alginato de cálcio atingiram melhores resultados quando em temperatura de 4 °C comparada à

temperatura ambiente de 25 °C. No presente estudo, a viabilidade do fungo em temperatura ambiente representa vantagem, visto que reduz os custos com armazenamento e transporte.

Para a umidade, verifica-se que houve acréscimo ao longo do período de armazenamento para os tratamentos em temperatura ambiente, geladeira e para o controle (formulação sem a adição do fungo). Para a temperatura de geladeira, houve menor acréscimo em relação aos demais tratamentos. As formulações secas, quando em umidade superior de 5%, podem sofrer deterioração progressiva e diminuir a atividade microbiana (COUCH; IGNOFFO, 1981). A partir de 30 dias de formulação, nota-se que todas as formulações se encontravam com a umidade superior a 5%, porém não houve diminuição da germinação do fungo, pois ao final do período de armazenamento 100% dos grânulos formaram colônias. Para a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC), halo de solubilização e crescimento do fungo em meio sólido e solubilização em meio líquido, verifica-se que não diminuíram ao longo do período de 6 meses de formulação para as diferentes formas de armazenamento. De maneira geral, nota-se que não houve diferença ao longo de 6 meses para os armazenamentos em temperatura ambiente e para geladeira.

TABELA 1. Porcentagem de colônias, umidade, unidades formadoras de colônias (UFC g⁻¹), halo de solubilização e crescimento de fungo em meio sólido e porcentagem de solubilização em meio líquido de formulação granular de *A. niger* submetida a dois tipos de armazenamento

Colônias (%)			
Tempo (dias)	Controle	Ambiente	Geladeira
0	0,0 aB	100,0 aA	100,0 aA
30	0,0 aB	100,0 aA	100,0 aA
60	0,0 aB	100,0 aA	100,0 aA
90	0,0 aB	100,0 aA	100,0 aA
120	0,0 aB	100,0 aA	100,0 aA
150	0,0 aB	100,0 aA	100,0 aA
180	0,0 aB	100,0 aA	100,0 aA
CV (%):	0		
Umidade (%)			
0	5,6 aB	4,5 aA	4,5 aA
30	6,7 bB	6,3 bA	5,5 bA
60	7,5 bcC	6,6 cB	5,5 bA
90	7,6 cC	6,7 cB	5,6 bA
120	7,8 dC	7,2 cdB	5,4 bA
150	8,1 eB	7,8 dB	5,6 bA
180	9 fC	8,5 eB	5,3 bA
CV (%):	4,9		
Unidades formadoras de colônias (x 10⁵)			

0	0,0 aB	5,1 aA	5,1 aA
30	0,0 aB	4,8 aA	4,6 aA
60	0,0 aB	4,8 aA	4,5 aA
90	0,0 aB	4,6 aA	4,6 aA
120	0,0 aB	4,9 aA	4,8 aA
150	0,0 aB	5,0 aA	5,0 aA
180	0,0 aB	5,0 aA	4,9 aA
CV (%):	12,4		
Halo de solubilização (mm)			
0	0,0 aB	36,4 bB	36,4 bB
30	0,0 aB	38,7 aB	38,1 aB
60	0,0 aB	38,5 aB	38,9 aB
90	0,0 aB	38,4 aB	38,2 aB
120	0,0 aB	36,6 bB	37,4 abB
150	0,0 aB	38,3 aB	38,3 aB
180	0,0 aB	38,5 aB	38,7 aB
CV (%):	4,7		
Halo de crescimento do fungo (mm)			
0	0,0 aB	57,6 abA	57,6 abA
30	0,0 aB	56,8 bA	57,6 abA
60	0,0 aB	57,5 abA	58,4 aA
90	0,0 aB	59,0 aA	58,4 aA
120	0,0 aB	56,4 bA	56,1 bA
150	0,0 aB	57,6 abA	57,1 abA
180	0,0 aB	58,7 aA	58,4 aA
CV (%):	3,3		
Solubilização em meio líquido (%)			
0	0,4 aB	30,6 eA	30,6 dA
30	0,6 aB	47,2 bcA	47,9 bA
60	0,6 aB	45,2 cA	46 bcA
90	0,7 aC	51,7 abA	42,1 cB
120	0,7 aB	45,3 cA	42,6 cA
150	0,7 aB	53,3 aA	53,8 aA
180	0,5 aC	39,3 dB	44,4 bcA
CV (%):	13,0		

Médias seguidas de mesma letra minúscula comparando tempo e maiúscula comparando temperatura de armazenamento não diferem entre si pelo teste T (LSD) a 5% de probabilidade.

Os dados indicam que durante 6 meses de armazenamento, apesar do acréscimo da umidade ao longo do tempo, os microrganismos continuam viáveis para a formação de colônias. Além disso, o biofertilizante não perdeu características importantes como o crescimento e a solubilização de P, identificado tanto em meio sólido como em meio líquido. Portanto, o biofertilizante à base de *A. niger* pode ser armazenado durante o período de 6

meses em temperatura ambiente sem perder a viabilidade e a capacidade de solubilização de P.

3.2 Compatibilidade com fertilizantes

Na tabela 2 encontra-se a taxa de crescimento obtida através do valor de inclinação gerada a partir dos modelos de regressão linear relacionando o diâmetro da colônia e o tempo de cultivo. Todos os tratamentos contendo fertilizante, com exceção da ureia, estimularam crescimento do fungo em meio sólido em comparação ao controle. O tratamento que mais estimulou foi na presença de KCl e Organomineral, com valores respectivos de 17,5 e 18,0 mm dia⁻¹. O crescimento na presença de ureia foi semelhante ao controle. Quanto ao diâmetro da colônia com 5 dias de crescimento, a presença de organomineral proporcionou atingir diâmetro de 83 mm. O menor valor de diâmetro de colônia ocorreu para a formulação sem a presença de fertilizante, com valor de 74 mm.

Os resultados obtidos nessa pesquisa indicam que existe não apenas compatibilidade da formulação granular contendo o fungo *A. niger* com os respectivos fertilizantes, mas também garante um maior crescimento da colônia com a presença destes. Vergara e colaboradores (2018) avaliaram o efeito de fontes orgânicas de nutrientes no crescimento de fungos *dark septate*. Segundo os autores, a presença dos nutrientes proporcionou maior desenvolvimento dos fungos avaliados. Esse resultado corrobora com os dados da presente pesquisa, indicando compatibilidade e maior taxa de crescimento de *A. niger* na presença de nutrientes dos fertilizantes.

TABELA 2. Taxa de crescimento e diâmetro da colônia para a formulação com diferentes fertilizantes

Tratamento	Taxa de crescimento (mm dia ⁻¹)	Tamanho da colônia (mm)
Controle	15,5 d	74,0 c
Ureia	16,3 cd	76,6 bc
Cloreto de Potássio	17,5 ab	80,0 ab
Superfosfato simples	16,9 bc	78,6 abc
Superfosfato triplo	17,2 abc	80,7 ab
Organomineral	18,0 a	83,0 a
CV (%):	4,08	3,9

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste LSD ($p < 0,05$).

Foi realizado o teste de compatibilidade com os fertilizantes para porcentagem de solubilização de P (Tabela 3). O pH em todos os tratamentos contendo fertilizante ficou

próximo de 3,4, exceto para a ureia, cujo valor foi de 7,6. O tratamento que atingiu maior valor de solubilização foi encontrado na formulação com organomineral, liberando 27,1% do P contido na RF. Vale ressaltar que nesse fertilizante, além do nutriente P há também a presença de material orgânico. Em um estudo com bactérias solubilizadoras de P, Kaleem Abbasi e Manzoor (2018) avaliaram a eficiência de solubilização do nutriente presente na rocha fosfática em associação com esterco de aves. Segundo os autores, a associação favoreceu a solubilização e disponibilização do nutriente no solo. Esses resultados sugerem que fontes contendo matéria orgânica podem ser promissoras em conjunto com microrganismos solubilizadores de P. Além disso, como foi visualizado no experimento anterior, a associação com organomineral garantiu maior crescimento do fungo, o que pode ter contribuído para a solubilização.

O menor valor de solubilização foi encontrado em associação com a ureia, cujo valor foi de 0,2% (Tabela 3). Na disponibilização do nutriente N pela ureia ocorre uma reação alcalinizante devido a ação da urease, o que deve ter provocado o acréscimo de pH da solução para 7,2. Esse fato deve ter contribuído para um efeito inibitório sobre a solubilização de P pelo *A. niger*, uma vez que a acidificação é o principal mecanismo envolvido na solubilização de fosfato (MENDES et al., 2014; ROBINSON; SYERS; BOLAN, 1992).

TABELA 3. pH e porcentagem de solubilização de P para a formulação com diferentes fertilizantes

Tratamento	pH	Solubilização (%)
Controle	3,4	5,1 c
Ureia	7,6	0,2 d
Cloreto de potássio	3,4	7,5 b
Superfosfato simples	3,4	5,9 c
Superfosfato triplo	3,3	6,2 c
Organomineral	3,4	27,1 a
CV (%)		9.3

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste T (LSD) a 5% de probabilidade.

Os dados indicam compatibilidade da formulação contendo o fungo *A. niger* com todos os fertilizantes, exceto para ureia. Os fertilizantes cloreto de potássio e o organomineral, além de compatíveis, contribuíram para uma maior solubilização de P. Portanto, o biofertilizante granular à base de *A. niger* pode ser aplicado em conjunto com os respectivos fertilizantes.

4 CONCLUSÃO

Não foi observado decréscimo de porcentagem de colônias por grânulos, unidades formadoras de colônias, halo de solubilização e crescimento do fungo em meio sólido e solubilização em meio líquido durante o período de tempo de prateleira para armazenamento em temperatura ambiente e geladeira. A formulação pode ser armazenada em temperatura ambiente ou geladeira pelo período mínimo de 6 meses.

O biofertilizante granular se mostra compatível para crescimento do fungo com os fertilizantes ureia, cloreto de potássio, superfosfato simples, superfosfato triplo e organomineral. Para a compatibilidade de solubilização, todos os fertilizantes foram compatíveis, exceto a ureia. Cloreto de potássio e o organomineral contribuíram para maior porcentagem de solubilização.

REFERÊNCIAS

ANJUM, F. et al. Applied Clay Science Leaching of metal ions from black shale by organic acids produced by *Aspergillus niger*. Applied Clay Science, v. 47, n. 3-4, p. 356-361, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2009.11.052>

ARAÚJO, V. C. et al. Enhanced growth in nursery of coffee seedlings inoculated with the rhizosphere fungus *Aspergillus niger* for field transplantation. Rhizosphere, v. 15, p. 4, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100236>

BAHALOO-HOREH, N.; MOUSAVI, S. M. Enhanced recovery of valuable metals from spent lithium-ion batteries through optimization of organic acids produced by *Aspergillus niger*. Waste Management, v. 60, p. 666-679, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.10.034>

BRAGA, J. M.; DEFELIPO, B. V. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solo e material vegetal. Revista Ceres, v. 21, p. 73-85, 1974.

BRAHMAPRAKASH, G. P.; SAHU, P. K. Biofertilizers for sustainability. Journal of the Indian Institute of Science, v. 92, n. 1, p. 37-62, 2012.

CEASAR, S. A. Feeding World Population Amidst Depleting Phosphate Reserves: The Role of Biotechnological Interventions. The Open Biotechnology Journal, v. 12, n. 1, p. 51-55, 2018. DOI: <https://doi.org/10.2174/1874070701812010051>

COUCH, T. L. .; IGNOFFO, C. M. Formulation of insect pathogens. Microbial control of pests and plant diseases, p. 621-635, 1981.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. Revista Symposium, v. 6, p. 36-41, 2008.

FILIPPELLI, G. M. The global phosphorus cycle: Past, present, and future. Elements, v. 4, n. 2, p. 89-95, 2008. DOI: <https://doi.org/10.2113/GSELEMENTS.4.2.89>

FNCA. Biofertilizer Manual. Toquio: Japan Atomic Industrial Forum (JAIF), 2006.

GHOSH, T. K. et al. A review on quality control of biofertilizers in India. Fertilizer Marketing News, v. 32, n. 8, p. 1-9, 2001.

HARZEVILI, F. D.; CHEN, H. MICROBIAL BIOTECHNOLOGY: Progress and Trends. Nova York: CRC Press, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1201/b17587>

HERRMANN, L.; LESUEUR, D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 97, n. 20, p. 8859-8873, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5228-8>

KALEEM ABBASI, M.; MANZOOR, M. Biosolubilization of phosphorus from rock phosphate and other P fertilizers in response to phosphate solubilizing bacteria and poultry manure in a silt loam calcareous soil. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, v. 181, n. 3, p. 345-356, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/jpln.201800012>

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, 1983. DOI: <https://doi.org/10.4141/cjss83-068>

LYNCH, J. P. Root phenes for enhanced soil exploration and phosphorus acquisition: Tools for future crops. Plant Physiology, v. 156, n. 3, p. 1041-1049, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.111.175414>

MALUSÁ, E.; VASSILEV, N. A contribution to set a legal framework for biofertilisers. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 98, n. 15, p. 6599-6607, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5828-y>

MENDES, G. DE O. et al. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. Ann Microbiol, v. 34, n. 1, p. 239-249, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0656-3>

NIU, Y. F. et al. Responses of root architecture development to low phosphorus availability: A review. Annals of Botany, v. 112, n. 2, p. 391-408, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcs285>

ROBINSON, J. S.; SYERS, J. K.; BOLAN, N. S. Importance of proton supply and calcium-sink size in the dissolution of phosphate rock materials of different reactivity in soil. J. Soil Sci., v. 43, p. 447-459, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.1992.tb00151.x>

SAHU, P. K.; BRAHMAPRAKASH, G. P. Formulations of Biofertilizers - Approaches and Advances. In: Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity,. India: Springer, 2016. p. 179-198. DOI: https://doi.org/10.1007/978-81-322-2644-4_12

SCHRICKX, J. M. . et al. Organic acid production by *Aspergillus niger* in recycling culture analyzes by capillary electrophoresis. Analytical Biochemistry, v. 231, p. 175-181, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1006/abio.1995.1518>

SHARMA, S. B. et al. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. SpringerPlus, v. 2, n. 587, p. 14, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>

SHEN, J. et al. Phosphorus dynamics: From soil to plant. Plant Physiology, v. 156, n. 3, p. 997-1005, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.111.175232>

SIDDIQUI, Z. A. PGPR: Biocontrol and biofertilization. India: Springer, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/1-4020-4152-7>

SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. Microbial phytases in phosphorus acquisition and plant growth promotion. Physiology and Molecular Biology of Plants, v. 17, n. 2, p. 93-103, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12298-011-0062-x>

VERGARA, C. et al. Efeito de Fontes orgânicas de nutrientes no crescimento de fungos dark septate. Brasília – DF Cadernos de Agroecologia - Anais do VI CLAA, X CBA e V SEMDF, , 2018.

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>

WELLMER, F. W.; SCHOLZ, R. W. The Right to Know the Geopotential of Minerals for Ensuring Food Supply Security: The Case of Phosphorus. Journal of Industrial Ecology, v. 19, n. 1, p. 3-6, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/jiec.12230>

WONG, C. K. F. et al. Effect of bioformulations on the biocontrol efficacy, microbial viability and storage stability of a consortium of biocontrol agents against *Fusarium* wilt of banana. Journal of Applied Microbiology, v. 127, n. 2, p. 544-555, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.14310>

CAPÍTULO 3

Produção de alface inoculada com *Aspergillus niger* sob diferentes doses de fósforo

RESUMO

Microrganismos são capazes de solubilizar compostos de fosfato inorgânico de baixa solubilidade, demonstrando potencial de disponibilizar o P para as plantas no solo. Portanto, esse trabalho objetivou avaliar o desenvolvimento de alface a campo submetida a diferentes formas de inoculação do fungo *Aspergillus niger* em diferentes doses de P. O experimento foi montado em esquema fatorial 6x3, sendo seis formas de inoculação do fungo *A. niger* (sem inoculação, suspensão de conídios no tratamento de sementes (TS), granular 4×10^2 e 4×10^6 conídios grama⁻¹ no transplantio e suspensão de conídios de 4×10^2 e 4×10^6 conídios mL⁻¹ no transplantio) versus três doses de P (0, 50 e 100%). A inoculação por TS foi a melhor forma de inoculação em diferentes doses de P para a promoção de crescimento. Na dose de 100%, os diferentes métodos de inoculação contribuíram para valores superiores nos parâmetros de diâmetro da planta, índice SPAD, peso fresco e quantidade de folhas. Não se verificou diferença entre as doses de 50 e 100% de P, o que indica que a dose de 50% foi suficiente para repor o nutriente no solo e contribuir para o desenvolvimento da alface. O modelo de predição baseado em análise de imagens aéreas garantiu valor de 0,45 a 0,76 de coeficiente de determinação para os parâmetros avaliados.

PALAVRAS-CHAVE: Adubação, promoção de crescimento, solubilização.

1 INTRODUÇÃO

Calcula-se que a população mundial alcance a marca de 9,7 bilhões de pessoas no ano de 2050, culminando numa maior demanda de alimentos (CEASAR, 2018). O aumento da produção de alimentos de forma sustentável requer aumento da produtividade (CEASAR, 2018). Sendo uma das hortaliças mais consumidas no mundo e no Brasil, a alface possui grande importância socioeconômica (FILGUEIRA, 2013). Essa cultura originou-se de uma espécie silvestre, encontrada em regiões de climas temperados, no sul da Europa e na Ásia Ocidental (FILGUEIRA, 2008). Dentre os fatores que prejudicam o crescimento e o desenvolvimento da alface, as baixas quantidades disponíveis do nutriente fósforo (P) representam um fator limitante, reduzindo a fotossíntese das plantas cultivadas (BROGGI et al., 2011).

A baixa disponibilidade de P é relatada em grande parte dos solos (NIU et al., 2013). A absorção e utilização desse nutriente pelas plantas tem papel fundamental no rendimento final de produção das culturas (FILIPPELLI, 2008; SHEN et al., 2011). Visto a importância do P e a sua deficiência na maior parte dos solos, faz-se necessária a utilização da adubação fosfatada com o objetivo de suprir a demanda das plantas (SINGH; SATYANARAYANA, 2011). Em contrapartida, existe uma preocupação em longo prazo, pois, as reservas de minério fosfatado de alta qualidade são limitadas (LYNCH, 2011; WELLMER; SCHOLZ, 2015). A aplicação de adubação fosfatada em solos tropicais intemperizados possui valor baixo de eficiência de uso devido à alta capacidade de fixação do nutriente e capacidade de se ligar quase irreversivelmente nas superfícies de óxidos de Fe e Al (PAVINATO et al., 2020). Os microrganismos possuem a habilidade de reverter tal processo, disponibilizando o nutriente para as plantas (NASCIMENTO et al., 2021).

Bactérias e fungos possuem a capacidade de solubilizar compostos de fosfato inorgânico, demonstrando potencial de disponibilizar o P para as plantas no solo. Os fungos possuem maior capacidade de liberar P quando comparados às bactérias, com destaque para o gênero *Aspergillus* (ALAM, 2000; MENDES et al., 2014; SHARMA et al., 2013). *Aspergillus niger* é um fungo que tem a capacidade de solubilizar P através da produção de ácidos orgânicos tais como ácido cítrico, glicônico, málico, oxálico e tartárico (SCHRICKX et al., 1995; ANJUM et al., 2010; BAHALOO-HOREH; MOUSAVI, 2017). A aplicação dos microrganismos em sementes, superfícies vegetais ou no solo ocorre por meio de formulações (VESSEY, 2003; BRAHMAPRAKASH; SAHU, 2012; MALUSÁ; VASSILEV, 2014). Os biofertilizantes podem possuir formulação tanto líquida quanto sólida (QIU et al.,

2019; (SIDDIQUI, 2006). As formulações líquidas são baseadas em óleos minerais ou orgânicos, suspensões à base de óleo ou de polímeros, enquanto que as sólidas são aquelas na forma de pó, seco ou úmido, grânulo e cápsula (MALUSÁ; SAS-PASZT; CIESIELSKA, 2012); (HERRMANN; LESUEUR, 2013). Além disso, devido à proibição de insumos sintéticos para a produção orgânica, fomentar pesquisas que contribuam para o desenvolvimento de produtos com base biológica pode ser alternativa viável para esse tipo de prática de produção (PYLAK; OSZUST; FRAÇ, 2019). Diante disso, esse trabalho teve como objetivo avaliar o desenvolvimento de alface a campo submetida a diferentes formas de inoculação do fungo *A. niger* em diferentes doses de P.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do experimento

O experimento foi conduzido na Estação Experimental de Hortaliças da Universidade Federal de Uberlândia, situada em Monte Carmelo, Minas Gerais, Brasil (18°42'43,19" S, 47°29'55,8" O e altitude 873 m) (Figura 1). O período da realização se estendeu de abril a julho de 2021. O clima dessa região é caracterizado segundo Köppen como Aw-tropical, verão quente e úmido e inverno frio e seco.

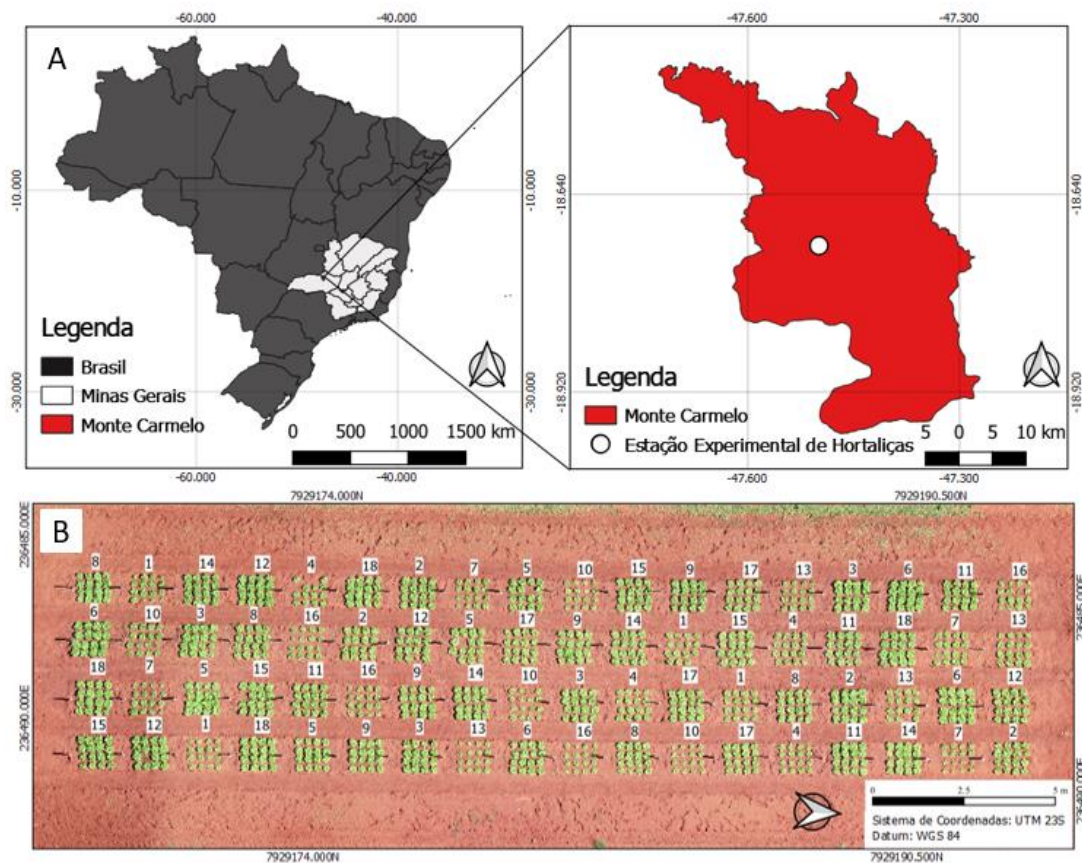


FIGURA 1. Localização do experimento e distribuição dos tratamentos em campo. A – Mapa da Região de Monte Carmelo – MG e Estação Experimental de Hortaliças; B – Distribuição dos tratamentos em campo; 1: NI-0; 2: NI-50; 3: NI-100; 4: TS-0; 5: TS-50; 6: TS-100; 7: GR2-0; 8: GR2-50; 9: GR2-100; 10: GR6-0; 11: GR6-50; 12: GR6-100; 13: SC2-0; 14: SC2-50; 15: SC2-100; 16: SC6-0; 17: SC6-50; 18: SC6-100. NI – Não inoculado; TS – Tratamento de sementes; GR2 – Granular 10^2 conídios grama⁻¹; GR6 – Granular 10^6 conídios grama⁻¹; SC2 – Suspensão de conídios 10^2 conídios mL⁻¹; SC6 – Suspensão de conídios 10^6 conídios mL⁻¹; 0, 50 e 100 - % de P.

Logo em seguida é ilustrado um fluxograma que detalha a metodologia realizada nesse presente estudo (Figura 2).

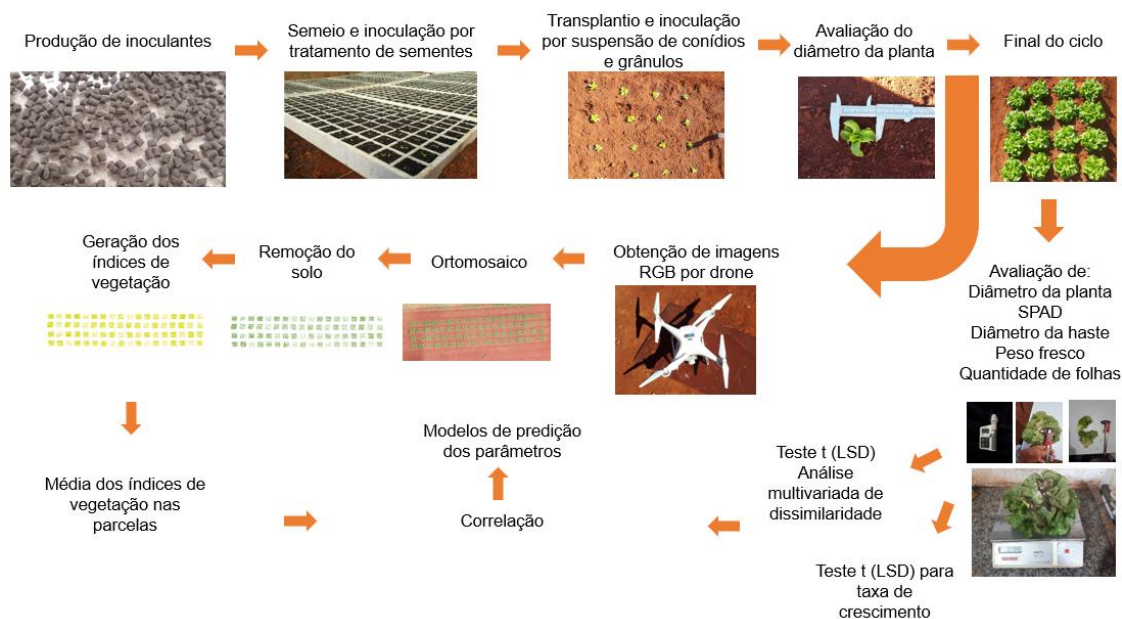


FIGURA 2. Fluxograma detalhado da metodologia empregada.

2.2 Produção dos inoculantes com o fungo *Aspergillus niger*

O microrganismo solubilizador de fósforo *A. niger* FS1 foi obtido previamente em solo na região de Viçosa – MG (MENDES et al., 2014). Inicialmente foram produzidos conídios em placas de Petri contendo o meio de cultura batata dextrose ágar (BDA, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) incubadas em câmara BOD a 30 °C durante o período de 10 dias. Os conídios foram coletados em solução aquosa com Tween 80 a 0,01 % (v/v). Essa solução foi filtrada por meio de bomba a vácuo e de uma membrana com poros de 0,45 µm e o filtro com os conídios foi seco em dessecador com sílica gel à temperatura ambiente (25 °C) durante o período de 24 h. Em seguida, os conídios secos foram coletados e armazenados em tubos eppendorf à temperatura ambiente (ARAÚJO et al., 2020). A massa de conídios secos continha $4,5 \times 10^7$ conídios mg^{-1} , conforme contagem em câmara de Neubauer.

Para a formulação granular, foi feita a mistura de conídios secos em 26,5 g de farinha de trigo, 3,8 g de amido de milho, 2,25 g de açúcar e 15 mL de água deionizada (ARAÚJO et al., 2020). As quantidades de conídios secos adicionados à mistura foram 0,013 e 128,02 mg para produzirem concentrações de 10^2 e 10^6 conídios por grânulo, respectivamente. A massa foi aberta em máquina de macarrão e extrusada em filamentos de aproximadamente 2 mm de diâmetro. Em seguida, foram cortados os grânulos em 2 mm de comprimento e secos em estufa de circulação forçada de ar a 50 °C durante 48 horas até atingirem umidade resultante de 3% (ARAÚJO et al., 2020). A massa média de cada grânulo foi de 22,6 mg. O tratamento

de sementes com suspensão de conídios foi realizado nas concentrações de 4×10^2 conídios célula⁻¹ de bandeja de poliestireno com 128 células (40 cm³ de substrato por célula), sendo o veículo de aplicação do fungo a água estéril. A quantidade de suspensão utilizada no tratamento foi de 0,69 mL na concentração de 0,005 mg de conídios mL⁻¹. O tratamento das mudas no transplântio foi realizado com suspensões de conídios preparadas em água estéril. A quantidade de suspensão aplicada em cada muda foi de 3 mL nas concentrações de 0,002 e 29,61 mg conídios L⁻¹ para as concentrações de 10^2 e 10^6 conídios por muda, respectivamente.

2.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, em esquema fatorial (6 x 3), sendo o primeiro fator constituído de seis formas de inoculação, não inoculado (NI); inoculação líquida por meio de tratamento de sementes (TS); inoculação da muda no solo no momento do transplântio (48 dias após semeadura) com formulação granular nas concentrações de 10^2 (GR2) e 10^6 (GR6) conídios de *A. niger* FS1 e suspensão de conídios nas concentrações de 10^2 (SC2) e 10^6 (SC6) conídios de *A. niger* FS1 por cédula de bandeja (Tabela 1). O segundo fator constituído por três doses de fósforo (0, 50 e 100% da dose de P₂O₅ recomendada para a cultura, onde 50% refere-se à quantidade de 150 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 100% de 300 kg ha⁻¹ de P₂O₅). Foram utilizadas 4 repetições, totalizando 18 tratamentos e 72 parcelas. Cada parcela foi composta por 16 plantas, sendo considerada para avaliação as quatro plantas centrais.

TABELA 1. Descrição dos tratamentos

Descrição*	Inoculação**	Dose P (%)***
NI-0	Não inoculado	0
NI-50	Não inoculado	50
NI-100	Não inoculado	100
TS-0	Tratamento de sementes 10^2 conídios planta ⁻¹	0
TS-50	Tratamento de sementes 10^2 conídios planta ⁻¹	50
TS-100	Tratamento de sementes 10^2 conídios planta ⁻¹	100
GR2-0	Granular 10^2 conídios planta ⁻¹ no transplântio	0
GR2-50	Granular 10^2 conídios planta ⁻¹ no transplântio	50

GR2-100	Granular 10 ² conídios planta ⁻¹ no transplantio	100
GR6-0	Granular 10 ⁶ conídios planta ⁻¹ no transplantio	0
GR6-50	Granular 10 ⁶ conídios planta ⁻¹ no transplantio	50
GR6-100	Granular 10 ⁶ conídios planta ⁻¹ no transplantio	100
SC2-0	Suspensão 10 ² conídios planta ⁻¹ no transplantio	0
SC2-50	Suspensão 10 ² conídios planta ⁻¹ no transplantio	50
SC2-100	Suspensão 10 ² conídios planta ⁻¹ no transplantio	100
SC6-0	Suspensão 10 ⁶ conídios planta ⁻¹ no transplantio	0
SC6-50	Suspensão 10 ⁶ conídios planta ⁻¹ no transplantio	50
SC6-100	Suspensão 10 ⁶ conídios planta ⁻¹ no transplantio	100

*TS: tratamento de sementes com suspensão de conídios; GR: granular; SC: suspensão de conídios; ** 10² e 10⁶: 4 x 10² e 4 x 10⁶ conídios por planta, respectivamente; ***50%: 150 kg há⁻¹ de P₂O₅; 100%: 300 kg há⁻¹ de P₂O₅.

O semeio foi realizado no dia 19 de abril de 2021 em bandejas de poliestireno com 128 células (40 cm³ célula⁻¹), preenchidas com substrato comercial à base de fibra de coco (Technes, São Paulo, SP, Brasil) com pH de 5,6, umidade em 48%, densidade de 260 kg m³, 0,8% de fertilizantes e 0,2% de corretivo. O tratamento de sementes por meio da inoculação com a suspensão de conídios foi realizado 2 h antes da semeadura com as sementes cobertas com suspensão de conídios para atingir a quantidade de conídios de 10² por semente via pipetagem e homogêneas manualmente, mantendo-as úmidas até o momento da semeadura. As sementes utilizadas foram do genótipo UFU-197#2#1#1, provenientes do Programa de Melhoramento Genético de Alface Biofortificada da UFU. Foram semeadas sementes inoculadas e não inoculadas na quantidade de 2 por célula. A quantidade de 10 sementes inoculadas foram plaqueadas em meio de cultura contendo BDA e levadas para BOD a 30 ± 1 °C durante o período de 10 dias para verificar a eficiência da inoculação com formação de colônias de *A. niger*. As mudas foram produzidas em casa de vegetação do tipo arco (7 x 21 m), com pé direito de 4 metros, coberta com filme de polietileno transparente de 150 micras aditivado contra raios ultravioleta e cortinas laterais de tela branca anti-afídeo. Após 10 dias do semeio, foi realizado o desbaste das mudas, permanecendo apenas uma em cada célula. Semanalmente, as mudas foram submetidas a fertirrigações com 13,4 mL célula⁻¹ de solução contendo (quantidade total por célula) 5,02 µg N; 5,02 µg P₂O₅; 6,69 µg K₂O; 0,83 µg Mg; 0,083 µg Zn; 0,025 µg B; 0,0083 µg Fe; 0,083 µg Mn; 0,92 µg S. As bandejas foram

dispostas em bancadas de 70 cm de altura. A irrigação foi realizada diariamente de acordo com a necessidade das plantas.

Antes do transplântio, foi realizada amostragem do solo na camada de 0-20 cm de profundidade para avaliação física e química. Os resultados foram os seguintes: textura muito argilosa (areia 25,5%; silte 10%; argila 64,5%), pH em CaCl₂ = 4,5, P (Mehlich) = 23,8 mg dm⁻³, K = 0,29 cmolc dm⁻³, Ca = 1,76 cmolc dm⁻³, Mg = 0,33 cmolc dm⁻³, H + Al = 2,9 cmolc dm⁻³, SB = 2,38 cmolc dm⁻³, T = 5,28 cmolc dm⁻³, V% = 45, m% = 10 e M. O. = 1,2 dag kg⁻¹. A interpretação e correção da fertilidade e acidez foram realizados segundo as Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais (RIBEIRO; GUIMARÃES; 1999). Para suprimento do nutriente fósforo, utilizou-se como fonte o Superfosfato triplo com concentração de 43,45% de P₂O₅. Para o transplântio, adotou-se o espaçamento de 0,25 x 0,25 m entre plantas, 0,5 m entre canteiros e 0,5 m entre parcelas. Nos tratamentos inoculados com formulação granular, foi adicionado, no momento do transplântio, um grânulo por planta em contato direto com a raiz. O tratamento das mudas com suspensão de conídios foi realizado nas bandejas 30 minutos antes do transplântio, adicionando-se 3 mL por célula da suspensão preparada. Os tratamentos culturais foram semelhantes para todos os tratamentos, a irrigação foi realizada diariamente conforme a necessidade das plantas.

2.4 Fenotipagem por imagem e avaliação agronômica no campo

Foi realizado um voo para obtenção de imagens aéreas aos 33 dias após o transplântio. Os parâmetros utilizados no voo foram: altura de 20 metros, sobreposição longitudinal e sobreposição lateral de 80%, direção em -93° e velocidade de 3 m s⁻¹. O voo foi realizado de maneira automática utilizando os softwares DJI Go e DroneDeploy. A aeronave utilizada foi o Drone Phantom 4 Pro com a câmeras RGB compreendendo as regiões do vermelho, verde e azul. As imagens obtidas foram processadas no software Pix4Dmapper para geração da ortoimagem.

Aos 5, 12, 19, 26 e 33 dias após o transplântio, foram determinados o diâmetro das 4 plantas centrais de cada parcela. Além disso, aos 33 dias, foi determinado o índice SPAD / carotenoide (CASSETARI et al., 2015) por meio da média do índice das quatro plantas centrais de cada parcela. A leitura foi realizada por meio de equipamento medidor de clorofila (Minolta SPAD-502CFL1030) em triplicado, em ambas as lâminas laterais opostas e uma folha intermediária de cada planta. Aos 34 dias após o transplântio, foram colhidas as plantas

e determinado o peso fresco total da parte aérea, diâmetro de haste e a quantidade de folhas comerciais (maiores que 5 cm de comprimento).

2.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos parâmetros agronômicos foram realizadas com o software Sisvar (FERREIRA, 2008). Os resultados foram submetidos à ANAVA, teste F e comparou-se as médias pelo teste t (LSD) a nível de 5% de probabilidade. A dissimilaridade entre os tratamentos foi representada por meio de dendrograma. Este foi obtido pelo método hierárquico e pela ligação média entre grupos não ponderados (UPGMA) a partir da distância euclidiana como medida de dissimilaridade. O coeficiente de correlação cofenética (CCC) foi gerado para validar os agrupamentos, calculado pelo teste de Mantel (1967) no software Genes. Foi determinada a contribuição relativa de cada variável para a dissimilaridade entre os agrupamentos por meio do método de Singh (SINGH, 1981). Estes dados foram gerados a partir do software computacional em genética e estatística Genes (versão 2021.146). Foram geradas regressões lineares para o diâmetro da alface em diferentes datas de avaliações em diferentes formas de inoculação e doses de P. Em seguida foi determinado a taxa de crescimento pelo valor de inclinação das regressões lineares. Com o parâmetro de maior contribuição relativa, foi construída uma figura de variabilidade espacial por meio da ferramenta IDW utilizando o software Qgis 3.10.10.

2.6 Processamento de imagem

A ortoimagem foi processada utilizando o software R (versão 4.1.1) e o pacote R FieldImageR (MATIAS; CARAZA-HARTER; ENDELMAN, 2020). Através deste pacote, foi gerado o histograma do índice de vegetação HUE que foi utilizado para a geração de uma camada de máscara e segmentação da vegetação representada pela alface com valor de corte de 1,5 (Tabela 2). O objetivo da segmentação é retirar o solo (fundo da imagem) para estudar com precisão o comportamento da vegetação. Após a segmentação foram gerados os histogramas dos índices de vegetação relacionados as bandas do RGB.

TABELA 2. Índices de vegetação e suas respectivas equações.

Índice	Equação/Método	Referência
Overall Hue Index (HUE)	$\text{atan}(2*(B-G-R)/30,5*(G-R))$	(ESCADAFAL; BELGHITH; BEM, 1994)
Normalized Green Red Difference Index (NGRDI)	$(G-R)/(G+R)$	(TUCKER, 1979)
Green Leaf Index (GLI)	$(2G-R-B)/(2G+R+B)$	(LOUHAICHI; BORMAN; JOHNSON, 2001)
Soil Color Index (SCI)	$(R-G)/(R+G)$	(MATHIEU et al., 1998)
Brightness Index (BI)	$\sqrt{((R^2+G^2+B^2)/3)}$	(RICHARDSON; WIEGAND, 1977)
Visible Atmospherically Resistant Index (VARI)	$(G-R)/(G+R-B)$	(GITELSON et al., 2002)
Excess Green Index (ExG)	$2G-R-B$	(WOEBBECKE et al., 1995)
Red Green Blue Vegetation Index (RGVBI)	$(G-(B*R))/G^2+(B*R)$	(BENDIG et al., 2015)

Com os dados de parâmetros agrônômicos relacionados ao crescimento e índices de vegetação, foi gerada uma matriz de correlação de Pearson ao nível de 5% de probabilidade. A matriz foi construída a partir do programa R e o pacote estatístico R Hmisc (HARRELL JR; DUPONT, 2021). Com os dados de índices de vegetação que mais se correlacionaram com os parâmetros agrônômicos, foram gerados modelos de predição a partir do software Waikato Environment for Knowledge Analysis – WEKA, versão 3.9.5.

3 RESULTADOS

Durante o período de condução do experimento, desde a semeadura até a colheita, observou-se temperaturas médias diárias de 21,1 °C, com valor médio mínimo de 14,9 e máximo de 27,3 °C (Figura 3). A umidade relativa do ar obteve média de 65,6%, com valor médio mínimo de 44,9 e valor máximo de 86,4% (SISMET, 2021).

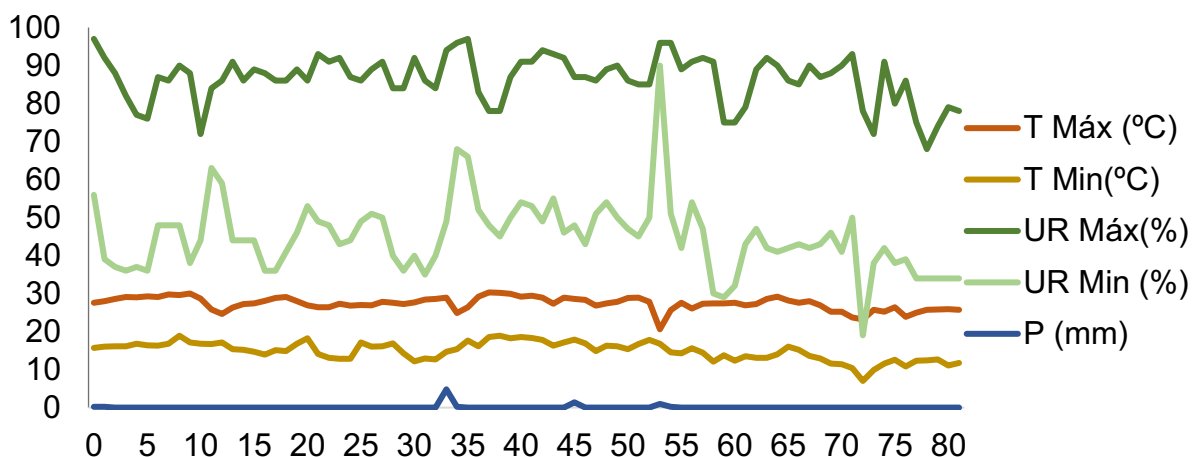


FIGURA 3. Temperatura (T), umidade relativa do ar máxima e mínima (UR) e precipitação (P) diárias durante a condução do experimento.

Foi encontrada diferença estatística (teste F, $p < 0,05$) entre os tratamentos com e sem inoculação nos parâmetros analisados (Tabela 1). A inoculação de fungo *Aspergillus niger* promoveu o crescimento e desenvolvimento da alface na dose de 100% de P. Observou-se que a forma de inoculação por tratamento de sementes promoveu ganhos em relação à não inoculação nos diferentes parâmetros e doses de P avaliadas, exceto para índice SPAD na ausência de P e para diâmetro da haste na ausência e na dose de 100% de P (Tabela 1). A inoculação por tratamento de sementes na dose de 100% de P contribuiu para ganhos de 9,3, 32,9 e 10,7% nos parâmetros de diâmetro de planta, peso fresco da parte aérea e quantidade de folhas comerciais. De maneira geral, nota-se que a inoculação por grânulo 10^6 conídios grama⁻¹ atingiu valores inferiores aos demais tratamentos e a não inoculação, exceto para a dose de máxima de P.

Para a dose de 100% de P em todos os parâmetros, exceto diâmetro da haste, observa-se maiores ganhos para todas as formas de inoculação em relação à não inoculação, indicando que além do efeito de solubilização de P, existem outras funções desempenhadas pelos microrganismos capazes de promover o crescimento da alface em campo, como a produção de fitohormônios (Tabela 3). Em média para os parâmetros analisados na dose de 100% de P, a inoculação promoveu ganhos em 14,2, 6,1, 5,6, 8,3, 11,7% para as formas de inoculação por TS, GR2, GR6, SC2 e SC6 respectivamente. Quanto à dose de P, houve menores valores de parâmetros avaliados para a ausência de P e sem diferença significativa entre as doses 50 e 100%, indicando que 50% foi suficiente para atingir os valores superiores. Apenas a inoculação por suspensão de conídios 10^6 conídios mL⁻¹ diferiu significativamente entre todas as doses de P nos parâmetros avaliados, exceto para índice SPAD que não diferiu entre a dose de 50 e 100%.

TABELA 3. Diâmetro da alface (mm), índice SPAD, diâmetro da haste (mm), peso fresco da parte aérea e quantidade de folhas sob diferentes formas de inoculação e doses de P₂O₅

Diâmetro alface (mm)			
Inoculação*	Dose de P ₂ O ₅ (%)		
	0	50	100
NI	189,1 abB	230,3 abA	234,7 cA
TS	195,0 aB	247,4 aA	256,6 aA
GR2	184,4 abB	241,9 aA	237,5 bcA
GR6	173,2 bB	235,3 abA	243,8 abcA
SC2	190,8 abB	234,7 abA	249,4 abcA
SC6	186,3 abC	221,9 bB	253,6 abA
CV (%)	5,62		
Índice SPAD			
NI	26,4 aB	28,2 bA	28,9 bA
TS	26,5 aB	29,8 aA	30,4 aA
GR2	26,4 aB	30,1 aA	30,2 aA
GR6	25,8 aB	29,9 aA	29,9 abA
SC2	26,1 aB	30,0 aA	29,8 abA
SC6	26,2 aB	29,7 aA	30,0 abA
CV (%)	2,91		
Diâmetro da haste (mm)			
NI	14,9 aB	17,8 cA	19,4 aA
TS	16,3 aB	19,8 abcA	21,9 aA
GR2	15,7 aB	18,7 abcA	20,3 aA
GR6	15,0 aB	21,2 aA	20,4 aA
SC2	14,8 aB	20,5 abA	20,1 aA
SC6	16,7 aB	18,1 bcB	21,6 aA
CV (%)	10,2		
Peso fresco da parte aérea (gr)			
NI	50,9 abB	101,2 abA	105,2 cA
TS	61,2 aB	117,8 aA	139,8 aA
GR2	50,1 abB	106,6 abA	118,2 abcA
GR6	36,0 bB	108,7 abA	111,8 bcA
SC2	54,0 abB	105,4 bA	124,1 abcA
SC6	52,6 abC	91,1 abB	129,1 abA
CV (%)	16,8		
Quantidade de folhas (un)			
NI	18,6 abB	21,7 aA	21,4 bA
TS	19,8 aB	23,1 aA	23,7 aA
GR2	17,4 bB	22,7 aA	23,1 abA
GR6	15,1 cB	22,1 aA	23,4 abA
SC2	19,3 abB	22,8 aA	23,7 aA
SC6	19,7 aC	21,9 bB	24,1 aA
CV (%)	6,92		

*NI – Não inoculado; TS – Tratamento de sementes; GR – Granular; SC – Suspensão de conídios. Médias seguidas de mesma letra minúscula comparando inoculação e maiúscula comparando doses de fósforo não diferem entre si pelo teste t (LSD) a 5% de probabilidade.

Para a análise de agrupamento, foram obtidos 6 grupos distintos (Figura 3) ao nível de 10% de dissimilaridade, onde ocorre a mudança abrupta dos tratamentos (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2012). O coeficiente de correlação cofenética obteve o valor de 87,21% (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2012), sendo significativo ao teste t ($p < 0,01$). Desta forma, pode-se afirmar que reproduziram de maneira satisfatória as informações contidas na matriz e consequentemente na formação dos grupos. Verifica-se que os tratamentos sem adição de P foram agrupados nos grupos I e II. Os tratamentos não inoculados com as doses de 50 e 100% de P foram agrupados no grupo III, indicativo de dissimilaridade entre os demais tratamentos com as mesmas doses de P (Figura 3).

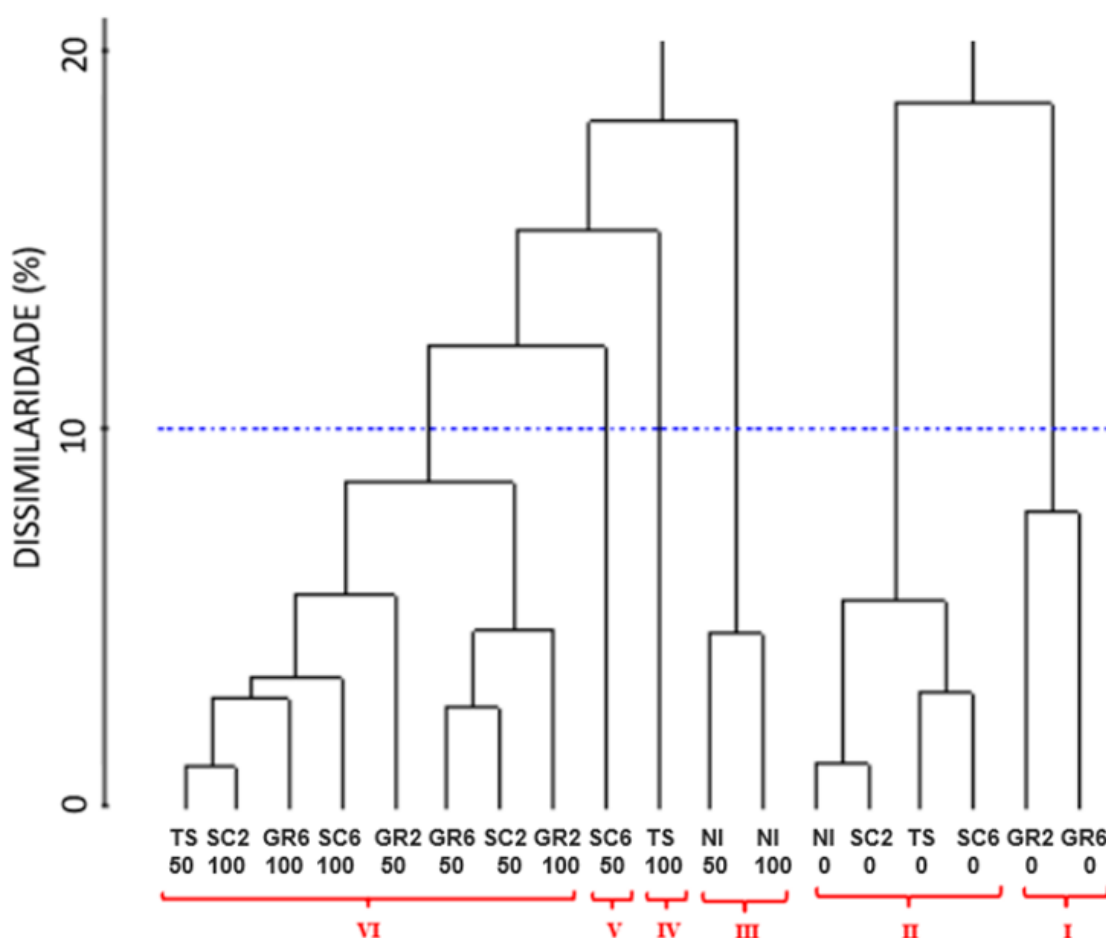


FIGURA 3. Dendrograma comparando formas de inoculação (T: testemunha, TS: tratamento de sementes, GR2: granular 10^2 , GR6: granular 10^6 , SC2: suspensão de conídios 10^2 , SC6: suspensão de conídios 10^6) e doses de fósforo (0, 50 e 100% de P da recomendação para a cultura), obtido pelo método de agrupamento ligação média entre grupo – UPGMA.

Em relação a contribuição relativa de caracteres, verificou-se que o parâmetro que mais contribuiu foi o índice SPAD (42,2%), atributo relacionado à quantidade de clorofila e

carotenoides seguido do diâmetro da alface (18,76%). O parâmetro que menos contribuiu foi o diâmetro da haste, atingindo o valor de 8,5% de contribuição.

Em relação à taxa de crescimento, foi verificado que não houve diferença estatística entre as formas de inoculação nas diferentes doses do adubo fosfatado (Tabela 4). Não se verificou diferença entre as doses de 50 e 100% de P, indicativo que a dose de 50% foi o suficiente para o crescimento da alface, exceto para o tratamento com suspensão de conídios 10^6 conídios mL^{-1} , que diferiu entre todas as doses de P.

TABELA 4. Taxa de crescimento (mm d^{-1}) da alface indicado pelo valor de inclinação da regressão linear em diferentes formas de inoculação e doses de P

Inoculação*	Dose de P (%)		
	0	50	100
NI	4,7 abB	6,3 abA	6,7 aA
TS	4,9 aB	6,7 aA	6,6 aA
GR2	4,6 abB	6,7 aA	7,1 aA
GR6	4,2 bB	6,5 aA	7,0 aA
SC2	4,7 abB	6,4 abA	6,8 aA
SC6	4,5 abC	5,9 bB	7,0 aA
CV (%)		7,09	

*NI – Não inoculado; TS – Tratamento de sementes; GR – Granular; SC – Suspensão de conídios. Médias seguidas de mesma letra minúscula comparando inoculação e maiúscula comparando doses de fósforo não diferem entre si pelo teste T (LSD) a 5% de probabilidade.

A variável resposta que mais contribuiu para a dissimilaridade entre os grupos foi o índice SPAD, por isso foi construído uma figura para representar a variabilidade espacial desse índice nas diferentes parcelas utilizando a ferramenta de interpolação IDW no programa Qgis (Figura 4). Verifica-se que os menores valores de índice SPAD se deram para as diferentes formas de inoculação para a dose de 0% de P, mas principalmente o tratamento testemunha e granular 10^6 conídios grama^{-1} (Figura 4) Valores superiores são visíveis na figura principalmente nas diferentes formas de inoculação nas doses de 50 e 100% de P.

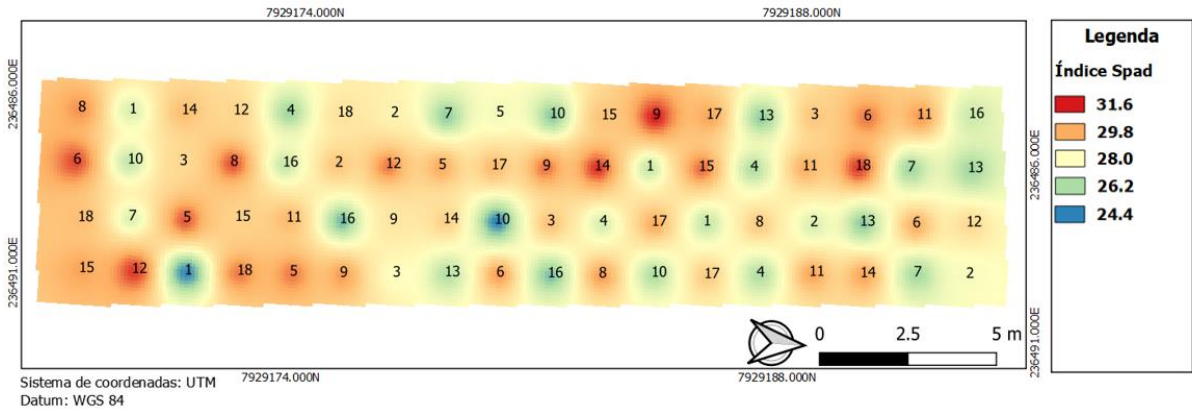


FIGURA 4. Variabilidade espacial do índice SPAD em diferentes parcelas por interpolação IDW. 1: NI-0; 2: NI-50; 3: NI-100; 4: TS-0; 5: TS-50; 6: TS-100; 7: GR2-0; 8: GR2-50; 9: GR2-100; 10: GR6-0; 11: GR6-50; 12: GR6-100; 13: SC2-0; 14: SC2-50; 15: SC2-100; 16: SC6-0; 17: SC6-50; 18: SC6-100. NI – Não inoculado; TS – Tratamento de sementes; GR2 – Granular 10^2 ; GR6 – Granular 10^6 ; SC2 – Suspensão de conídios 10^2 ; SC6 – Suspensão de conídios 10^6 ; 0, 50 e 100 - % de P.

Para o processamento das imagens, inicialmente foi realizado a geração do histograma do índice HUE (Figura 5). Esse índice contém dois extremos de valores na distribuição do número digital dos pixels. O primeiro extremo com valores inferiores, refere-se aos relacionadas à vegetação e a planta, já o segundo extremo com valores superiores contém aqueles relacionados ao solo. Portanto, fazer o corte do extremo superior relacionado ao solo, permite realizar a segmentação da imagem. Através do histograma (Figura 6) foi realizado o corte com o valor de 1,50.

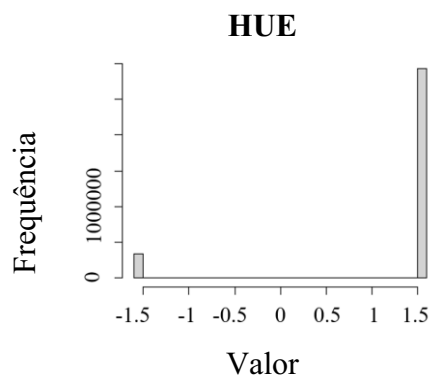


FIGURA 5. Histograma do índice de vegetação HUE gerado pela imagem RGB.

Após realizado o corte e a segmentação da imagem RGB, foi possível gerar histogramas (Figura 6) nos diferentes tratamentos para as bandas do RED (vermelho), GREEN (Verde), BLUE (Azul) e índices de vegetação como NGRDI = índice de diferença normalizada verde vermelho; GLI= índice de folha verde; SI = índice de saturação de

inclinação espectral; BI = índice de brilho; VARI = índice de resistência atmosférica visível e HI = índice de matiz de cores primárias.

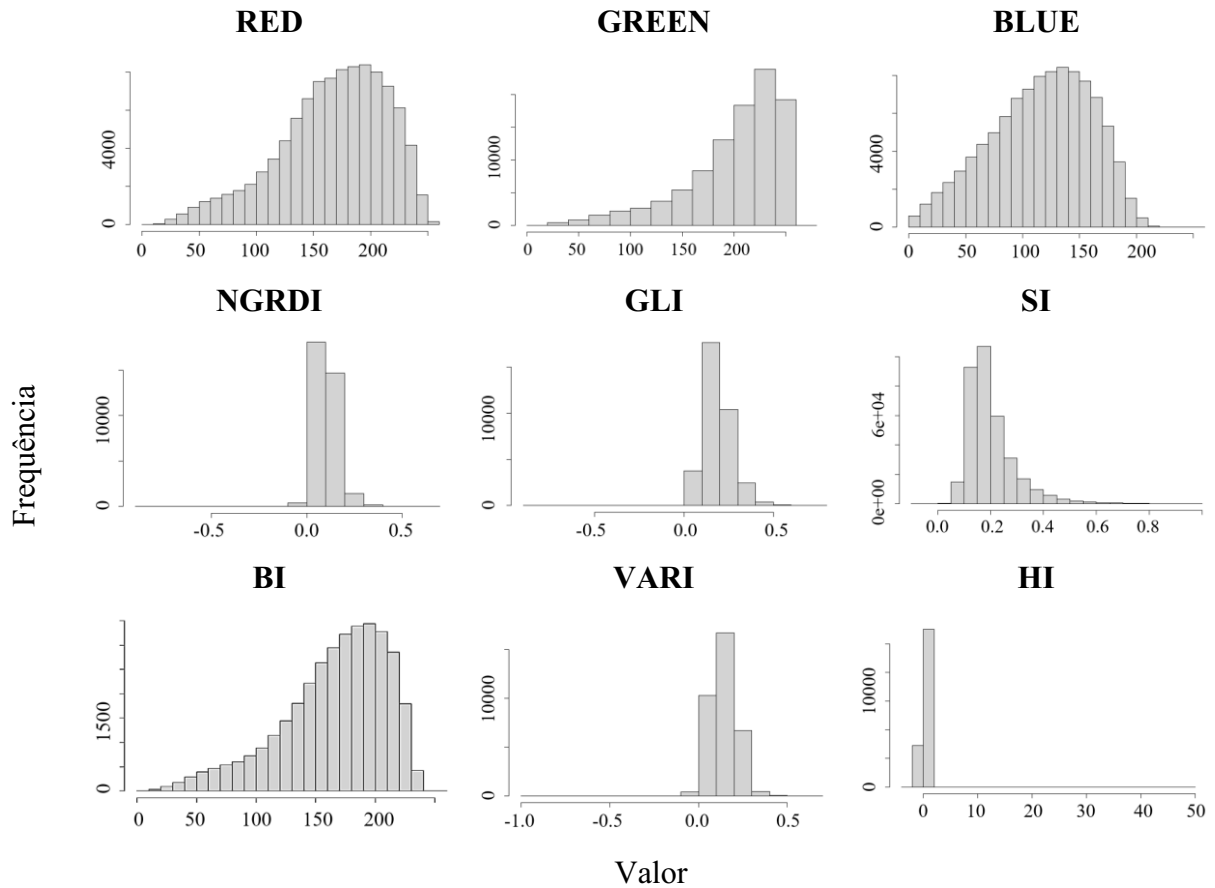


FIGURA 6. Histogramas para as bandas do RED (vermelho), GREEN (Verde), BLUE (Azul) e índices de vegetação como NGRDI = índice de diferença normalizada verde vermelho; GLI= índice de folha verde; SI = índice de saturação de inclinação espectral; BI = índice de brilho; VARI = índice de resistência atmosférica visível e HI = índice de matiz de cores primárias.

Foram extraídos os valores dos índices de vegetação de cada parcela de tratamento. A figura 7 contém a matriz de correlação entre os parâmetros analisados com os índices de vegetação.

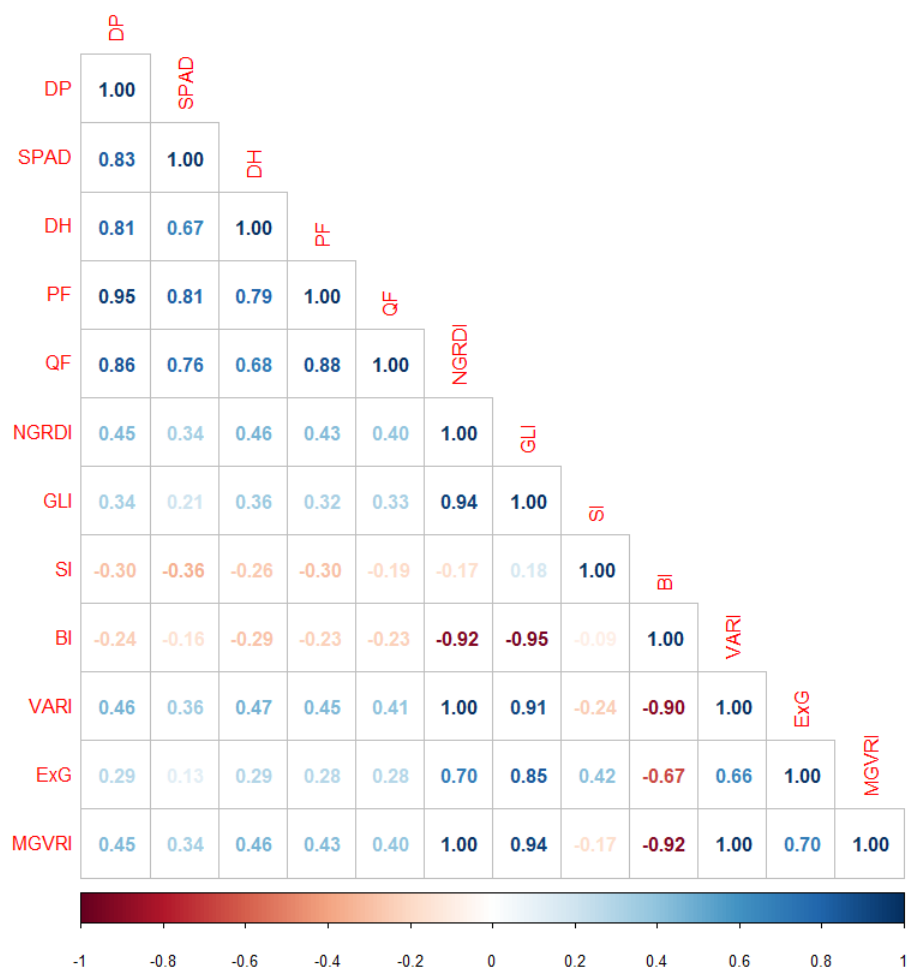


FIGURA 7. Matriz de correlação de Pearson para parâmetros biofísicos da planta, índice SPAD e índice de vegetação. Correlações significativas pelo teste de Pearson a 5% de probabilidade são exibidas em tons de azul (positivas) e vermelho (negativas). DP – Diâmetro da planta; SPAD – Índice SPAD; DH – Diâmetro da haste; PF – Peso fresco da parte aérea; QF – quantidade de folhas; NGRDI = índice de diferença normalizada verde vermelho; GLI= índice de folha verde; SI = índice de saturação de inclinação espectral; BI = índice de brilho; VARI = índice de resistência atmosférica visível; ExG = excesso de índice verde e RGVBI = índice de vegetação azul verde vermelho.

Os parâmetros de diâmetro da planta, índice SPAD, diâmetro da haste, peso fresco da parte aérea e quantidade de folhas tiveram diferentes intensidades de correlação com os índices de vegetação ao nível de 5% de probabilidade. O índice que obteve correlação positiva e com valor superior foi o VARI - índice de resistência atmosférica visível, indicando ser promissor para a predição dos parâmetros avaliados em campo.

O índice VARI apresenta valor de correlação positiva variando de 0,36 até 0,47 para os parâmetros de diâmetro da planta, índice SPAD, diâmetro da haste, peso fresco da parte aérea e quantidade de folhas, respectivamente. Esse índice, assim como NGRDI, GLI, ExG e RGVBI estão relacionados aos parâmetros dos vegetais, sobretudo a altos índices de clorofila,

por isso as correlações positivas, enquanto os índices SI e BI se relacionam aos parâmetros do solo.

Diante dos valores medianos de correlação de Pearson (COHEN, 1988) para o índice de vegetação VARI com os parâmetros agronômicos relacionados à produção da alface, foram gerados modelos de predição dos parâmetros a partir deste índice (Tabela 5). Através do software WEKA e da técnica de predição percentagem split, utilizou-se 90% dos dados para treinamento e o restante para teste, gerando modelos de regressão linear para os parâmetros avaliados. Os modelos também se ajustaram bem indicando o índice de vegetação VARI como bom preditor para os parâmetros relacionados à produção de alface. Verifica-se que é possível prever o parâmetro peso fresco da parte aérea com valor próximo de 75% de confiabilidade, enquanto que o índice SPAD pode ser predito com valor próximo à 96%.

TABELA 5. Modelos de regressão linear para predição de parâmetros agronômicos relacionados à produção de alface gerados pelo índice de vegetação VARI.

Parâmetro	Equação	RMSE	NRMSE (%)
Diâmetro alface	$Y = 704,4108 * VARI + 126,2515$	17,4	7,8
Índice SPAD	$Y = 34,8582 * VARI + 23,8076$	1,1	3,8
Diâmetro da haste	$Y = 71,3722 * VARI + 8,7601$	1,6	8,7
Peso fresco parte aérea	$Y = 819,7168 * VARI - 19,6086$	22,5	24,3
Quantidade de folhas	$Y = 58,7697 * VARI + 13,2721$	1,9	9,1

RMSE = Raiz do Erro Quadrático Médio; NRMSE = Raiz do Erro Quadrático Médio Normalizado

4 DISCUSSÃO

O fungo *Aspergillus niger* contribuiu para o crescimento de alface e por isso apresenta potencial uso como inoculante. O modelo de predição gerado através do índice de vegetação VARI pode ser utilizado para estimar atributos relacionados à produção da alface. O tratamento de sementes é a alternativa mais viável para o efeito de promoção de crescimento de alface em virtude da simplificação do processo de produção, uso do inoculante e da facilidade, mesmo para diferentes doses de P no campo. Para a utilização do inoculante em campo quando não for realizado o tratamento de sementes na produção das mudas, a alternativa mais viável é a utilização da suspensão de conídios com a menor dose de conídios (10^2 conídios planta⁻¹) quando se for utilizar 100% de P.

De maneira geral, a inoculação do fungo por meio do tratamento de sementes contribuiu para promover o crescimento das plantas de alface nas diferentes doses do nutriente fósforo. Na dose de 100% de P, todas as formas de inoculação contribuíram para o

crescimento. Não houve diferença entre as doses de 50 e 100% da necessidade de P, indicando que a reposição na quantidade de 50% foi suficiente. Através da análise de agrupamento, ao nível de 10% de dissimilaridade houve distinção de grupos sem aplicação de P. De acordo com os dados de contribuição relativa dos caracteres, a variável que mais contribuiu para a dissimilaridade entre os tratamentos foi o índice SPAD, este que é correlacionado com a quantidade de pigmentos da folha como a clorofila e carotenoides. Os dados para taxa de crescimento mostram que nas doses de 0 e 50% da necessidade de P, apenas o tratamento de sementes foi superior à não inoculação e que na dose de 100% de P, não houve diferença estatística entre os tratamentos.

A capacidade de solubilização de P e promoção de crescimento de mudas de cafeeiro por este isolado de *A. niger* foram comprovadas em trabalhos anteriores (ARAÚJO et al., 2020; MENDES et al., 2014, 2017). Estes resultados corroboram com os dados dessa pesquisa pela maior promoção de crescimento de alface nos tratamentos onde não houve deficiência de P, indicando que mecanismos como a produção de fitohormônios (BILKAY; KARAKOÇ; AKSOZ, 2010; LUBNA et al., 2018; PATTAEVA; RASULOV, 2015) além da solubilização de P estão presentes em *A. niger*, conforme demonstrado por Araújo e colaboradores (ARAÚJO et al., 2020). Dessa forma, o fungo *A. niger* pode funcionar como um biofertilizante multifuncional (VASSILEV et al., 2015), pois além da capacidade de solubilização de P, possui características de promoção de crescimento.

Outros trabalhos comprovam o uso promissor de microrganismos na promoção de crescimento da alface, como a combinação de *Pseudomonas sp.* e *Trichoderma aureoviride* (MARTINS FILHO et al., 2019). Nesse trabalho, os autores observaram que esses microrganismos, através da produção de enzimas como peroxidase e polifenol oxidase, contribuíram no acréscimo de altura de plantas, dossel, matéria seca, número de folhas e clorofila, corroborando com os dados dessa pesquisa. O efeito promotor de crescimento em alface pode também ser observado pelo fungo *Trichoderma asperellum*, que pode liberar compostos orgânicos voláteis como ácido fosfonoacético, cicloheptano e 2,4-diidroxibenzaldeído, capazes de melhorar o crescimento de alface e aumentar o teor de clorofila (WONGLOM; ITO; SUNPAPAO, 2020).

A fotogrametria e o sensoriamento remoto, aliadas ao processamento digital de imagens constituem-se em ferramentas importantes para a agricultura moderna. Especialmente o uso de imagens aéreas foi expandido nos últimos anos para muitas novas aplicações (RIEHLE; REISER; GRIEPENTROG, 2020). A segmentação de plantas consiste em um componente-chave da análise de imagens digitais na agricultura. Pode ser usado para

modelos de previsão de rendimento, crescimento de culturas e diagnóstico de doenças (RIEHLE; REISER; GRIEPENTROG, 2020). A reflectância espectral e os índices de vegetação têm sido desenvolvidos como principais características espectrais para avaliar o crescimento e produção da vegetação (DUAN et al., 2019). Portanto, avaliar a correlação entre os índices de vegetação com parâmetros biofísicos e índice SPAD, estes relacionados diretamente à produção da vegetação, podem ser utilizados para predição no campo.

O índice VARI atingiu os maiores valores de correlação com os parâmetros de campo, variando de 0,36 a 0,47, valores considerados medianos (COHEN, 1988). Esses índices de vegetação, assim como o GLI, são índices obtidos através de câmera RGB e estão ligados diretamente à parte aérea da planta e com pigmentos como a clorofila e carotenoides. O índice SPAD, parâmetro que expressa indiretamente o conteúdo de clorofila e carotenoide na folha (CASSETARI et al., 2015), foi o que mais contribuiu para a dissimilaridade entre os grupos, atingindo correlação de 0,34 e 0,36 para GNRDI e VARI, respectivamente. O efeito promotor de crescimento pelo inoculante contribuiu por uma maior quantidade dos pigmentos foliares apresentados pelo índice SPAD, devido as consequências da promoção de crescimento sobre a parte de raízes e parte aérea, culminando em maior absorção de nutrientes do solo.

Para possibilitar avaliar os parâmetros de campo por meio de imagens aéreas, foram gerados os modelos de predição utilizando o índice VARI. Diversos modelos já são empregados na cultura da alface para estimar parâmetros como: detecção de chumbo em folhas (ZHOU et al., 2021), crescimento de alface a partir de espectros de reflexão infravermelha do solo (BREURE et al., 2021) e taxa de crescimento e estimativa de peso fresco em leitos de cultivo aquapônico (REYES-YANES; MARTINEZ; AHMAD, 2020). Vale destacar que o presente estudo visa gerar modelos de predição através de índices gerados a partir de imagens obtidas por câmera RGB. Foi calculado o erro de predição através do valor da raiz do erro quadrático médio e do valor real médio dos parâmetros. Os valores indicam erros de apenas 3,8% para índice SPAD e 7,8% para diâmetro da planta. Para peso fresco de planta, o valor de erro foi 24,3%. Portanto, o uso desta técnica possibilita o uso por pesquisadores e produtores, garantindo redução do tempo de avaliação, menor mão de obra e em economia em avaliações não destrutivas.

Portanto, este estudo permite concluir que o método mais viável de inoculação para a promoção de crescimento em diferentes doses de P é o tratamento de sementes. Todos os métodos de inoculação foram superiores à testemunha na dose de 100% de P. Não houve diferença estatística para as doses de 50 e 100% de P. O uso de biofertilizante à base de *A. niger* apresenta potencial como promotor de crescimento e produção de alface no campo. Os

modelos de predição de parâmetros relacionados à produção de alface em campo tiveram bons ajustes.

REFERÊNCIAS

ALAM, G. A study of biopesticides and biofertilisers in Haryana, India. Gatekeeper series, no. 93, n. 93, p. 24, 2000.

ANJUM, F. et al. Applied Clay Science Leaching of metal ions from black shale by organic acids produced by *Aspergillus niger*. Applied Clay Science, v. 47, n. 3-4, p. 356-361, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2009.11.052>

ARAÚJO, V. C. et al. Enhanced growth in nursery of coffee seedlings inoculated with the rhizosphere fungus *Aspergillus niger* for field transplantation. Rhizosphere, v. 15, p. 4, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100236>

BAHALOO-HOREH, N.; MOUSAVI, S. M. Enhanced recovery of valuable metals from spent lithium-ion batteries through optimization of organic acids produced by *Aspergillus niger*. Waste Management, v. 60, p. 666-679, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.10.034>

BENDIG, J. et al. Combining UAV-based plant height from crop surface models, visible, and near infrared vegetation indices for biomass monitoring in barley. International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation, v. 39, p. 79-87, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jag.2015.02.012>

BILKAY, I. S.; KARAKOÇ, S.; AKSOZ, N. *Aspergillus niger*'den indol asetik asit ve gibberellik asit üretimi. Turkish Journal of Biology, v. 34, n. 3, p. 313-318, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.3906/biy-0812-15>.

BRAHMAPRAKASH, G. P.; SAHU, P. K. Biofertilizers for sustainability. Journal of the Indian Institute of Science, v. 92, n. 1, p. 37-62, 2012.

BREURE, T. S. et al. Predicting the growth of lettuce from soil infrared reflectance spectra: the potential for crop management. Precision Agriculture, v. 22, n. 1, p. 226-248, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11119-020-09739-x>

BROGGI, F. et al. Fator capacidade de fósforo em solos de pernambuco mineralogicamente diferentes e influência do pH na capacidade máxima de adsorção. Ciencia e Agrotecnologia, v. 35, n. 1, p. 77-83, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000100009>

CASSETARI, L. S. et al. B-Carotene and Chlorophyll Levels in Cultivars and Breeding Lines of Lettuce. Acta Horticulturae, v. 1083, p. 469-473, 2015. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1083.60>

CEASAR, S. A. Feeding World Population Amidst Depleting Phosphate Reserves: The Role

of Biotechnological Interventions. The Open Biotechnology Journal, v. 12, n. 1, p. 51-55, 2018. DOI: <https://doi.org/10.2174/1874070701812010051>

COHEN, J. Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences. Second Ed. ed. New York: Lawrence Erlbaum Associates, 1988.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. Modelos biométrico aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV, 2012.

DUAN, B. et al. Remote estimation of rice LAI based on Fourier spectrum texture from UAV image. Plant Methods, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0507-8>

ESCADAFAL, R. .; BELGHITH, A. .; BEM, M. H. Indices spectraux pour la télédétection de la dégradation des milieux naturels en Tunisie aride. Mesures physiques et Signatures spectrales en Télédétection, p. 17-21, 1994.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. Revista Symposium, v. 6, p. 36-41, 2008.

FILGUEIRA, F. A. R. Novo Manual de Olericultura. 2008.

FILGUEIRA, F. A. R. Novo manual de olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV, 2013.

FILIPPELLI, G. M. The global phosphorus cycle: Past, present, and future. Elements, v. 4, n. 2, p. 89-95, 2008. DOI: <https://doi.org/10.2113/GSELEMENTS.4.2.89>

GITELSON, A. A. et al. Novel algorithms for remote estimation of vegetation fraction. Remote Sensing of Environment, v. 81, n. 1, p. 76-87, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(01\)00289-9](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(01)00289-9)

HARRELL JR, F. E; DUPONT, C. Package 'hmisc' - R package version 4.5-0. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/Hmisc/index.html>>. Acesso em: 20 set. 2021.

HERRMANN, L.; LESUEUR, D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 97, n. 20, p. 8859-8873, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5228-8>

LOUHAICHI, M. .; BORMAN, M. M. .; JOHNSON, D. E. Spatially located platform and aerial photography for documentation of grazing impacts on wheat. Geocarto International, v. 16, n. 1, p. 65-70, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1080/10106040108542184>

LUBNA; ASAF, S.; HAMAYUN, M.; GUL, H.; LEE, I. J.; HUSSAIN, A. *Aspergillus Niger*

CSR3 regulates plant endogenous hormones and secondary metabolites by producing gibberellins and indoleacetic acid. *Journal of Plant Interactions*, v. 13, n. 1, p. 100–111, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/17429145.2018.1436199>.

LYNCH, J. P. Root phenes for enhanced soil exploration and phosphorus acquisition: Tools for future crops. *Plant Physiology*, v. 156, n. 3, p. 1041-1049, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.111.175414>

MALUSÁ, E.; SAS-PASZT, L.; CIESIELSKA, J. Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. *The Scientific World Journal*, v. 2012, p. 12, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1100/2012/491206>

MALUSÁ, E.; VASSILEV, N. A contribution to set a legal framework for biofertilisers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 98, n. 15, p. 6599-6607, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5828-y>

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, v. 27, p. 209-220, 1967.

MARTINS FILHO, A. P. et al. Combined effect of *Pseudomonas* sp. And *Trichoderma aureoviride* on lettuce growth promotion. *Bioscience Journal*, v. 35, n. 2, p. 419-430, 2019. DOI: <https://doi.org/10.14393/BJ-v35n2a20198-41892>

MATHIEU, R. . et al. Relationships between satellite-based radiometric indices simulated using laboratory reflectance data and typical soil color of an arid environment. *Remote sensing of environment*, v. 66, n. 1, p. 17-28, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(98\)00030-3](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(98)00030-3)

MATIAS, F. I. .; CARAZA-HARTER, M. V. .; ENDELMAN, J. B. FIELDimageR: An R package to analyze orthomosaic images from agricultural field trials. *The Plant Phenome J.*, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/ppj2.20005>

MENDES, G. DE O. et al. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Ann Microbiol*, v. 34, n. 1, p. 239-249, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0656-3>

MENDES, G. DE O. et al. Fermentation liquid containing microbially solubilized P significantly improved plant growth and P uptake in both soil and soilless experiments. *Applied Soil Ecology*, v. 117-118, n. May, p. 208-211, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.05.008>

NASCIMENTO, J. M. DO et al. *Aspergillus niger* as a key to unlock fixed phosphorus in highly weathered soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 156, n. May 2020, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108190>

NIU, Y. F. et al. Responses of root architecture development to low phosphorus availability: A review. *Annals of Botany*, v. 112, n. 2, p. 391-408, 2013. DOI:

<https://doi.org/10.1093/aob/mcs285>

PATTAEVA, M.; RASULOV, B. Growth and Phytohormones Production by Thermophilic *Aspergillus fumigatus* 2 and Thermotolerant *Aspergillus terreus* 8 Strains in Salt Stress. *British Journal of Applied Science & Technology*, v. 8, n. 3, p. 305–312, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.9734/bjast/2015/12292>.

PAVINATO, P. S. et al. Revealing soil legacy phosphorus to promote sustainable agriculture in Brazil. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72302-1>

PYLAK, M.; OSZUST, K.; FRĄC, M. Review report on the role of bioproducts, biopreparations, biostimulants and microbial inoculants in organic production of fruit. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, v. 18, n. 3, p. 597-616, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11157-019-09500-5>

QIU, Z. et al. New frontiers in agriculture productivity: Optimised microbial inoculants and in situ microbiome engineering. *Biotechnology Advances*, v. 37, n. 6, p. 107371, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.010>

REYES-YANES, A.; MARTINEZ, P.; AHMAD, R. Real-time growth rate and fresh weight estimation for little gem romaine lettuce in aquaponic grow beds. *Computers and Electronics in Agriculture*, v. 179, n. April, p. 10, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.compag.2020.105827>

RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ, V. V. H.. Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais - 5^o Aproximação. Viçosa, MG, 1999.

RICHARDSON, A. J. .; WIEGAND, C. L. Distinguishing vegetation from soil background information. *Photogrammetric engineering and remote sensing*, v. 43, n. 12, p. 1541-1552, 1977.

RIEHLE, D.; REISER, D.; GRIEPENTROG, H. W. Robust index-based semantic plant/background segmentation for RGB- images. *Computers and Electronics in Agriculture*, v. 169, n. January, p. 12, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.compag.2019.105201>

SCHRICKX, J. M. . et al. Organic acid production by *Aspergillus niger* in recycling culture analyzes by capillary electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, v. 231, p. 175-181, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1006/abio.1995.1518>

SHARMA, S. B. et al. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, v. 2, n. 587, p. 14, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>

SHEN, J. et al. Phosphorus dynamics: From soil to plant. *Plant Physiology*, v. 156, n. 3, p. 997-1005, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.111.175232>

SIDDIQUI, Z. A. PGPR: Biocontrol and biofertilization. India: Springer, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/1-4020-4152-7>

SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. Microbial phytases in phosphorus acquisition and plant growth promotion. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, v. 17, n. 2, p. 93-103, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12298-011-0062-x>

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. Disponível em: <<http://www.isgpb.org/documents/archive/ijgpb-41-2-010.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2021.

SISMET. Sistema de Monitoramento Meteorológico - Cooxupé (Monte Carmelo). Disponível em: <<http://sismet.cooxupe.com.br:9000/dados/estacao/pesquisarDados/?estCooxupe=1&cdEstacao=12>>. Acesso em: 19 set. 2021.

TUCKER, C. Red and Photographic Infrared Linear Combinations for Monitoring Vegetation. *Remote Sensing of Environment*, v. 8, p. 127-150, 1979. DOI: [https://doi.org/10.1016/0034-4257\(79\)90013-0](https://doi.org/10.1016/0034-4257(79)90013-0)

VASSILEV, N. et al. Unexploited potential of some biotechnological techniques for biofertilizer production and formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, n. 12, p. 4983-4996, 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>

WELLMER, F. W.; SCHOLZ, R. W. The Right to Know the Geopotential of Minerals for Ensuring Food Supply Security: The Case of Phosphorus. *Journal of Industrial Ecology*, v. 19, n. 1, p. 3-6, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/jiec.12230>

WOEBBECKE, D. M. et al. Color indices for weed identification under various soil, residue, and lighting conditions. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, v. 38, n. 1, p. 259-269, 1995. DOI: <https://doi.org/10.13031/2013.27838>

WONGLOM, P.; ITO, S. ICHI; SUNPAPAO, A. Volatile organic compounds emitted from endophytic fungus *Trichoderma asperellum* T1 mediate antifungal activity, defense response and promote plant growth in lettuce (*Lactuca sativa*). *Fungal Ecology*, v. 43, p. 10, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2019.100867>

ZHOU, X. et al. Detection of heavy metal lead in lettuce leaves based on fluorescence hyperspectral technology combined with deep learning algorithm. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 266, p. 8, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120460>

CAPÍTULO 4

Desenvolvimento de feijoeiro inoculado com *Aspergillus niger* sob diferentes doses de adubos fosfatados

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o desenvolvimento de feijoeiros com diferentes formulações de inoculante do microrganismo solubilizador de P *Aspergillus niger* sob diferentes doses e fontes de adubos fosfatados. O experimento foi conduzido em casa de vegetação em fatorial duplo (4x5). O primeiro fator foi composto dos níveis não inoculado, *A. niger* por formulação granular, *A. niger* no tratamento das sementes e um produto comercial à de *Bacillus subtilis* e *Bacillus megaterium* no tratamento de sementes; e o segundo fator composto por diferentes adubações fosfatadas: sem aplicação, superfosfato triplo e fosfato natural Bayóvar nas doses de 50 e 100% da dose recomendada para a cultura. Aos 42 dias após o semeio foram determinados os valores de índice SPAD, altura de plantas, quantidade de folhas trifoliadas, número de nódulos e a massa seca da parte aérea e raiz. O microrganismo solubilizador de fósforo *A. niger* contribui para o desenvolvimento de plantas de feijão, promovendo maior incremento de quantidade de folhas, altura, quantidade de nódulos, peso seco da parte aérea e das raízes comparado ao não inoculado, sendo tão eficiente quanto ao produto comercial. A formulação de *A. niger* usada no tratamento de sementes foi superior à formulação granular. *Aspergillus niger* se mostra compatível com o inoculante de fixação biológica de nitrogênio, além de contribuir no acréscimo de quantidade de nódulos por planta. A fonte e dose de adubo fosfatado que garantiu maiores incrementos nos parâmetros avaliados foi o superfosfato triplo com 100% da necessidade da planta. *Aspergillus niger* apresenta potencial promissor como promotor de crescimento do feijoeiro.

Palavras-chave: Promoção de crescimento, inoculação, microrganismo.

1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é considerado a leguminosa mais importante para o consumo humano nos países em desenvolvimento. Em escala mundial, o feijoeiro é a terceira leguminosa mais importante para nutrição humana e animal, atrás apenas da soja e do amendoim (FAGERIA et al., 2015). Está difundido praticamente em todo o território brasileiro, sendo cultivado por grandes, médios e pequenos produtores que essencialmente abastecer o mercado interno (GONZAGA, 2014).

A cultura do feijoeiro é de ciclo curto, permitindo a obtenção de três safras anuais no Brasil. Para a safra 2021/2022, compreendendo as três épocas de semeio, a estimativa realizada pela CONAB é que a produção seja de 2,97 milhões de toneladas, 3,1% superior à safra anterior (CONAB, 2021). Representa um dos alimentos de vários povos e um dos componentes básicos da dieta dos brasileiros, constituindo a sua principal fonte de proteína vegetal. Seu teor proteico pode chegar a 33%, com valor energético de 341 cal para cada 100 g (SILVA; WANDER, 2013). Ele apresenta cerca de metade do teor de proteína da soja, porém é de melhor digestibilidade proteica (79%) (FAGERIA et al., 2015).

Sendo o fósforo um nutriente de frequente resposta positiva para o feijoeiro, a baixa disponibilidade nos solos brasileiros limita o crescimento e desenvolvimento, conseqüentemente a produtividade (PASTORINI et al., 2000). Nas plantas, o fósforo participa de inúmeras funções fisiológicas como a fotossíntese, armazenamento e transferência de energia, respiração e a divisão celular (MULLINS, 2009). Nos solos ácidos, o P pode formar compostos insolúveis com íons e óxidos de Al e Fe, já em neutros e alcalinos, forma compostos moderadamente solúveis com Ca e Mg, além de ser adsorvido nas superfícies de carbonato de Ca e Mg (HOLFORD, 1997).

O uso dos microrganismos benéficos nos sistemas de cultivo pode contribuir para uma agricultura mais sustentável pela diminuição de adubos e defensivos químicos, promovendo melhorias no desenvolvimento das culturas e na produção de grãos sem danificar o meio ambiente (MONDANI et al., 2019; SILVA et al., 2020). A solubilização de fósforo compreende um processo realizado por microrganismos. A liberação do nutriente pelo processo de solubilização promove a disponibilização para a planta e conseqüentemente o maior desenvolvimento desta (SCHMIDT; MESSMER; WILBOIS, 2015).

O uso do fungo *Aspergillus niger* como inoculante pode trazer benefícios para o desenvolvimento da cultura do feijoeiro. Dentre seus benefícios, destacam-se os mecanismos de solubilização de minerais fosfatados (MENDES et al., 2014), produção dos fitormônios

ácido indolacético e giberelina (LUBNA et al., 2018) e potencial de promoção de crescimento (ARAÚJO et al., 2020). Todos esses benefícios podem contribuir para maior crescimento radicular, maior exploração dos recursos do solo e maior crescimento vegetativo. Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar o desenvolvimento de feijoeiro com diferentes formulações de inoculante à base de *A. niger* com diferentes doses e fontes de adubos fosfatados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, situada na região de Patos de Minas – MG, sob as coordenadas 18° 43' 59" S e 46° 40' 13" O e altitude de 891 metros, localizada na empresa NOOA.

2.2 Delineamento experimental

Para a montagem do experimento, utilizou-se o delineamento de blocos casualizados em fatorial duplo (4x5). O primeiro fator foi composto por 4 formas de inoculação: não inoculado, *Aspergillus niger* por formulação granular, *Aspergillus niger* no tratamento das sementes e produto comercial à base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus megaterium* (Biomaphos) no tratamento de sementes; e o segundo fator composto por 5 diferentes adubações fosfatadas: sem aplicação, super fosfato triplo e fosfato natural Bayóvar nas doses de 50 e 100% da dose recomendada para a cultura, onde 50% refere-se à dose de 55 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 100% de 110 kg ha⁻¹ de P₂O₅. Foram 20 tratamentos e 5 repetições, totalizando 100 parcelas (Tabela 1). Cada parcela foi composta por 2 vasos e 2 plantas em cada um.

TABELA 1. Tratamentos e descrição

Tratamentos*	Inoculação	Dose de P ₂ O ₅ (% da recomendada)	Fonte P
NI	Não inoculado	0	-
NI - TSP 50	Não inoculado	50	TSP
NI - TSP 100	Não inoculado	100	TSP
NI - FN 50	Não inoculado	50	FN
NI - FN 100	Não inoculado	100	FN
An	<i>A. niger</i> - Granular	0	-
An - TSP 50	<i>A. niger</i> - Granular	50	TSP
An - TSP 100	<i>A. niger</i> - Granular	100	TSP
An - FN 50	<i>A. niger</i> - Granular	50	FN
An - FN 100	<i>A. niger</i> - Granular	100	FN
An TS	<i>A. niger</i> – Tratamento de sementes	0	-
An TS - TSP 50	<i>A. niger</i> – Tratamento de sementes	50	TSP
An TS - TSP 100	<i>A. niger</i> – Tratamento de sementes	100	TSP
An TS - FN 50	<i>A. niger</i> – Tratamento de sementes	50	FN
An TS - FN 100	<i>A. niger</i> – Tratamento de sementes	100	FN
BP	<i>B. megaterium</i> / <i>subtilis</i>	0	-
BP - TSP 50	<i>B. megaterium</i> / <i>subtilis</i>	50	TSP
BP - TSP 100	<i>B. megaterium</i> / <i>subtilis</i>	100	TSP
BP - FN 50	<i>B. megaterium</i> / <i>subtilis</i>	50	FN
BP - FN 100	<i>B. megaterium</i> / <i>subtilis</i>	100	FN

*TSP: Superfosfato triplo; FN: Fosfato natural; An: biofertilizante granular com *A. niger*; TS: tratamento de sementes.

2.3 Produção e aquisição dos inoculantes de microrganismos solubilizadores de fósforo

Inicialmente foi realizada a produção da formulação granular de *A. niger*. O microrganismo solubilizador de fósforo *A. niger* FS1 foi obtido previamente em solo na região de Viçosa – MG (MENDES et al., 2014). Inicialmente foram produzidos conídios em placas de Petri contendo o meio de cultura batata dextrose ágar (BDA, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) incubadas em câmara BOD a 30 °C durante o período de 10 dias. Os conídios foram coletados em solução aquosa com Tween 80 a 0,01 % (v/v). Essa suspensão foi filtrada por meio de uma bomba a vácuo e através de uma membrana com poros de 0,45 µm e o filtro com os conídios foi seco em dessecador com sílica gel à temperatura ambiente (25 °C) durante o período de 24 h. Em seguida, os conídios secos foram coletados e armazenados em tubos eppendorf à temperatura ambiente (ARAÚJO et al., 2020). A massa de conídios secos continha $4,5 \times 10^7$ conídios mg⁻¹, conforme contagem em câmara de Neubauer.

Foi realizada a mistura de conídios secos em 26,5 g de farinha de trigo, 3,8 g de amido de milho, 2,25 g de açúcar e 15 mL de água deionizada (ARAÚJO et al., 2020). A quantidade

de conídios secos foi de 128,02 mg para produzir a concentração de 10^6 conídios por grânulo. A massa média de cada grânulo foi de 22,6 mg. A massa foi aberta em máquina de macarrão e extrusada em filamentos de aproximadamente 2 mm de diâmetro, foram cortados os grânulos em 2 mm de comprimento e secos em estufa de circulação forçada de ar a 50 °C durante 48 horas até atingirem umidade resultante de 3% (ARAÚJO et al., 2020). Para o tratamento de sementes de feijão, utilizou-se uma formulação WG na concentração de $7,2 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$, obtida da empresa NOOA. Para o tratamento de sementes com os microrganismos *Bacillus subtilis* e *B. megaterium*, utilizou-se o produto comercial BiomaPhos de concentração de $4 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$, obtido da empresa Bioma.

2.4 Desenvolvimento do experimento

Foram retiradas amostras de solo na camada de 0 – 20 cm de profundidade classificado como Latossolo Vermelho (SANTOS et al., 2013). Foi realizada análise química do solo e obteve-se os valores de P-Mehlich de $1,97 \text{ mg dm}^{-3}$ e P rem de $5,43 \text{ mg dm}^{-3}$. Foi adicionada a quantidade de 4 litros de solo em cada vaso. A interpretação e correção dos atributos químicos, assim como a recomendação da dose de fósforo, foi realizada de acordo com as recomendações para a cultura (RIBEIRO; GUIMARÃES; ALVAREZ, 1999). Antes do semeio, foi realizada a aplicação dos adubos fosfatados nos respectivos tratamentos, de acordo com o volume de solo presente nos vasos. A variedade utilizada foi o feijão carioca.

Foi realizado o tratamento de sementes com *A. niger* na dose de 4×10^6 por semente e de BiomaPhos na dose do fabricante, cujo valor foi de 2 mL por kg de semente. A aplicação do *A. niger* por meio da formulação granular na concentração de 4×10^6 conídios grama⁻¹ foi realizada na quantidade de 1 grânulo por semente aplicado no sulco no momento do semeio. Em todos os tratamentos foi realizada a inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio utilizando o produto comercial Nitro 1000 Feijão, composto pela espécie *Rhizobium tropici* Semia 4077 por meio de tratamento de sementes na dose recomendada pelo fabricante. O semeio foi realizado no dia 2 de junho de 2021 na profundidade de 3 cm, distribuindo-se 6 sementes por vaso. Após 10 dias foi realizado o desbaste, deixando apenas 2 plantas de feijoeiro por vaso. A irrigação foi realizada de maneira manual de acordo com a necessidade da cultura. Os tratos culturais foram semelhantes para todos os tratamentos.

2.5 Avaliações

Aos 42 dias após o semeio foram determinados os valores de índice SPAD / carotenoide (CASSETARI et al., 2015) por meio da média da leitura do índice de 2 folhas de cada planta por parcela. A leitura foi realizada por meio de equipamento medidor de clorofila (Minolta SPAD-502CFL1030). Com o auxílio de um trena foi determinada a medida de altura, realizou-se a contagem de folhas trifoliadas e da quantidade de nódulos. Além disso, foram determinados os pesos de massa seca da parte aérea e raiz em balança analítica após permanecerem em estufa a 65 °C por 72 horas.

2.6 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos ao teste de Rosner para detecção e remoção de outliers por meio do pacote “Detecção de outliers em R” (SOETEWEEY, 2020). Em seguida foi realizada a média entre os vasos e os atributos para as 2 plantas de cada. Os resultados foram submetidos à ANAVA, teste F e comparou-se as médias pelo teste t (LSD) a nível de 5% de probabilidade. A dissimilaridade entre os tratamentos foi representada por meio de dendrograma. Este foi obtido pelo método hierárquico e pela ligação média entre grupos não ponderados (UPGMA) a partir da distância euclidiana como medida de dissimilaridade. O coeficiente de correlação cofenética (CCC) foi gerado para validar os agrupamentos, calculado pelo teste de Mantel (MANTEL, 1967) no software Genes. Foi determinada a contribuição relativa de cada variável para a dissimilaridade entre os agrupamentos por meio do método de Singh (SINGH, 1981). Estes dados foram gerados a partir do software computacional em genética e estatística Genes (versão 2021.146).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado diferença estatística (teste F, $p < 0,05$) para todas as variáveis, exceto para o índice SPAD (Tabela 2). De maneira geral, a inoculação do fungo *A. niger* promoveu o crescimento de plantas de feijão e aumentou a quantidade de nódulos presentes nas raízes quando comparado ao não inoculado nas diferentes fontes e doses de P. A formulação WG à base de *A. niger* utilizada no tratamento de sementes foi superior à formulação granular, além de equiparar-se com os resultados obtidos com o produto comercial que contém as bactérias *B. megaterium* e *subtilis*.

Tabela 2. Índice SPAD, quantidade de folhas, altura, quantidade de nódulos, peso de massa seca da parte aérea e seca de feijão sob diferentes formas de inoculação, fontes e doses de P

Índice SPAD					
Inoculação	Sem P	TSP 50	TSP 100	FN 50	FN 100
NI	36,4 aA	36,0 aA	36,6 aA	36,6 aA	36,3 aA
An	35,5 aA	36,0 aA	36,5 aA	35,7 aA	36,3 aA
An TS	36,6 aA	37,0 aA	36,3 aA	36,6 aA	36,8 aA
BP	35,8 aA	35,7 aA	38,3 aA	36,5 aA	36,2 aA
CV (%):	6,0				
Quantidade de folhas (un)					
NI	1,6 aA	1,6 aA	1,2 bA	1,3 cA	1,3 bA
An	1,6 aAB	1,7 aAB	2,0 aA	1,4 bcC	1,3 bC
An TS	1,7 aB	2,0 aAB	2,4 aA	1,8 abB	1,9 aB
BP	2,0 aA	2,0 aA	2,4 aA	2,0 aA	2,0 aA
CV (%):	21,6				
Altura (cm)					
NI	15,5 bA	15,4 bA	14,7 bA	14,3 bA	13,4 bA
An	16,5 abAB	16,1 abAB	17,7 aA	15,5 abAB	14,5 bB
An TS	15,2 bB	18,0 aA	19,8 aA	17,4 aAB	17,7 aAB
BP	18,7 aA	18,0 aA	19,1 aA	17,8 aA	18,2 aA
CV (%):	11,8				
Quantidade de nódulos (un)					
NI	4,8 bA	5,2 bcA	5,3 bA	5,6 bA	4,2 cA
An	8,0 abA	5,0 cA	6,1 bA	7,6 abA	4,9 bcA
An TS	5,7 bcC	9,6 abBC	14,5 aA	11,6 aAB	9,2 abBC
BP	12,0 aA	11,4 aA	12,0 aA	11,4 aA	11,9 aA
CV (%):	42,7				
Peso de massa seca da parte aérea (mg)					
NI	350,0 aA	274,0 cAB	190,0 cAB	210,0 aAB	158,0 bB
An	256,0 aA	318,0 abA	394,0 bA	236,0 aA	308,0 abA
An TS	224,0 aB	362,0 abB	614,0 aA	352,0 aB	292,0 abB
BP	376,0 aB	462,0 aB	666,0 aA	342,0 aB	454,0 aB
CV (%):	39,7				
Peso de massa seca da raiz (mg)					
NI	336,0 bA	372,0 bA	256,0 cA	408,0 bA	272,0 bA
An	330,0 bB	364,0 bAB	560,0 bA	384,0 bAB	382,0 abAB
An TS	442,0 abB	548,0 abB	902,0 aA	526,0 abB	536,0 aB
BP	566,0 aA	676,0 aA	764,0 abA	728,0 aA	552,0 aA
CV (%):	36,6				

*NI – Não inoculado; An – *A. niger* por tratamento granular; An TS – *A. niger* por tratamento de sementes; BP – *B. megaterium* e *subtilis* por tratamento de sementes. Médias seguidas de mesma letra minúscula comparando inoculação e maiúscula comparando doses de adubos fosfatados não diferem entre si pelo teste T (LSD) a 5% de probabilidade.

A capacidade de solubilização de P e a promoção de crescimento de mudas de cafeeiros já foi comprovada por este isolado de *A. niger*, em trabalhos anteriores (ARAÚJO et al., 2020); MENDES et al., 2014, 2017). Portanto, os resultados encontrados nesses estudos

corroboram com os dados nessa presente pesquisa pela maior promoção de crescimento de feijoeiros nos tratamentos com diferentes fontes e doses do nutriente P. Verificou-se que entre as fontes de P, a que promoveu maiores ganhos entre os parâmetros avaliados foi com o superfosfato triplo. Em um trabalho realizado com esse tipo de fonte, pesquisadores verificaram que isolada ou combinada com fontes naturais contribuíram no crescimento e no desempenho produtivo do feijoeiro. Além disso, a associação dessa fonte com o microrganismo solubilizador de fósforo *B. subtilis* promoveu maior crescimento de raízes e da parte aérea (ZUCARELI et al., 2018).

As plantas inoculadas com os solubilizadores de fósforo atingiram maiores incrementos de altura, quantidade de nódulos e peso da massa seca no tratamento sem a adição de fósforo. Pesquisadores avaliaram isolados de bactérias solubilizadoras de P no crescimento e desenvolvimento do feijoeiro e verificaram que na ausência de P, a associação promoveu maiores ganhos de peso seco e quantidades de absorção de P e N. Também verificaram que a solubilização de P pode não ser o único mecanismo responsável pela resposta positiva ao crescimento das plantas (VIEIRA et al., 2021). No presente estudo, verifica-se maiores incrementos dos parâmetros avaliados nas plantas inoculadas mesmo quando o P foi aplicado em 100% da exigência da cultura. Nesse sentido, o fungo *A. niger* pode funcionar como um biofertilizante multifuncional (VASSILEV et al., 2015), pois além da capacidade de solubilização de P, possui características de promoção de crescimento.

Constatou-se que a aplicação dos inoculantes para solubilização de P aumentaram o número de nódulos nas raízes, estes que são responsáveis pela fixação biológica de nitrogênio. Em um estudo, pesquisadores realizaram a aplicação de *Pseudomonas oryzae*, cepa capaz de solubilizar o nutriente P, juntamente com *Bradyrhizobium* sp. na cultura da soja. Os dados indicaram que a aplicação em conjunto contribuiu para o aumento de número e peso seco de nódulos e acréscimo no teor de leg-hemoglobina. Além disso, realizaram uma análise foliar das plantas aos 90 dias e identificaram maiores incrementos de N, P e K (KUMAWAT et al., 2022). Esses dados indicam que a aplicação conjunta contribui não apenas para o acréscimo da quantidade de bactérias fixadoras de nitrogênio, mas também para a maior fixação do nutriente para a planta.

Para a análise de agrupamento, foram obtidos 7 grupos distintos (Figura 1) ao nível de 16% de dissimilaridade, onde ocorre a mudança abrupta dos tratamentos. O coeficiente de correlação cofenética obteve o valor de 79,91% (CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, 2012), sendo significativo ao teste t ($p < 0,01$). Dessa forma, pode-se afirmar

que reproduziram de maneira satisfatória as informações contidas na matriz e consequentemente na formação dos grupos.

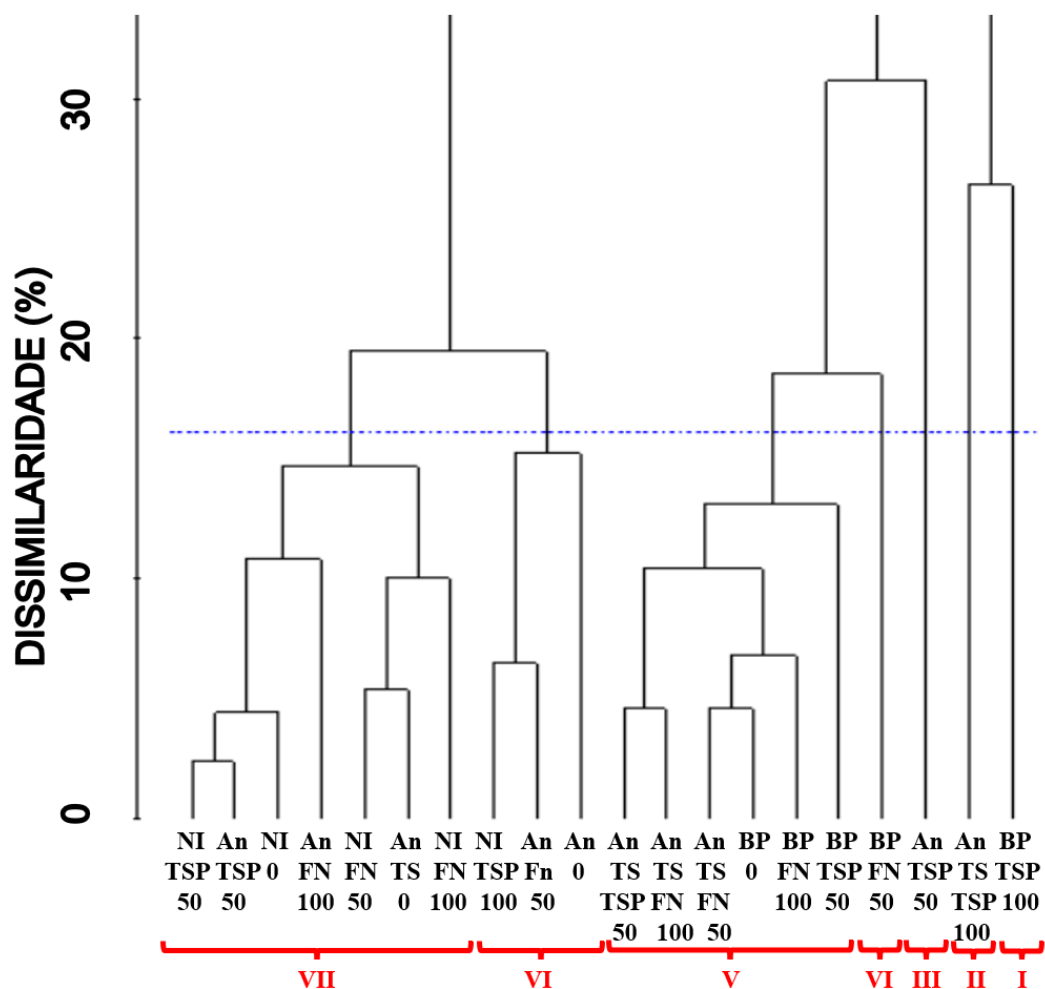


FIGURA 1. Dendrograma comparando inoculação (NI: não inoculado, An: *A. niger* em formulação granular, An TS: *A. niger* no tratamento de sementes e BP: *B. megaterium* e *subtilis* por tratamento de sementes) e doses de adubos fosfatados (0, 50 e 100% de P da recomendação para a cultura com diferentes fontes – TSP: Superfosfato triplo e FN: Fosfato natural), obtido pelo método de agrupamento ligação média entre grupo – UPGMA.

Observa-se na figura 1 que os tratamentos com o produto comercial e *A. niger* em tratamento de sementes combinados com superfosfato triplo na dose de 100% ficaram em grupos distintos e isolados. Na dose de 50%, com essa mesma fonte de fosfatado, essas inoculações permaneceram em um mesmo grupo, indicando semelhança em resposta na cultura do feijoeiro.

Foi realizada análise de contribuição relativa dos caracteres para dissimilaridade entre os tratamentos (Tabela 3). De acordo com os dados, as variáveis respostas que mais contribuíram foram a quantidade de folhas e de nódulos. Em média, nas diferentes fontes e

doses de adubos fosfatados, a inoculação de *A. niger* com formulação granular promoveu ganhos de 14,3% e 25,9% para quantidade de folhas e nódulos, respectivamente, quando comparado ao não inoculado. Já para a formulação em tratamento de sementes, o ganho foi ainda superior, com valores de 40% e 101,6% para as mesmas avaliações respectivas em relação ao controle. Stajković-srbinić e colaboradores (2021) avaliaram a co-inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* e duas cepas de *Pseudomonas* sp. capazes de solubilizar P sobre a produção de sementes e absorção de macronutrientes na soja. Segundo os autores, a co-inoculação contribuiu para ganho de rendimento de sementes em até 134%, além da absorção de nutrientes como o N, P, K, Mg e Ca no valor de máximo de 167%.

TABELA 3. Contribuição relativa para a dissimilaridade entre os agrupamentos formados segundo Singh (1981)

Variável resposta	S. J.	Valor %
Índice SPAD	40,4	4,0
Quantidade de folhas	252,0	24,9
Altura	97,7	9,6
Quantidade de nódulos	236,1	23,3
Peso massa seca da parte aérea	201,1	19,9
Peso massa seca da raiz	185,7	18,3

Os dados dessa pesquisa indicam o uso positivo e promissor do fungo *A. niger* no desenvolvimento do feijoeiro, apresentando potencial uso como inoculante para essa cultura. Além disso, a formulação em tratamento de sementes equipara-se ao produto comercial usado como referência. Vale ressaltar que nesse estudo as diferentes concentrações do inoculante não foram avaliadas, ficando como sugestão para futuros trabalhos, a fim de atingir o máximo potencial da tecnologia. A utilização de microrganismos solubilizadores de P capazes de promover o crescimento de plantas, representa uma técnica promissora e importante para melhorar a produção mundial de alimentos com menores danos ao meio ambiente (ALORI; GLICK; BABALOLA, 2017).

4 CONCLUSÃO

O microrganismo solubilizador de fósforo *A. niger* contribui para o desenvolvimento de plantas de feijoeiro, promovendo maior incremento de quantidade de folhas, altura, quantidade de nódulos, peso seco da parte aérea e das raízes quando comparado ao controle não inoculado. A formulação WG usada no tratamento de sementes foi superior à formulação

granular. *Aspergillus niger* se mostra compatível com o inoculante de fixação biológica de nitrogênio, além de contribuir no acréscimo de quantidade de nódulos por planta. A fonte e dose de adubo fosfatado que garantiu maiores incrementos nos parâmetros avaliados foi o superfosfato triplo com 100% da necessidade da planta. *Aspergillus niger* apresenta potencial uso promissor como promotor de crescimento de plantas de feijoeiro.

REFERÊNCIAS

- ALORI, E. T.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, n. June, p. 1-8, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>
- ARAÚJO, V. C. et al. Enhanced growth in nursery of coffee seedlings inoculated with the rhizosphere fungus *Aspergillus niger* for field transplantation. *Rhizosphere*, v. 15, p. 4, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100236>
- CASSETARI, L. S. et al. B-Carotene and Chlorophyll Levels in Cultivars and Breeding Lines of Lettuce. *Acta Horticulturae*, v. 1083, p. 469-473, 2015. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1083.60>
- CONAB. Acompanhamento da safra Brasileira 21/22 1o levantamento. Companhia Nacional De Abastecimento, v. 9, n. 1, p. 1-87, 2021.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. Modelos biométrico aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV, 2012.
- FAGERIA, N. K. et al. Nutrição mineral do feijoeiro. Brasília - DF: EMBRAPA, 2015.
- GONZAGA, A. C. DE O. Feijão : o produtor pergunta, a Embrapa responde. 2 ed. rev. ed. Brasília - DF: Embrapa Arroz e Feijão, 2014.
- HOLFORD, I. C. R. Soil phosphorus: Its measurement, and its uptake by plants. *Australian Journal of Soil Research*, v. 35, n. 2, p. 227-239, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1071/S96047>
- KUMAWAT, K. C. et al. Co-inoculation of indigenous *Pseudomonas oryzae* and *Bradyrhizobium* sp. modulates the growth, symbiotic efficacy, nutrient acquisition, and grain yield of soybean. *Pedosphere*, v. 32, n. 3, p. 438-451, 2022. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(21\)60085-1](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(21)60085-1)
- LUBNA et al. *Aspergillus Niger* CSR3 regulates plant endogenous hormones and secondary metabolites by producing gibberellins and indoleacetic acid. *Journal of Plant Interactions*, v. 13, n. 1, p. 100-111, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/17429145.2018.1436199>
- MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach.

Cancer Research, v. 27, p. 209-220, 1967.

MENDES, G. DE O. et al. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Ann Microbiol*, v. 34, n. 1, p. 239-249, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0656-3>

MENDES, G. DE O. et al. Fermentation liquid containing microbially solubilized P significantly improved plant growth and P uptake in both soil and soilless experiments. *Applied Soil Ecology*, v. 117-118, n. May, p. 208-211, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.05.008>

MONDANI, F. et al. Evaluating effects of plant growth-promoting rhizobacteria on the radiation use efficiency and yield of soybean (*Glycine max*) under water deficit stress condition. *Agricultural Water Management*, v. 213, p. 707-713, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2018.11.004>

MULLINS, G. Phosphorus, Agriculture & The Environment. Virginia: College of Agriculture and Life Sciences, 2009.

PASTORINI, L. H. et al. Crescimento inicial de feijoeiro submetido a diferentes doses de fosforo em solucao nutritiva. *Revista Ceres*, v. 17, n. 0034-737X, p. 219-228, 2000.

RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ, V. H. V. Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais - 5º Aproximação. Viçosa – MG, 1999.

SANTOS, H. G. DOS et al. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 3. ed. Brasília, v. 3, 2013.

SCHMIDT, J.; MESSMER, M.; WILBOIS, K. Beneficial microorganisms for soybean (*Glycine max* (L.) Merr), with a focus on low root-zone temperatures. *Plant Soil*, v. 397, p. 411-445, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2546-x>

SILVA, O. F. DA; WANDER, A. E. O feijão-comum no Brasil: passado, presente e futuro. *Embrapa Arroz e Feijão*, v. 287, p. 1-63, 2013.

SILVA, M. A. et al. Individual and combined growth - promoting microorganisms affect biomass production, gas exchange and nutrient content in soybean plants. *Rev. Caatinga*, v. 33, n. 3, p. 619-632, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/1983-21252020v33n305rc>

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. Disponível em: <<http://www.isgpb.org/documents/archive/ijgpb-41-2-010.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2021.

SOETEWEEY, A. Outliers detection in R - Stats and R. Disponível em: <<https://statsandr.com/blog/outliers-detection-in-r/#introduction>>. Acesso em: 23 jan. 2022.

STAJKOVIĆ-SRBINOVIĆ, O. et al. Effect of inoculation with Bradyrhizobium and phosphate solubilizing bacteria on soybean seed yield and composition. *ZEMLJISTE I*

BILJKA, v. 70, n. 2, p. 56-66, 2021. DOI: <https://doi.org/10.5937/ZemBilj2102056S>

VASSILEV, N. et al. Unexploited potential of some biotechnological techniques for biofertilizer production and formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, n. 12, p. 4983-4996, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6656-4>

VIEIRA, R. F. et al. Improvement of growth of common bean in phosphorus-deficient soils by phosphate-solubilizing and phytohormone-producing bacteria. *Agronomia Colombiana*, v. 39, n. 3, p. 352-360, 2021.

ZUCARELI, C. et al. Associação de fosfatos e inoculação com *Bacillus subtilis* e seu efeito no crescimento e desempenho produtivo do feijoeiro. *Revista Ceres*, v. 65, n. 2, p. 189-195, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/0034-737x201865020011>