

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Camila Patrícia Favaro

**BIOFERTILIZANTES COMO REATORES EM GRÂNULO: SISTEMAS
CARREADORES COM *Aspergillus niger* E *Trichoderma
asperelloides* PARA AÇÕES NO CONTROLE BIOLÓGICO,
PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTAS E SOLUBILIZAÇÃO
DE FÓSFORO**

São Carlos

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Camila Patrícia Favaro

**BIOFERTILIZANTES COMO REATORES EM GRÂNULO: SISTEMAS
CARREADORES COM *Aspergillus niger* E *Trichoderma
asperelloides* PARA AÇÕES NO CONTROLE BIOLÓGICO,
PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTAS E SOLUBILIZAÇÃO
DE FÓSFORO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientadora: Dra. Cristiane Sanchez Farinas

São Carlos
2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Camila Patrícia Favaro, realizada em 14/10/2021.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Cristiane Sanchez Farinas (EMBRAPA)

Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior (UFSCar)

Prof. Dr. Alberto Carlos de Campos Bernardi (EMBRAPA)

Prof. Dr. Cauê Ribeiro de Oliveira (EMBRAPA)

Prof. Dr. Wagner Bettiol (EMBRAPA)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.
O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade de evoluir como pessoa a cada dia de vida.

Agradeço aos meus pais, pelo incentivo, suporte e exemplo que são para a construção do meu ser. Aos meus irmãos, por, cada um à sua maneira, compartilharem vivências e me ensinarem tanto. A minha família, avós, tios e primos que foram essenciais para a construção do meu ser.

Agradeço à Dra. Cristiane Sanchez Farinas, pelos anos de experiência compartilhados e orientação profissional.

Agradeço ao suporte do Dr. Caue de Oliveira Ribeiro e do Dr. Wagner Bettiol no desenrolar desse trabalho.

Agradeço a tantos gigantes/mentores/professores que contribuíram para a minha formação e, ao longo da minha jornada, além de ensinar teorias, foram fonte de inspiração.

Aos técnicos de laboratório da Embrapa Instrumentação, em especial à Adriana, Silviane, Joana e Ana, gratidão pela disponibilidade e eficiência no suporte.

Aos meus colegas da Embrapa Instrumentação, pelo apoio, parceria, conhecimentos e pelas muitas horas de laboratório compartilhadas.

Gratidão especial aos meus amigos, que são a família que eu escolhi. Muito bom poder compartilhar os momentos de descontração, de superação, de crescimento, amadurecimento e, principalmente, pela parceria na caminhada da busca da melhoria como pessoas.

A todos que passaram na minha vida e muito me ensinaram, contribuindo na minha formação como pessoa, e conseqüentemente, direta ou indiretamente nesse trabalho.

À Embrapa Instrumentação, pelo apoio institucional e infraestrutura a pesquisa.

Ao CNPq, à CAPES e à FAPESP, pelo apoio financeiro. E à Universidade Federal de São Carlos e ao PPG-EQ, pelo apoio institucional.

Muito obrigada!!!

“Se vi mais longe foi por estar sobre os ombros de gigantes”

- **Isaac Newton**

RESUMO

Nos últimos anos tem se destacado a importância do papel que os microrganismos desempenham na manutenção da produtividade agrícola, sendo essenciais na ciclagem de nutrientes e produção de metabólitos que contribuem com o crescimento e proteção das plantas. Todos esses fatores têm influenciado no crescimento do mercado dos produtos biológicos. Porém, estudos ainda se fazem necessários para aprimoramento e desenvolvimento de tecnologias de produção e manutenção da qualidade desses produtos. Buscando associar a utilização de rochas fosfáticas não processadas, desenvolveu-se um processo, passível de escalonamento, a partir da extrusão a frio para produção de um grânulo biofertilizante. Esse grânulo atua como um micro reator, onde, na própria formulação tem nutrientes para suporte inicial do crescimento dos microrganismos e produção de metabólitos capazes de atuar na solubilização do fósforo, controle biológico e promoção do crescimento de plantas. Na primeira etapa desse trabalho, foram avaliadas a capacidade de solubilização de P a partir de *Aspergillus niger* e *Trichoderma* spp., isolados e combinados em cultivo submerso, utilizando diferentes rochas fosfáticas em pó. Nessa etapa, selecionou-se as cepas e a rocha fosfática a serem utilizadas no desenvolvimento do grânulo. Em seguida, foi desenvolvido o processo de produção dos grânulos biofertilizantes, com as cepas isoladas e combinadas. No grânulo biofertilizante observou-se um aumento de até 150% na solubilização de P quando comparada aos cultivos com a rocha fosfática em pó. O confronto *in vitro* do biofertilizante com o *Fusarium oxysporum* demonstrou a capacidade do *T. asperelloides* de controle biológico desse patógeno, e que a combinação com o *A. niger* não afetou capacidade do *T. asperelloides*. Posteriormente, visando diminuir os custos na produção do grânulo e reduzir a geração de resíduos, o próprio substrato de cultivo dos microrganismos (grãos de arroz) foi utilizado como fonte de nutriente na formulação. Avaliou-se a viabilidade das formulações em armazenamento a temperatura de 4 °C e temperatura ambiente, evidenciando a importância do estudo das condições de armazenamento para manutenção da qualidade do produto. Por fim, os grânulos biofertilizantes com os microrganismos isolados e combinados, foram avaliados em sistema solo-planta em rizotron, analisando o crescimento das raízes e da planta de tomate e a dinâmica do fósforo no substrato de cultivo. A presença do *T. asperelloides* acarretou diferenças estatisticamente significativas na altura da planta enquanto a presença de *A. niger* gerou um aumento de P nas frações que apresentaram maior dinâmica de migração desse componente para as frações mais lábeis, o que demonstrou o potencial de aplicabilidade do produto. O desenvolvimento do processo de produção desse grânulo biofertilizante por extrusão a frio abre novas portas para o uso de diferentes materiais carreadores e desenvolvimento de novos produtos biológicos granulares para aplicação direta na agricultura.

Palavras-chave: *Trichoderma asperelloides*; *Aspergillus niger*; produtos biológicos; controle biológico; consórcio de microrganismos; rocha fosfática.

ABSTRACT

In recent years, the importance of microorganisms role in maintaining agricultural productivity has been highlighted, being essential in cycling nutrients and production of metabolites to contribute to plant growth and protection. All these factors contribute to growth of biological products market. However, studies are still needed to improve and develop production technologies and maintain the quality of these products. Associating the use of unprocessed phosphate rocks (PR) with the microbial P solubilization, we developed a process to produce a biofertilizer granule from cold extrusion, capable of scaling. The granule acts as a micro reactor, where the nutrient of formulation supports microorganism growth for production of metabolites capable of solubilizing the phosphorus (P) of rock, biological control, and plant growth promotion. In the first stage of this work, the P solubilization have been evaluated by *Aspergillus niger* and *Trichoderma* spp. isolated and combined in submerged cultivation, using different phosphate rocks powder. At this stage, the strains, and the PR to be used in the development of the granule were selected. The production of the biofertilizer granules process was developed, with the isolated and combined strains. In the biofertilizer granule, an increase of up to 150% in the solubilization of P was observed when compared to the cultures with phosphate rock powder. The antagonism in vitro of the biofertilizer with *Fusarium oxysporum* demonstrated the capacity of *T. asperelloides* for biological control. The combination with *A. niger* did not affect its performance of *T. asperelloides*. Subsequently, aiming to reduce the production costs of biofertilizers granules and reduce the waste generation, the substrate for microorganisms cultivation (rice grains) was used as a nutrient source in formulation. The viability of the formulations in storage at 4 °C and room temperature was evaluated, showing the importance of studying the storage conditions to maintain the quality of the product. Finally, the biofertilizer granules with isolated and combined microorganisms were evaluated in a soil-plant system (rhizotron), analyzing root and plant growth of tomato, and the dynamics of P in soil. The presence of *T. asperelloides* promote statistically significant differences in plant height. The presence of *A. niger* generated an increase in P in the fractions that showed greater migration dynamics of this component to the more labile fractions. These results which demonstrated the potential applicability of the product. The production process developed of biofertilizer granule by cold extrusion opens new doors for use of different carrier materials and the development of new granular biological products for direct application in agriculture.

Keywords: *Trichoderma asperelloides*; *Aspergillus niger*; biological products; biological control; microbial consortium; phosphate rock.

Índice de figuras

Capítulo 1

- Figura 1. 1 - Contextualização histórica da utilização global de fósforo na agricultura.22
- Figura 1. 2 - Principais grupos promotores de crescimento de plantas usados em inoculantes comerciais e os mecanismos utilizados para promover o crescimento das plantas.....26
- Figura 1. 3 - Representação esquemática da ação de controle biológico por *Trichoderma* spp. (A) diagrama representando as etapas iniciais de crescimento antes do contato e da interação entre colônias de *Trichoderma* e uma presa fúngica. (B) diagrama que descreve as principais formas utilizadas pelo *Trichoderma* durante sua interação antagônica. ERO, espécies reativas de oxigênio; EDPC, enzimas degradantes da parede celular; e MS, metabólitos secundários.31
- Figura 1. 4 - Processos *upstream* e *downstream* do cultivo microbiano envolvidos na produção de um produto biológico.39

Capítulo 2

- Figura 2. 1 - Padrão de difração raio X obtido para a rocha fosfática Pratápolis incluindo as informações dos picos extraídas e as fases minerais identificadas.....52
- Figura 2. 2 - Padrão de difração raio X obtido para a rocha fosfática Registro incluindo as informações dos picos extraídas e as fases minerais identificadas.....57
- Figura 2. 3 - Microscopia eletrônica de varredura da rocha fosfática Pratápolis mostrando as características das superfícies das partículas (a) aumento de 1000 vezes e (b) 5000 vezes.61
- Figura 2. 4 - Microscopia eletrônica de varredura da rocha fosfática Registro mostrando as características das superfícies das partículas (a) aumento de 1000 vezes e (b) 2500 vezes.62
- Figura 2. 5 - Solubilização biológica das rochas fosfáticas utilizando inoculações de microrganismos isolados e combinados. (a) quantidade de P solubilizado e eficiência de solubilização; (b) acidez titulável; (c) pH final do cultivo. Os experimentos foram realizados em cultivo submerso com os pós de rocha fosfática em meio de cultura

PKV (pH inicial 7,0), 30 °C e 220 rpm por 120 h. Os cultivos foram inoculado e co-inoculado com <i>Aspergillus niger</i> (AN), <i>Trichoderma harzianum</i> (TH) e <i>Trichoderma asperelloides</i> (TA).	64
Figura 2. 6 - Correlação estatística de Pearson entre a concentração de P e acidez total titulável para os cultivos submersos usando a rocha em pó.....	65
Figura 2. 7 - Espectro de EDS das rochas fosfáticas brasileiras Pratápolis e Registro.	66

Capítulo 3

Figura 3. 1 - Fluxograma da produção dos grânulos biofertilizantes contendo amido em pó, rocha fosfática Pratápolis e esporos de microrganismos encapsulados em gel de amido.....	74
Figura 3. 2 - Imagens do (a) CES de <i>T. asperelloides</i> em bags com arroz por 7 dias; (b) arroz após extração dos esporos do <i>T. asperelloides</i> cultivado; (c) modelagem da massa em extrusão a frio; (d) corte dos grânulos biofertilizantes.....	79
Figura 3. 3 - (a) Ilustração esquemática da produção dos grânulos biofertilizantes, com imagens de microtomografia de raios-X; (b) Crescimento dos microrganismos axênicos e em combinação dos grânulos biofertilizantes em placas de Petri contendo BDA; (c) Imagens de microscopia óptica do crescimento de esporos e hifas de <i>Aspergillus niger</i> e <i>Trichoderma asperelloides</i>	80
Figura 3. 4 - Perfil temporal da (a) solubilização e eficiência de P; (b) acidez total titulável e (c) pH do cultivo dos grânulos biofertilizantes com diferentes proporções entre o <i>Aspergillus niger</i> (AN) e o <i>Trichoderma asperelloides</i> (TA) em cultivo submerso em shaker a 30 ° C, 220 rpm, meio PKV com pH inicial 7,0.....	82
Figura 3. 5 - Correlação estatística de Pearson entre a concentração de P e acidez total titulável para os cultivos submersos de solubilização dos grânulos biofertilizantes.	83
Figura 3. 6 - Comparação entre as eficiências de solubilização de P da rocha fosfática Pratápolis (RF _{Pratápolis}) nas formas de pó e grânulos biofertilizantes, em cultivos de <i>Aspergillus niger</i> (AN) e <i>Trichoderma asperelloides</i> (TA) insolados e em co-cultivo. Os ensaios foram realizados por 120 h, em meio PKV, pH inicial 7,0, em shaker a 30 °C e 220 rpm.....	84

Figura 3. 7 - Inibição crescimento micelial do <i>Fusarium oxysporum</i> por <i>Trichoderma asperelloides</i> (TA) e <i>Aspergillus niger</i> (AN).....	87
---	----

Capítulo 4

Figura 4.1 - Crescimento do <i>Trichoderma asperelloides</i> no grânulo biofertilizante produzido com 70% de rocha fosfática Registro, 25% de resíduo de arroz e 5% de gel de amido encapsulado com 10^9 esporos/gFonte de carbono.....	94
Figura 4.2 - Fluxograma da produção dos grânulos biofertilizantes contendo arroz colonizado pelos fungos e triturado, amido gelatinizado e rocha fosfática Pratápolis.....	97
Figura 4.3 - Tratamento das imagens contendo o sistema radicular das plantas no rizotron usando o software ImageJ, onde (a) imagem obtida do experimento em rizotron, e (b) imagem binarizada.....	99
Figura 4.4 - Viabilidade das diferentes formulações de grânulos biofertilizantes de <i>Trichoderma asperelloides</i> por 5 meses armazenados a temperatura de 4 °C.....	103
Figura 4.5 - Viabilidade das diferentes formulações de grânulos biofertilizantes de <i>Trichoderma asperelloides</i> por 5 meses armazenados a temperatura ambiente.....	104
Figura 4.6 - Viabilidade percentual dos diferentes grânulos contendo <i>Aspergillus niger</i> (AN) e <i>Trichoderma asperelloides</i> (TA) nos grânulos biofertilizantes produzidos com amido de milho em pó e armazenados a 4 °C.	109
Figura 4.7 - Viabilidade percentual dos diferentes grânulos contendo <i>Aspergillus niger</i> (AN) e <i>Trichoderma asperelloides</i> (TA) nos grânulos biofertilizantes produzidos com amido de milho em pó e armazenados a temperatura ambiente.....	110
Figura 4.8 - Viabilidade percentual dos diferentes grânulos contendo <i>Aspergillus niger</i> (AN) e <i>Trichoderma asperelloides</i> (TA) nos grânulos biofertilizantes produzidos com arroz de cultivo e armazenados a 4 °C.....	111
Figura 4.9 - Viabilidade percentual dos diferentes grânulos contendo <i>Aspergillus niger</i> (AN) e <i>Trichoderma asperelloides</i> (TA) nos grânulos biofertilizantes produzidos com arroz de cultivo e armazenados a temperatura ambiente.	112

Figura 4.10 - Imagens do armazenamento dos grânulos biofertilizantes em frascos de plástico com tampa a temperatura ambiente.....	113
Figura 4.11 - Imagens do arroz colonizado com <i>Trichoderma asperelloides</i> após 7 dias de cultivo, arroz batido; amido gelatinizado incorporado no arroz e o grânulo biofertilizante após a extrusão a frio.....	115
Figura 4.12 - Imagens do arroz colonizado com <i>Aspergillus niger</i> após 7 dias de cultivo, arroz batido; amido gelatinizado incorporado no arroz e o grânulo biofertilizante após a extrusão a frio.....	116
Figura 4.13 - Perfil temporal de crescimento das plantas (a) diâmetro da haste das plantas de tomate, em mm; (b) altura da planta, em cm; e (c) o comprimento da raiz, em cm, dos diferentes tratamentos. Onde, C _S – Controle com substrato; C _{GSM} – Controle com grânulo sem microrganismos; GB _{AN} – Grânulo biofertilizante com <i>Aspergillus niger</i> , GB ^(1:1) _{TA + AN} – Grânulo biofertilizante combinado de <i>Trichoderma asperelloides</i> e <i>Aspergillus niger</i> , GB _{TA} – Grânulo biofertilizante com <i>Trichoderma asperelloides</i>	118
Figura 4.14 - Fluxograma do tratamento estatístico realizado no experimento do rizotron.....	119
Figura 4.15 - Diagrama de caixas das variáveis que apresentaram diferenças significativas pelo teste paramétrico de Duncan.....	120
Figura 4.16 - Diagrama de caixas das variáveis que apresentaram diferenças significativas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.	123
Figura 4.17 - Imagens das raízes da planta do tomate emaranhadas nos grânulos biofertilizantes.....	124
Figura 4.18 - Tomateiros desenvolvidos em rizotron nos diferentes tratamentos controles e com os biofertilizantes. Onde, C _S – Controle com substrato; C _{GSM} – Controle com grânulo sem microrganismos; GB _{AN} – Grânulo biofertilizante com <i>Aspergillus niger</i> , GB ^(1:1) _{TA + AN} – Grânulo biofertilizante combinado de <i>Trichoderma asperelloides</i> e <i>Aspergillus niger</i> , GB _{TA} – Grânulo biofertilizante com <i>Trichoderma asperelloides</i>	124

Índice de tabelas

Capítulo 2

Tabela 2. 1 - Fluorescência raios X das rochas fosfáticas juntamente com os resultados de área superficial, tamanho dos poros e de partículas.....53

Capítulo 3

Tabela 3. 1 - Quantidades inoculadas de *Aspergillus niger* e *Trichoderma asperelloides*, nos grânulos biofertilizantes produzidos com rocha fosfática de Pratápolis.75

Capítulo 4

Tabela 4. 1 - Diferentes formulações de grânulos biofertilizantes de *Trichoderma asperelloides* e suas nomenclaturas.95

Tabela 4. 2 - Resultados da densidade de partícula (g/cm^3) e força máxima (N) do grânulo biofertilizante. 102

Tabela 4. 3 - Viabilidade (UFC/ g_{GB}) das diferentes formulações dos grânulos biofertilizantes de *Trichoderma asperelloides* produzidos com arroz de cultivo.....104

Tabela 4. 4 - Resultados da densidade de partícula (g/cm^3) e força máxima (N) do grânulo biofertilizante de *Aspergillus niger* (AN) e *Trichoderma asperelloides* (TA) produzidos com amido em pó e arroz cultivado. 106

Tabela 4. 5 - Viabilidade do grânulo biofertilizante produzido com amido de milho em pó com *Aspergillus niger* (AN) armazenados a temperatura de 4 °C e temperatura ambiente..... 107

Tabela 4. 6 - Viabilidade do grânulo biofertilizante produzido com amido de milho em pó com *Trichoderma asperelloides* (TA) armazenados a temperatura de 4 °C e temperatura ambiente. 107

Tabela 4. 7 - Viabilidade do grânulo biofertilizante produzido com amido de milho em pó com *Trichoderma asperelloides* (TA) e *Aspergillus niger* (AN) armazenados a temperatura de 4 °C e temperatura ambiente. 107

Tabela 4. 8 - Viabilidade do grânulo biofertilizante produzido com arroz de cultivo com <i>Aspergillus niger</i> (AN) armazenados a temperatura de 4 °C e temperatura ambiente.....	107
Tabela 4. 9 - Viabilidade do grânulo biofertilizante produzido com arroz de cultivo com <i>Trichoderma asperelloides</i> (TA) armazenados a temperatura de 4 °C e temperatura ambiente.	108
Tabela 4. 10 - Viabilidade do grânulo biofertilizante produzido com arroz de cultivo com <i>Ttichoderma asperelloides</i> (TA) e <i>Aspergillus niger</i> (AN) armazenados a temperatura de 4 °C e temperatura ambiente.	108
Tabela 4. 11 - Resultados médios das variáveis com diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Duncan do cultivar de tomate em rizotron.	119
Tabela 4. 12 - Resultados médios das variáveis que apresentaram diferenças estatisticamente significativas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis no experimento de plantas de tomate em rizotron para os diferentes tratamentos controles e com grânulos de <i>Aspergillus niger</i> e <i>Trichoderma asperelloides</i> isolados e combinados.	121
Tabela 4. 13 - Fracionamento do fósforo inorgânico (Pi) e orgânico (Po) do substrato puro, sem cultivo de planta, e do tratamento controle com substrato (Cs) no cultivo do tomateiro em rizotron na camada de solo de 0 a 20 cm do rizotron.	126
Tabela 4. 14 - Fracionamento do fósforo inorgânico (Pi) e orgânico (Po) na camada de solo de 0 a 20 cm do rizotron dos diferentes tratamentos com e sem a presença dos grânulos biofertilizantes no crescimento de tomateiro.	128

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
CAPÍTULO 1	20
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
1.1 CENÁRIO DA AGRICULTURA NO BRASIL	20
1.2 FERTILIZANTES FOSFATADOS.....	21
1.3 MICRORGANISMOS NA AGRICULTURA.....	24
1.3.1 Solubilização microbiológica de fosfato	26
1.3.2 <i>Trichoderma</i>	28
1.3.3 <i>Aspergillus</i>	32
1.3.4 Coinoculação	34
1.4 Produtos biológicos	35
1.4.1 Cultivo microbiano	37
1.4.2 Formulações.....	40
1.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
2. OBJETIVOS	43
2.1 OBJETIVO GERAL	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
CAPÍTULO 2	45
1. INTRODUÇÃO	45
2. MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1 ROCHAS FOSFÁTICAS	47
2.2 CARACTERIZAÇÃO DAS ROCHAS FOSFÁTICAS	47
2.2.1 Análises químicas.....	47
2.2.2 Difração raios X (DRX)	47
2.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	48
2.2.4 Tamanho de partícula e área superficial.....	48

2.3	SOLUBILIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS ROCHAS EM PÓ	48
2.3.1	Microrganismos	48
2.3.2	Cultivo submerso	49
2.4	MÉTODOS ANALÍTICOS	50
2.4.1	Determinação do pH e acidez total titulável	50
2.4.2	Determinação de fósforo solúvel	50
2.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
3	Resultados e discussão	51
2.3	CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS, FÍSICAS E MORFOLÓGICAS DAS ROCHAS FOSFÁTICAS	51
2.4	SOLUBILIZAÇÃO MICROBIANA DE P DAS ROCHAS FOSFÁTICAS	63
3.	CONCLUSÕES	68
	CAPÍTULO 3	69
1.	INTRODUÇÃO	69
2.	MATERIAL E MÉTODOS	71
2.1	ROCHA FOSFÁTICA	71
2.2	MICRORGANISMOS	71
2.3	PRODUÇÃO MASSAL DOS MICRORGANISMOS	71
2.4	PRODUÇÃO DOS GRÂNULOS BIOFERTILIZANTES COM AMIDO	72
2.5	VIABILIDADE DOS GRÂNULOS BIOFERTILIZANTES	75
2.6	SOLUBILIZAÇÃO DOS GRÂNULOS BIOFERTILIZANTES EM CULTIVO SUBMERSO (CSm)	76
2.7	INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL <i>IN VITRO</i> DE <i>Fusarium oxysporum</i> por <i>T. asperelloides</i> E <i>A. niger</i> CONTIDO NOS GRÂNULOS BIOFERTILIZANTES	76
2.8	MÉTODOS ANALÍTICOS	77
2.8.1	Determinação do pH e acidez total titulável	77
2.8.2	Determinação de fósforo solúvel	77

2.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	77
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
3.1	PRODUÇÃO DOS GRÂNULOS BIOFERTILIZANTES	78
3.2	SOLUBILIZAÇÃO BIOLÓGICA DE P PRESENTE NOS GRÂNULOS.....	81
3.3	INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>Fusarium oxysporum</i> POR <i>T. asperelloides</i> E <i>A. niger</i> DOS GRÂNULOS BIOFERTILIZANTES.....	85
4.	CONCLUSÕES	89
	CAPÍTULO 4.....	90
1.	INTRODUÇÃO	90
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	92
2.1	ROCHA FOSFÁTICA	92
2.2	MICROORGANISMOS	92
2.3	PRODUÇÃO MASSAL DE MICROORGANISMOS	92
2.4	ESTUDO DAS DIFERENTES FORMULAÇÕES.....	93
2.4.1	Viabilidade dos grânulos biofertilizantes.....	95
2.4.2	Densidade e resistência mecânica dos grânulos biofertilizantes	95
2.5	PRODUÇÃO DO GRÂNULO BIOFERTILIZANTE UTILIZADO NO CULTIVO DE TOMATEIRO EM RIZOTRON.....	96
2.6	APLICAÇÃO DOS GRÂNULOS BIOFERTILIZANTES DE <i>A. niger</i> E <i>T. asperelloides</i> ISOLADOS E COMBINADOS NO DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS DE TOMATE EM RIZOTRON.....	98
2.7	FRACIONAMENTO DE FÓSFORO DO SOLO	100
2.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	101
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	102
3.1	DIFERENTES FORMULAÇÕES DE GBs COM <i>T. asperelloides</i>	102
3.2	COMPARATIVO DOS GRÂNULOS DE AMIDO COM GRÂNULOS DE ARROZ CULTIVADO.....	105

3.3 APLICAÇÃO DOS GRÂNULOS BIOFERTILIZANTES NO CULTIVO DE TOMATE EM RIZOTRON.....	114
3.4 FRACIONAMENTO DE FÓSFORO	125
4. CONCLUSÕES	131
CONCLUSÕES FINAIS	132
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135

INTRODUÇÃO

Recentemente, ocorreu uma mudança de paradigma ao se considerar as plantas como um holobionte, uma unidade ecológica e evolutiva que engloba não só o hospedeiro, mas também o microbioma associado a ele (VANDENKOORNHUYSE et al., 2015). Os microrganismos desempenham funções essenciais no fornecimento de macro e micronutrientes, retenção da água, afetando o crescimento das plantas em diferentes estágios, além de sintetizarem hormônios de crescimento e metabólitos que induzem a resistência das plantas (OWEN et al., 2015; QIU et al., 2019a; WEI; JOUSSET, 2017).

A aplicação desses microrganismos, individualmente ou em consórcios microbianos, é uma ferramenta importante para promover a saúde e a produtividade das plantas de forma sustentável (AHMAD et al., 2018). Nesse contexto, o mercado de produtos biológicos mundial está entre as indústrias de crescimento mais rápido globalmente, com uma taxa de crescimento anual estimada entre 15% e 17% (MARKETS AND MARKETS, 2020), e crescendo no Brasil 28%, movimentando mais de 1 bilhão de reais (MAPA, 2021). Como exemplo de microrganismo que tem recebido atenção na agricultura, se destaca o fungo do gênero *Trichoderma* devido à sua capacidade de controle biológico, produção de metabólitos que favorecem o crescimento e induzem a resistência das plantas (MEYER; MAZARO; SILVA, 2019).

Apesar de ser essencial nas práticas agrícolas atuais, o uso excessivo de fertilizantes químicos diminui a biodiversidade do solo (PRASHAR; SHAH, 2016). Sabe-se que, as interações microrganismos-solo-planta estão diretamente associadas a produtividade e sustentabilidade agrícola (GUPTA et al., 2021; RASHID et al., 2016). Por isso, o conhecimento das interações entre os microrganismos e as plantas é essencial para que a agricultura convencional se torne menos dependente de insumos externos de nutrientes, pesticidas e combustíveis fósseis (PHILIPPOT et al., 2013; VASSILEV et al., 2015).

O fósforo é um macronutriente essencial para o desenvolvimento das culturas. A agricultura brasileira é altamente dependente dos fertilizantes fosfatados importados para atender a produção agrícola, devido aos baixos teores de P encontrados no solo e à sua alta reatividade com Fe e Al (WITHERS et al., 2018). A

produção de fertilizantes fosfatados se dá pelo tratamento químico de rochas fosfáticas (RFs), para obtenção do fósforo inorgânico solúvel. Porém, esse é um processo caro e com geração de subprodutos danosos ao meio ambiente (CÁNOVAS et al., 2018; CONAMA, 2011). Uma alternativa biotecnológica para a solubilização do P presente nas rochas fosfáticas é o uso de microrganismos produtores de ácidos orgânicos. Nesse contexto, o gênero do fungo *Aspergillus* se destaca como produtor de ácidos orgânicos que são importantes para a solubilização de diferentes tipos de fontes minerais fosfatadas (MENDES et al., 2014, 2020; NASCIMENTO et al., 2021; VASSILEVA et al., 2010).

Diante desse cenário, observa-se a necessidade e a tendência de desenvolvimento de produtos biológicos voltados para uma agricultura mais sustentável. Klaic et al. (2018, 2021) encapsularam esporos do fungo *Aspergillus niger* em uma matriz de amido e dispersaram rocha fosfática e micronutrientes para a produção de um material granular para utilização direta na agricultura. Esse grânulo pode atuar como um micro reator, onde, no próprio biofertilizante pode ser carregado o(s) microrganismo(s) capaz(es) de utilizar fontes de nutrientes não processadas, como rochas minerais, reduzindo os impactos ambientais associados à transformação em fertilizantes químicos e levando microrganismos ao solo com mais de uma funcionalidade.

Com base nesses aspectos, esse trabalho teve como objetivo desenvolver um processo de produção de grânulos biofertilizantes, passível de escalonamento, contendo microrganismos solubilizadores de fosfato e com capacidade conhecidas no desenvolvimento de plantas e controle biológico. A ação dos microrganismos no solo é sempre combinada e, devido a essa característica, esse trabalho se propõe também a estudar os microrganismos do gênero *Trichoderma* e *Aspergillus* de forma isolada e combinada, buscando produzir um grânulo com suporte para o desenvolvimento dos microrganismos e redução dos resíduos de produção. A seguir está apresentada a estrutura do trabalho.

Estrutura do trabalho

Esse trabalho está estruturado na forma de capítulos, onde no Capítulo 1 está apresentado um embasamento teórico para o desenvolvimento do trabalho juntamente com os objetivos. No Capítulo 2 estão apresentados os resultados obtidos durante a primeira etapa do trabalho, onde foram caracterizadas as rochas fosfáticas e avaliadas a solubilização microbiana de P das diferentes rochas com cepas isoladas e combinadas de *Aspergillus niger* e *Trichoderma* spp., visando selecionar as cepas e a rocha utilizadas nas etapas posteriores. No Capítulo 3 estão apresentados o processo de produção dos grânulos biofertilizantes com a utilização da extrusão a frio, assim como a cinética de solubilização de P dos grânulos biofertilizantes, um comparativo com a solubilização da rocha fosfática livre e uma avaliação in vitro da capacidade de controle biológico dos grânulos biofertilizantes. No Capítulo 4 estão apresentados os resultados da avaliação das características dos grânulos biofertilizantes com diferentes formulações e com a utilização do próprio substrato de cultivo dos microrganismos na formulação, assim como a aplicação dos grânulos no cultivo de tomateiros em rizotron, avaliando a dinâmica da solubilização do P no solo e o crescimento das plantas.

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 CENÁRIO DA AGRICULTURA NO BRASIL

As projeções de aumento populacional mundial indicam crescimento acelerado e contínuo nas próximas décadas. Em 2019, a população mundial foi estimada em 7,7 bilhões, com projeções para alcançar a marca de 8 bilhões em 2023 e 9,7 bilhões em 2050, segundo dados da Organização das Nações Unidas (ONU, 2019). Com o aumento populacional, a expansão das cidades e os impactos ambientais da agricultura existe uma preocupação eminente com a demanda da produção de alimentos. Além disso, a expansão da fronteira agrícola mundial é bastante restrita devido à influência na biodiversidade ambiental, às emissões de carbono e ao funcionamento do ecossistema (BAHAR et al., 2020). Dados da Food and Agriculture Organization – FAO (FAO, 2013) apontam que, praticamente, não se tem terras disponíveis para expansão no sul da Ásia, Ásia Ocidental e norte da África. E, cerca de, 45% da área agricultável expansível se concentra em apenas sete países: República Democrática do Congo, Angola, Sudão, Argentina, Brasil, Colômbia e Bolívia.

O Brasil está entre os maiores produtores e exportadores de alimentos do mundo e estima-se que será o maior produtor em breve (OECD-FAO, 2015), cujo setor contribui fortemente para amparo do crescimento da economia brasileira com participação do agronegócio em 26,6% do produto interno bruto (PIB) em 2020, mostrando um considerável aumento comparado a 2019 que teve participação de 20,5% (CNA & CEPEA, 2021). Embora tenha havido um forte aumento de produtividade das terras agricultáveis, uma das maiores expansões de terras agrícolas, em escala global, foi a do Brasil com aumento de 34 milhões de hectares entre 1990 e 2012 (OECD-FAO, 2015). Porém, diante das limitações da expansão do uso de terras, é necessária uma maior ampliação da produtividade das terras cultivadas para a suprir a demanda de alimentos.

Para aumento da produtividade, há décadas milhões de toneladas de nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) são utilizadas (IFA, 2020). Segundo dados da

FAO (2020), o consumo no Brasil de N total, P_2O_5 e K_2O , de 2002 a 2009, foi em média de 41,38 kg de N/ha, 54,53 kg de P/ha e 61,09 kg de K/ha, e foi observado um aumento de 54,5, 31 e 35%, respectivamente, no período de 2010 a 2017 em média. Esses dados evidenciam a dependência da agricultura atual de fertilizantes químicos. Ademais, a utilização de fertilizantes, agrotóxicos e pesticidas em excesso, priorizando apenas a melhoria na produtividade, pode ter impactos ambientais negativos como lixiviação de nutrientes causando eutrofização, erosão, emissão de nitrogênio, esgotamento da água de irrigação e consequências ecológicas como a diminuição da atividade biológica do solo (CHAUDHARY et al., 2020; HUNTER et al., 2017; TILMAN, 1999). Sendo assim, o desafio é garantir a produtividade agrícola, utilizando alternativas que minimizem os efeitos ambientais prejudiciais e reduzam a dependência dos fertilizantes químicos.

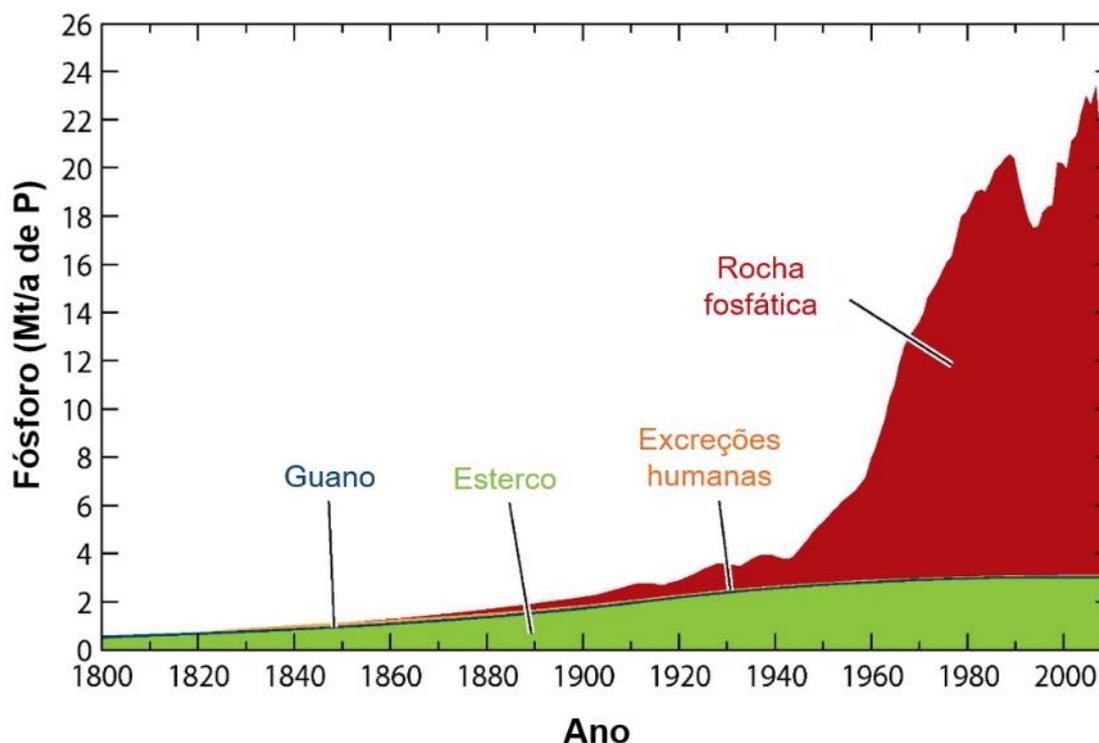
1.2 FERTILIZANTES FOSFATADOS

Os nutrientes necessários para o crescimento das plantas são divididos em dois grupos gerais: os macronutrientes, que são necessários em quantidades relativamente grandes [nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), enxofre (S), cálcio (Ca) e magnésio (Mg)] e os micronutrientes, exigidos em menores quantidades [ferro (Fe), sódio (Na), cloro (Cl), boro (B), manganês (Mn), zinco (Zn), cobre (Cu) e molibdênio (Mo)] (WIEDENHOEFT, 2006). Dentre os macronutrientes exigidos para o crescimento das plantas, o fósforo é um nutriente limitante, particularmente, em solos tropicais e intemperizados. A ausência de P limita o crescimento das plantas, pois é essencial em processos celulares, como transferência de energia para o metabolismo celular, fotossíntese, transdução de sinal, biossíntese macromolecular e respiração (MENDES et al., 2014; SHARPLEY, 1995; SHENOY; KALAGUDI, 2005). As plantas com deficiência de P podem apresentar manchas e escurecimento das folhas, diminuição na altura das plantas, assim como lesões necróticas e outros sintomas (WIEDENHOEFT, 2006). Na agricultura atual, esse nutriente é fornecido, principalmente, na forma de fertilizantes solúveis produzidos a partir do tratamento químico de rochas fosfáticas (RF).

Uma preocupação adicional está relacionada à dependência da agricultura ao fósforo derivado de fosfato de rocha, pois esse é um recurso não renovável e que a partir da segunda metade do século XX começou a ser utilizado em imensas quantidades (Figura 1.1), para suprir a necessidade desse macronutriente no solo e

aumentar o rendimento das culturas (CORDELL; DRANGERT; WHITE, 2009; CORDELL; WHITE, 2011, 2014).

Figura 1. 1 - Contextualização histórica da utilização global de fósforo na agricultura.



Fonte: Adaptado de Cordell; White (2014)

A cada ano, são extraídas 20 milhões de toneladas de RF e 90% são processadas para gerar fertilizantes de fósforo para uso agrícola (YANG et al., 2019). O tradicional processo de produção dos fertilizantes fosfatados é baseado no tratamento químico da RF para obter fósforo inorgânico solúvel, no qual a rocha fosfática é solubilizada na presença de ácidos inorgânicos fortes como o ácido sulfúrico e fosfórico, a altas temperaturas. Sendo um processo caro, com alto consumo de energia, e que, apesar de provocar a quase completa dissolução da rocha, libera produtos indesejados em forma de gases como tetrafluoreto de silício (SiF_4), fluoreto de hidrogênio (HF), amônia (NH_3), óxidos de enxofre (SO_x) e óxidos de nitrogênio (NO_x) (CONAMA, 2011; GOLDSTEIN; ROGERS; MEAD, 1993). Outro subproduto indesejável da produção de fertilizantes fosfatados é o fosfogesso. Estima-se que para cada tonelada de P_2O_5 produzido sejam geradas cinco toneladas de fosfogesso, gerando impacto ambiental devido ao baixo consumo desse material e por ser tóxico, pois possui altos níveis de radiação (CÁNOVAS et

al., 2018; CORDELL; DRANGERT; WHITE, 2009; RUTHERFORD; DUDAS; SAMEK, 1994; TAYIBI et al., 2009).

A principal limitação da aplicação direta da RF como fonte de P é sua baixa solubilidade, o que reduz a disponibilidade do nutriente no solo e sua absorção pelas plantas (FAYIGA; NWOKE, 2016). As estratégias utilizadas para aumentar a efetividade das RFs são baseadas no aumento da acidez, pois isso aumenta a solubilidade das RFs (FAYIGA; NWOKE, 2016; NAHAS, 1996; WHITELAW; HARDEN; HELYAR, 1999). O P geralmente é assimilado pelas plantas quando está na forma aniônica como HPO_4^{2-} e H_2PO_4^- . Entretanto, a quantidade de P disponível, para as plantas como ânions fosfatos é baixa devido, principalmente, à sua elevada reatividade com metais (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , e Al^{3+}) juntamente com fatores como pH e composição do solo (RAVEN, 2015; TANDON et al., 2020). Além disso, o P também pode ficar indisponível para as plantas quando imobilizado na forma orgânica (como ácido fítico). O P imobilizado na forma orgânica no solo, geralmente, representa cerca de 50% do total do fósforo insolúvel presente em solos (BAYER et al., 2001; GYANESHWAR et al., 2002).

No contexto da agricultura brasileira, os solos possuem baixos teores de fósforo disponível exigindo altas aplicações de fertilizantes fosfatados para atender as demandas agrícolas (COUTINHO; FELIX; YANO-MELO, 2012). Assim, o custo de importação desses fertilizantes contribui fortemente para um déficit na balança comercial brasileira (DA COSTA SIMÕES; CAIXETA-FILHO; PALEKAR, 2018). Além disso, os solos brasileiros são altamente fixadores de P devido as condições climáticas e altas quantidade de ferro e alumínio. Em 2016, o excedente de P aplicado aos solos brasileiros foi de 70%, enfatizando o quão ineficiente é o uso atual de P no Brasil (WITHERS et al., 2018).

Além dos problemas ambientais associados aos processos de produção dos fertilizantes químicos e seus subprodutos, a aplicação intensiva dos fertilizantes fosfatados e nitrogenados na agricultura também resulta em poluição do solo, água e ar em escala global (VASSILEV et al., 2015) devido à lixiviação e posterior eutrofização, acidificação do solo e contaminação de lençóis freáticos. Apesar da visão macro da poluição causada pelo uso excessivo de produtos químicos ser muito comentada, a comunidade microbiana benéfica do solo também é afetada, reduzindo a biodiversidade da rizosfera e perturbando as interações moleculares entre plantas, microrganismos, enzimas e reações bioquímicas do solo (HUSSAIN et

al., 2009; MÄDER et al., 2002; PRASHAR; SHAH, 2016; WANJIKU KAMAU et al., 2019). Buscando uma agricultura mais sustentável, esse cenário ressalta a necessidade de estratégias de manejo que aumentem a eficiência da utilização do fósforo nos sistemas agrícolas, minimizando o efeito do esgotamento da fonte natural (RF) e a degradação do meio ambiente.

1.3 MICRORGANISMOS NA AGRICULTURA

A diversidade de microrganismos supera de longe a diversidade de todos os outros organismos vivos da Terra. Os microrganismos desempenham muitas funções nos ecossistemas (CALLENS et al., 2019). Recentemente, ocorreu uma mudança de paradigma ao se considerar as plantas como um holobionte, uma unidade ecológica e evolutiva que engloba não só o hospedeiro, mas também o microbioma associado a ele (VANDENKOORNHUYSE et al., 2015). As interações entre as plantas e os microrganismos são determinantes para o crescimento, aptidão e produtividade da planta (GUPTA et al., 2021), desempenhando um papel essencial nos principais ciclos naturais da Terra que sustentam o funcionamento dos solos e sua capacidade de capturar e armazenar carbono (CALLENS et al., 2019). A agricultura e as práticas de gestão de recursos naturais e o desenvolvimento de tecnologias que protejam e aumentem a diversidade do microbioma são a base dos sistemas alimentares sustentáveis (CALLENS et al., 2019; QIU et al., 2019b).

A agricultura global está observando a necessidade de compreender mais profundamente a interação do microbioma rizosférico e a saúde do solo para melhoria da produtividade das culturas em busca de uma agricultura mais sustentável.

Apesar dos efeitos de decomposição e disponibilização de nutrientes no solo por microrganismos parecerem menos relevantes em sistemas de produção agrícolas, onde os fertilizantes minerais fornecem a maioria das entradas de nutrientes, o conhecimento das interações entre planta-microrganismos pode se tornar muito relevante para que a agricultura convencional se torne menos dependente de insumos externos de nutrientes, pesticidas e combustíveis fósseis (PHILIPPOT et al., 2013; VASSILEV et al., 2015).

Os microrganismos rizosféricos, ou seja, os microrganismos que estão no solo em contato direto com as raízes, desempenham funções essenciais como fornecimento de nitrogênio, fósforo, potássio, enxofre e micronutrientes, além de

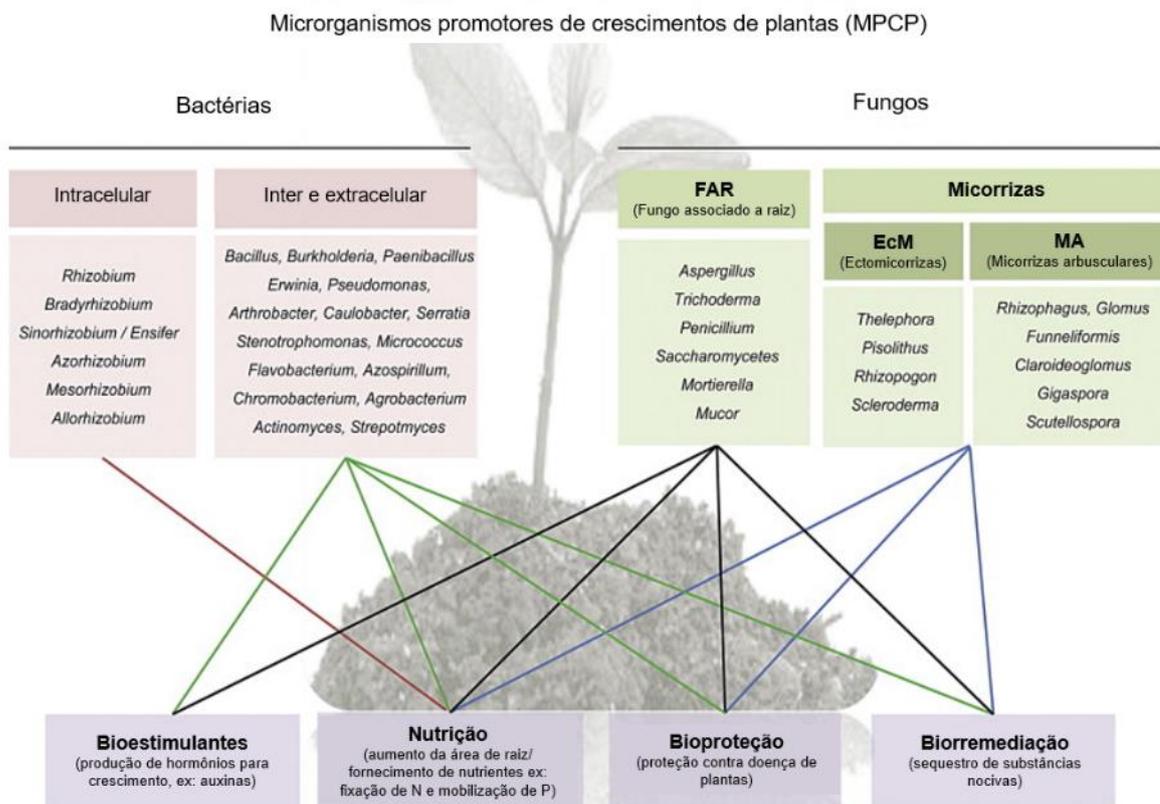
colaborar com a retenção de água (QIU et al., 2019b). As interações microrganismo-planta afetam o crescimento e o desenvolvimento da planta em diferentes estágios, colaborando com o crescimento das plantas, facilitando a absorção de nutrientes, sintetizando hormônios de crescimento, aumentando a resistência natural contra estresses bióticos e abióticos e auxiliando no controle de pragas e patógenos (BERENDSEN; PIETERSE; BAKKER, 2012; MARTÍNEZ-VIVEROS et al., 2010; WEI; JOUSSET, 2017).

O uso de microrganismos também tem recebido atenção significativa como uma estratégia biotecnológica eficiente para descontaminar o meio ambiente. Essa técnica se chama biorremediação e pode ser uma abordagem economicamente viável e eficiente, onde o potencial metabólico dos microrganismos é usado para limpar ambientes contaminados (KOUR et al., 2021a). Muitos gêneros estão envolvidos na biorremediação, incluindo *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Aspergillus*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Mucor*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Talaromyces* e *Trichoderma* (KOUR et al., 2021a).

Os principais grupos de microrganismos promotores de crescimentos de plantas (MPCP) e o seu método de ação estão apresentados na Figura 1.2. Esses microrganismos podem ser utilizados no solo ou no revestimento de sementes, por cepas individuais ou em consórcios, e podem contribuir com o crescimento das plantas colaborando com o enraizamento, crescimento e rendimento (OWEN et al., 2015). Os fungos promotores de crescimento de plantas incluem micorrizas arbusculares (AM), ectomicorrizas (EcM) e fungos de raiz como *Penicillium*, *Trichoderma* e *Aspergillus* (OWEN et al., 2015). Em geral, os MPCP agem sintetizando hormônios promotores de crescimento para as plantas, facilitando a absorção de nutrientes do solo através do crescimento das raízes e da produção de ácidos orgânicos e enzimas que colaboram na dissolução de compostos insolúveis e diminuem ou previnem doenças de plantas e na biorremediação do solo (MARTÍNEZ-VIVEROS et al., 2010; OWEN et al., 2015).

Com base nesse cenário, observa a importância da manutenção do microbioma do solo e a possibilidade do gerenciamento e utilização de cepas selecionadas (isoladas ou combinadas) para a utilização desses microrganismos benéficos em busca de uma agricultura mais sustentável e que vise a produtividade. Assim, nos próximos tópicos serão abordados mais especificamente a solubilização biológica de fosfato e dois gêneros de fungos filamentosos: *Aspergillus* e *Trichoderma*.

Figura 1.2 - Principais grupos promotores de crescimento de plantas usados em inoculantes comerciais e os mecanismos utilizados para promover o crescimento das plantas.



Fonte: adaptado de Owen et al. (2015).

1.3.1 Solubilização microbiológica de fosfato

Com base em toda contextualização do esgotamento de reservas fosfáticas e a preocupação na manutenção da produtividade agrícola mundial, diversos pesquisadores buscam alternativas para resolver os problemas associados à solubilização de P no solo. O uso de microrganismos solubilizadores de fosfato (MSFs) tem sido proposto como alternativa biotecnológica sustentável para incrementar a eficiência agrônômica das RFs e colaborar com a solubilização de fosfatos inorgânicos e orgânicos (BOLAN et al., 1994; KRISHNARAJ; DAHALE, 2014; SCHNEIDER et al., 2010). Existe uma diversidade de microrganismos solubilizadores de fósforo nos domínios de arqueias, bactérias e eucariota (KOUR et al., 2021b), que vêm ganhando espaço na pesquisa, pois esses microrganismos desempenham papéis importantes no melhoramento de culturas para uma agricultura mais sustentável.

Em revisão publicada por KOUR et al. (2021b), a diversidade dos microrganismos solubilizadores de P é discutida. Os cinco gêneros de bactérias predominantes capazes de solubilizar o fósforo são: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Streptomyces* e *Burkholderia*. Na classe dos fungos, os principais solubilizadores de P são dos gêneros *Aspergillus*, seguido de *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Talaromyces*.

Os processos que afetam as concentrações de P no solo são a dissolução-precipitação e sorção-dessorção. Os MSFs são capazes de liberar compostos complexantes ou dissolventes como ânions de ácidos orgânicos, íons de hidroxila, prótons, sideróforos e enzimas como fosfatases extracelulares, disponibilizando assim o fosfato solubilizado no solo (FRANCHE; LINDSTRÖM; ELMERICH, 2009; KOUR et al., 2021b; NAYAK; BHUSHAN, 2019; SHARMA et al., 2013).

Dentre esses mecanismos destacam a solubilização de minerais por ácidos orgânicos, que ocorre por meio de acidólise provocada por prótons liberados de grupos carboxila e da complexação dos metais presentes na estrutura do mineral (KPOMBLEKOU; TABATABAI, 1994; NAHAS, 1996; NAUTIYAL, 1999; ZHU; LI; WHELAN, 2018). Por meio de reações de quelação, os ânions dos ácidos orgânicos formam complexos estáveis com cátions como Ca^{2+} , Fe^{3+} e Al^{3+} , frequentemente ligados ao P na sua forma insolúvel. Ao se ligarem aos cátions, os ânions orgânicos desestabilizam a estrutura do mineral disponibilizando o P (BOLAN et al., 1994; JONES, 1998; KRISHNARAJ; DAHALE, 2014; STUMM, 1986). Alguns ácidos orgânicos como os ácidos glucônico, oxálico e cítrico têm sido reportados como bons agentes quelantes e, deste modo podem agir solubilizando fontes de fosfato (ALORI; GLICK; BABALOLA, 2017; KPOMBLEKOU; TABATABAI, 1994; MENDES et al., 2014). Entretanto, como as fontes de fosfatos minerais têm diferentes origens, são muito heterogêneas e apresentam diferentes propriedades físico-químicas, os ácidos orgânicos podem ter ação diferente dependendo do tipo de mineral fosfatado (KLAIC et al., 2018b). Normalmente, os fungos são capazes de solubilizar mais fosfato do que as bactérias, por serem capazes de crescer até longas distancias e por produzirem maiores quantidades de ácidos orgânicos, sendo provavelmente mais eficientes para promover a solubilização do P imobilizado na forma inorgânica (ALORI; GLICK; BABALOLA, 2017; SHARMA et al., 2013).

Em linhas gerais, pode-se concluir que a inoculação do solo ou das culturas com microrganismos solubilizadores de fosfato é uma estratégia promissora para

melhorar a absorção de fósforo pelas plantas e reduzir o uso de fertilizantes químicos. O uso direto de rochas fosfáticas também pode aliviar as preocupações ambientais decorrentes da produção de fertilizantes fosfatados.

1.3.2 *Trichoderma*

Trichoderma são fungos de solo onipresentes, oportunistas, conhecidos pela alta capacidade de colonizar a rizosfera com rápido crescimento, pois são capazes de utilizar diversos substratos e crescer em ambientes distintos, sendo importantes decompositores de materiais lenhosos e herbáceos (DRUZHININA et al., 2011; MONTE; BETTIOL; HERMOSA, 2019; SHARMA; GOTHALWAL, 2017). Os fungos liberam diversas enzimas extracelulares que, quanto mais diversas e numerosas, maior a capacidade desse microrganismo de sobreviver em ambientes com condições adversas, pois para que as hifas dos fungos possam ser capazes de absorver os nutrientes presentes nos substratos, os substratos de alta massa molecular precisam ser hidrolisados a moléculas menores (MONTE; BETTIOL; HERMOSA, 2019). As espécies de *Trichoderma* são colonizadoras altamente bem-sucedida em seus habitats e com importância econômica justamente por sua capacidade de secreção de diversas enzimas, metabólitos e antibióticos (HARMAN et al., 2004; MONTE; BETTIOL; HERMOSA, 2019; SCHMOLL; SCHUSTER, 2010).

Nos estágios iniciais de crescimento, *Trichoderma* apresenta um micélio de coloração esbranquiçada, cotonosa e de rápido crescimento em meio de cultura a temperaturas variando entre 25 e 30 °C. Após 48 h de crescimento pode começar o aparecimento dos esporos, que adquirem a coloração verde e dão um aspecto granular ou pulverulento à colônia (DE ABREU; PFENNING, 2019). Pela sua alta capacidade de crescer em diferentes habitats, eles respondem ao ambiente regulando seu crescimento, produzindo esporos e enzimas para se adequar às condições atuais, e isso pode ser explorada para o benefício da humanidade (SCHMOLL; SCHUSTER, 2010).

García-López; Avilés; Delgado (2015) avaliaram a presença do *Trichoderma asperellum* T34 na absorção de P na cultura de pepino e observaram que, independente da fonte de P adicionada, a presença do microrganismo aumentou a absorção de fósforo pelas raízes podendo ser explicada pela produção de fitase e pelo efeito levemente acidificante do fungo no meio de cultivo da planta. Em outro estudo, García-López; Avilés; Delgado (2016) verificaram a produção de ácidos

orgânicos do *Trichoderma asperellum* T34, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* QST713 e *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24 em cultivo de pepino com meio de areia e observaram maior produção de ácidos orgânicos por *A. niger*. No entanto, a absorção e mobilização de P pelas plantas foi melhor pela ação do *T. asperellum* T34 e de *B. subtilis* QST713, pois essas cepas foram capazes de aumentar a massa seca das raízes, favorecendo a absorção de nutrientes. Os autores também observaram que os efeitos dos microrganismos diferem dependendo das propriedades do meio e da fonte e da quantidade P adicionados, visto que em meio calcário não foi observada a mesma capacidade de ação do *T. asperellum* T34.

O principal uso do gênero *Trichoderma* na agricultura é para o controle biológico de doenças de plantas, devido às suas propriedades antagônicas estarem baseadas em múltiplos mecanismos de atuação. Comparado aos pesticidas químicos, o biocontrole não gera resistência em patógenos, não contamina o meio ambiente, evita a proliferação de pragas secundárias, é compatível com a produção orgânica e atende aos requisitos de mercados no que diz respeito aos limites máximos de resíduos químicos em frutas e vegetais (SYED AB RAHMAN et al., 2018). O controle biológico é um importante componente do manejo integrado de pragas (MIP) onde os bioprotetores microbianos vêm ganhando mais espaço devido à especificidade no combate as pragas e à aparente inofensividade aos microrganismos benéficos e seres humanos, reduzindo os riscos de contaminação e também os riscos ambientais (SHARMA; GOTHALWAL, 2017). Em uma recente revisão sobre antagonistas fúngicos que desempenham um papel significativo no controle de doenças de plantas, *Trichoderma* foi identificado como o gênero com maior potencial de biocontrole, seguido de espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* (THAMBUGALA et al., 2020). Já foi reportada a capacidade do gênero *Trichoderma* como controlador biológico de ascomicetos, basidiomicetos, oomicetos e nematóides (FERREIRA; MUSUMECI, 2021; SCHMOLL; SCHUSTER, 2010).

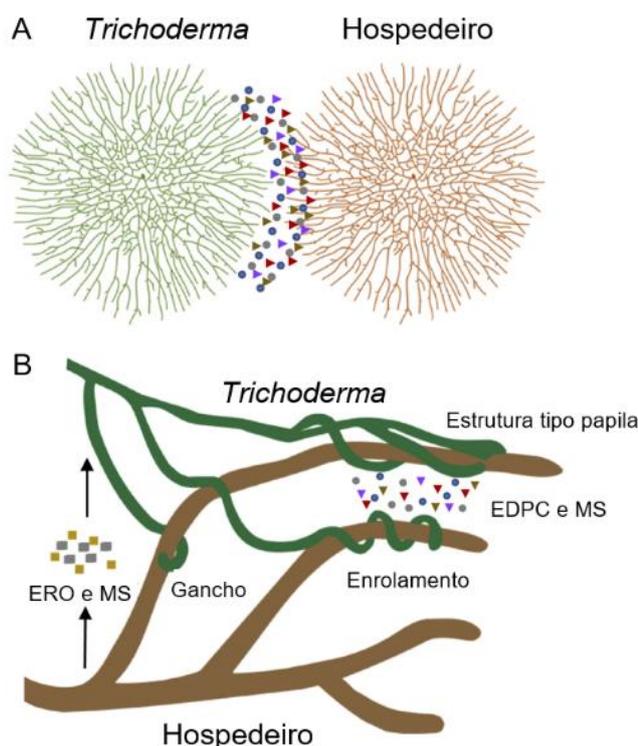
As espécies de *Trichoderma* utilizadas como agentes de biocontrole podem agir de forma direta ou indireta sobre o organismo a ser controlado. O potencial de um agente de biocontrole em controlar patógenos está relacionado com a sua capacidade de se desenvolver no ambiente, apesar da competição com outros organismos. De um modo geral, os antagonistas agem por competição por nutrientes, espaço e luz, por antibiose devido aos metabólitos produzidos e liberados no meio, por parasitismo, pela produção de enzimas ou metabólitos secundários

degradadores da parede celular celular do patógeno e também ativando os mecanismos de defesa da planta, bem como promovendo o crescimento das plantas (MONTE; BETTIOL; HERMOSA, 2019; SHARMA; GOTHALWAL, 2017). Na Figura 1.3 são sintetizadas as habilidades características do gênero *Trichoderma* como agente de biocontrole.

A adição de *T. harzianum* T-22 ao solo, no cultivo de cenoura, além de aumentar o crescimento, desenvolvimento e a saúde das plantas, aumentou as populações de *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp. na rizosfera e reduziu a ocorrência de fungos patogênicos, demonstrando o potencial benéfico de *Trichoderma* sobre bactérias benéficas para as plantas (PATKOWSKA et al., 2020).

A partir de uma formulação sólida contendo aveia, caulim e vermiculita, Herrera-Téllez et al. (2019) aplicaram *Trichoderma asperellum* em plantas de tomate e observaram que o antagonista controlou *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea*. Também, com relação aos parâmetros de crescimento das plantas, obteve-se um aumento em 30% o peso das plantas cultivadas, além de aumentar o conteúdo de clorofila. Os autores também associaram a capacidade do *T. asperellum* de inibir a produção de espécies reativas de oxigênio na contribuição dos efeitos protetores dos patógenos ao cultivo de tomate.

Figura 1. 3 - Representação esquemática da ação de controle biológico por *Trichoderma* spp. (A) diagrama representando as etapas iniciais de crescimento antes do contato e da interação entre colônias de *Trichoderma* e uma presa fúngica. (B) diagrama que descreve as principais formas utilizadas pelo *Trichoderma* durante sua interação antagônica. ERO, espécies reativas de oxigênio; EDPC, enzimas degradantes da parede celular; e MS, metabólitos secundários.



Fonte: Adaptado de Guzmán-Guzmán et al. (2019).

Ademais, evidências recentes indicam uma nova vantagem do *Trichoderma*, em relação a outros agentes microbianos utilizados na agricultura, que é a sua utilidade na obtenção de alimentos com melhoria no perfil nutracêutico (FERREIRA; MUSUMECI, 2021). A inoculação de plantas de morango por imersão da raiz com cepas de *Trichoderma* melhorou a qualidade do fruto e favoreceu o acúmulo de antocianinas e outros antioxidantes em frutos maduros (LOMBARDI et al., 2020).

Os tratamentos preventivos potencializam o mecanismo de competição do *Trichoderma* spp. e se mostram mais efetivos que os tratamentos curativos (DÍAZ-GUTIÉRREZ et al., 2021). Portanto a adição desse microrganismo juntamente com a rocha fosfática no início do crescimento das mudas pode ser uma alternativa eficaz

para utilização de cepas com eficiência no controle biológico e solubilização de fosfatos.

Assim, devido às diversas características benéficas do *Trichoderma*, o uso desse microrganismo na agricultura vem crescendo, pois tem se mostrado uma forma de aumentar a produção de alimentos, preservar os recursos naturais e melhorar a qualidade do solo, colaborando no desenvolvimento de uma agricultura sustentável. Porém, algumas barreiras relacionadas à sua utilização ainda devem ser vencidas, como a produção de formulações capazes de manter a viabilidade dos microrganismos.

1.3.3 *Aspergillus*

Os fungos do gênero *Aspergillus* têm um histórico extenso em pesquisa biológica. A abundante diversidade de espécies desse gênero, além da capacidade de utilização de diferentes fontes de carbono, permitem a produção de um amplo espectro de metabólitos com diferentes aplicações industriais (PAPAGIANNI, 2007; YANG; LÜBECK; LÜBECK, 2017). O *Aspergillus niger* é bastante utilizado na produção comercial de ácido cítrico (GREWAL; KALRA, 1995; MATTEY, 1992; YANG; LÜBECK; LÜBECK, 2017) e é capaz de produzir outros ácidos orgânicos como glucônico e oxálico (MENDES et al., 2014; YANG; LÜBECK; LÜBECK, 2017). Sendo uma alternativa biotecnológica para a solubilização de rochas fosfáticas.

Schneider et al. (2010) estudaram a solubilização biológica de três diferentes rochas fosfáticas utilizando *A. niger* em cultivo direto e com utilização do sobrenadante do cultivo livre de células não observando diferenças significativas na solubilização do P presente nas rochas, apesar de ser observado diferenças nos perfis de produção de ácido orgânico observados nos cultivos. Os autores também observaram a presença dos ácidos glucônico e oxálico que desempenharam importantes papéis na solubilização de P, e conseguiram solubilizar 5,4% de uma rocha fosfática sedimentar e, aproximadamente, 4% de uma rocha fosfática de origem ígnea em 192 h de cultivo. Porém, nesse estudo a solubilização biológica das rochas não superou a solubilização por ácidos inorgânicos.

Mendes et al. (2020) avaliaram ácidos orgânicos associados à solubilização microbiana de P para solubilizar rochas fosfáticas com diferentes graus de reatividade em comparação com a solubilização pelo ácido sulfúrico (comumente utilizado para a solubilização das RF e produção dos fertilizantes fosfatados). Os

autores observaram que o tipo de ácido aplicado e a sua concentração tiveram mais influência na solubilização do que a reatividade das RF avaliadas. E que, cada mmol de ácido oxálico aplicado foi capaz de liberar 21 mg de P, enquanto cada mmol de ácido sulfúrico liberou 14 mg de P. Esse resultado evidencia a capacidade do ácido oxálico na solubilização de fontes minerais. Nesse contexto, a capacidade de produção de ácido oxálico por *Aspergillus niger* foi demonstrada por diversos autores (MENDES et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2021; TIAN et al., 2021; YANG; LÜBECK; LÜBECK, 2017). Assim, esse fungo se mostra como uma alternativa promissora para o uso biotecnológico juntamente com rochas fosfáticas. É importante considerar que esse ácido não só colabora com a solubilização de P das rochas fosfáticas, mas também foi observada a sua capacidade de solubilização de fontes minerais potássicas (LODI et al., 2021).

Além do mais, Nascimento et al., (2021), em estudo com *A. niger* em Latossolo altamente intemperizado, observaram que os metabolitos produzidos foram capazes de dessorver o P presente no solo, revertendo parcialmente a absorção desse nutriente pelo solo. Indicando como esse microrganismo tem potencial para ser utilizado na agricultura como estratégia para melhorar a eficiência do uso do P na agricultura.

O uso direto das rochas fosfáticas na agricultura é de certa forma inviabilizado devido à alta estabilidade química das fases relacionadas, sendo assim, a sua baixa solubilidade em campo torna-se um limitante para aplicação direta. Focado nesse aspecto, Klaic et al. (2018a) desenvolveram um material granular, para aplicação direta na agricultura, a partir de amido gelatinizado onde a dispersaram rocha fosfática juntamente com os esporos de *A. niger*, buscando estabelecer a produção local de ácidos orgânicos capazes de solubilizar mais eficientemente a rocha fosfática presente no grânulo. Nesse contexto, os autores observaram uma solubilização de duas rochas fosfáticas de origem ígnea e sedimentar próximas a 70% após 96 h de cultivo, mostrando a capacidade da solubilização local do fósforo inorgânico presente em minerais a partir da ação do *A. niger*. Na mesma linha, Klaic et al. (2021) produziram um biofertilizante com *A. niger* em uma matriz de amido contendo micronutrientes (Zn, Mn e Cu) e enxofre elementar dispersos e aplicaram no cultivo de azevém italiano (*Lolium multiflorum* Lam.), verificando que a produção de matéria seca e a absorção cumulativa desses minerais foi superior ao controle. Esse resultado indica que a acidificação local do *A. niger*, juntamente com a

oxidação do S^o levaram a um aumento na solubilização de Zn, Mn e Cu e consequente absorção desses micronutrientes pelo azevém. Esses resultados ressaltam a capacidade de acidificação dessa cepa de *A. niger*, solubilizando e disponibilizando os nutrientes para as plantas. Além de comprovar a eficácia do conceito de um reator em grânulo, onde o microrganismo é ativado após adicionado ao solo e se iniciam diversas reações que aumentam a eficiência do fertilizante (KLAIC et al., 2021).

Aspergillus terreus e do *Penicillium citrinum*, fungos endófitos, foram avaliados no controle biológico da podridão de caule causada por *Sclerotium rolfsii* e no crescimento das plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.), tendo sido observado que a associação planta-endófito conferiu resistência à doença e ocorreu aumento na produção de biomassa das plantas de girassol (WAQAS et al., 2015). Em uma seleção de 49 isolados de fungos rizoféricos foi comprovada a capacidade do isolado *Aspergillus terreus* JF27 de promover o crescimento de tomateiros e induzir resistência da planta à *Pseudomonas syringae* agente causal da mancha bacteriana (YOO et al., 2018).

Aspergillus flavus CSH1 aliviou os efeitos do estresse salino e aumentou o crescimento de plantas de soja, o que foi associado a capacidade de produção de hormônios vegetais como giberelinas e compostos como o ácido indol-3-acético (LUBNA et al., 2018). Todos esses estudos evidenciam a capacidade desse gênero a ser aplicado na agricultura.

1.3.4 Coinoculação

O interesse em estudar o cultivo misto ou também chamado de co-cultivo, se baseia no fato de que no solo os microrganismos existem em comunidades, onde liberam diferentes metabólitos e interagem com plantas e outros microrganismos envolvidos em processos naturais de defesa e/ou competição por espaço e nutrientes (OWEN et al., 2015; VASSILEV et al., 2015). O uso de consórcio de microrganismos no sistema agrícola pode melhorar a eficácia, estabilidade e uniformidade dos microrganismos no controle de doenças e promoção do crescimento de plantas sob diversas condições ambientais e de solo (STOCKWELL et al., 2011), pois o co-cultivo gera uma competição inter-microbiana e a comunicação dos microrganismos pode ativar genes silenciosos e estimular a produção de metabólitos secundários podendo aumentar a sinalização de defesa

(NETZKER et al., 2015; SARMA et al., 2015). Por isso, existe uma tendência de pesquisa voltada a pequenos consórcios e o entendimento de como certas espécies se comportam atuando de forma combinada.

O co-cultivo de *Trichoderma asperellum* GDFS1009 e *Bacillus amyloliquefaciens* 1841 aumentou significativamente o crescimento e a proteção das plantas de trigo contra *Fusarium graminearum* em ensaios em casa de vegetação. O co-cultivo dessas espécies induziu a produção de enzimas relacionadas ao parasitismo, metabólitos secundários, compostos promotores de crescimento de plantas e a produção de compostos não detectados quando as culturas foram cultivadas isoladamente (KARUPPIAH et al., 2019).

Pelo que conhecemos, não tem estudos na literatura combinando os fungos *Aspergillus* e *Trichoderma* em produtos biológicos para a agricultura. Embora a sinergia desses gêneros é citada por diversos autores na produção de enzimas e degradação mais eficiente de materiais lignocelulósicos (FANG et al., 2013; MAEHARA et al., 2018; RABELLO et al., 2014; TENGARDY; SZAKACS, 2003; WANG et al., 2015).

1.4 Produtos biológicos

A utilização de microrganismos benéficos para plantas vem sendo uma alternativa bastante estudada. A aplicação desses microrganismos individualmente ou em consórcios microbianos é uma ferramenta importante para promover a saúde e a produtividade da cultura (AHMAD et al., 2018). Nesse contexto, o mercado mundial de produtos biológicos está entre as indústrias de crescimento mais rápido globalmente, com uma taxa de crescimento anual estimada entre de 15% e 17% (MARKETS AND MARKETS, 2020), crescendo no Brasil 28%, movimentando mais de 1 bilhão de reais (MAPA, 2021). Em 2020 o MAPA registrou 95 defensivos agrícolas de baixo risco (aumento em 121% comparado a 2019), sendo produtos biológicos microbianos, semioquímicos, bioquímicos, extratos vegetais e reguladores de crescimento (MAPA, 2021). Ao mesmo tempo que se observa o aumento nos mercados de produtos biológicos, também é esperado uma diminuição no mercado de pesticidas, devido aos requisitos regulatórios emergentes e à demanda do consumidor por alimentos com baixo teor de resíduos químicos (SINGH et al., 2020).

Biofertilizantes podem ser definidos como uma preparação contendo microrganismo(s) vivo(s) que a partir das suas atividades biológicas ajudam a

aumentar a fertilidade do solo, podendo ser pela fixação de nitrogênio, solubilização do fósforo, decompondo resíduos orgânicos ou aumentando o crescimento da planta pela produção de hormônios de crescimento e aquisição de nutrientes (MITTER et al., 2021; SOUMARE et al., 2020). Existe uma tendência de substituição parcial dos fertilizantes químicos por biofertilizantes, pois eles apresentam a vantagem de serem fáceis de usar, não tóxicos e ecologicamente corretos e sustentáveis (SOUMARE et al., 2020). Porém, essa substituição é dificultada, pois a formulação química possui um armazenamento de longo prazo e de fácil uso pelos agricultores (BASHAN et al., 2014).

A produção de fertilizantes microbianos não depende apenas do conhecimento detalhado da fisiologia de plantas e microrganismos, mas também do grande número de desafios tecnológicos como o processo de fermentação, tipo de formulações, população de microrganismos e seu sistema de liberação (STAMENKOVIĆ et al., 2018). A dificuldade do uso de produtos biológicos pelos agricultores se deve ao fato da falta de reprodutibilidade dos efeitos benéficos, o que resulta numa falta de credibilidade dos produtos e dificuldade nas vendas (SOUMARE et al., 2020; STAMENKOVIĆ et al., 2018). Isso pode ser relacionado a diversos fatores como a má utilização pelo agricultor, à baixa qualidade do produto, a problemas na produção e formulação de inóculos, à heterogeneidade do solo e a não resistência dos produtos a microbiota do solo (BASHAN et al., 2014; VASSILEV et al., 2015). Portanto, fabricantes e cientistas têm buscado superar esses gargalos associando uma combinação de conhecimentos de aspectos microbianos e técnicos para melhorar a confiabilidade e o uso prático desses produtos (STAMENKOVIĆ et al., 2018).

Vassilev et al. (2015) descreveram algumas etapas importantes para o desenvolvimento de um biofertilizante, sendo elas: (a) isolamento e seleção do microrganismo efetivo e competitivo para um sistema específico ou uma variedade de culturas; (b) caracterização do microrganismo selecionado no meio de crescimento otimizado e nos parâmetros do processo de fermentação; (c) estudos de aplicações no campo; (d) desenvolvimento de um método de formulação para garantir a persistência microbiana no solo, inclusive sob condições estressantes; (e) produção a nível comercial (aumento de escala); (f) desenvolvimento de um sistema de controle de qualidade para a produção e armazenamento; e (g) desenvolvimento de métodos de aplicação em campo para garantir os benefícios reivindicados. Sendo

que são necessários esforços em todas as etapas de desenvolvimento para assegurar a qualidade do produto e para que ele possa de fato “competir” com o mercado de fertilizantes químicos.

1.4.1 Cultivo microbiano

Diversos são os microrganismos e seus mecanismos de ação que estão sendo estudados para se ter uma melhor compreensão dos benefícios da interação entre microrganismo-planta para uso como produtos biológicos. Porém, um dos entraves na produção e avanço da indústria de biofertilizantes está relacionado a produção desses microrganismos em larga escala.

O cultivo de microrganismos pode ser dividido em duas classes principais: cultivo submerso (CSm) ou cultivo em estado sólido (CES). Embora o CSm tenha vantagens conhecidas relacionadas à instrumentação do biorreator e controle de processos, facilitando o processo de aumento de escala e a produção industrial principalmente para inoculantes bacterianos, o CES pode ser particularmente vantajoso para o cultivo de fungos filamentosos, porque simula o habitat natural desses microrganismos (BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012; FARINAS, 2015) apresentando taxas de crescimento superiores quando comparado ao crescimento em CSm (ASHOK et al., 2017; SINGHANIA et al., 2009; VASSILEV et al., 2015).

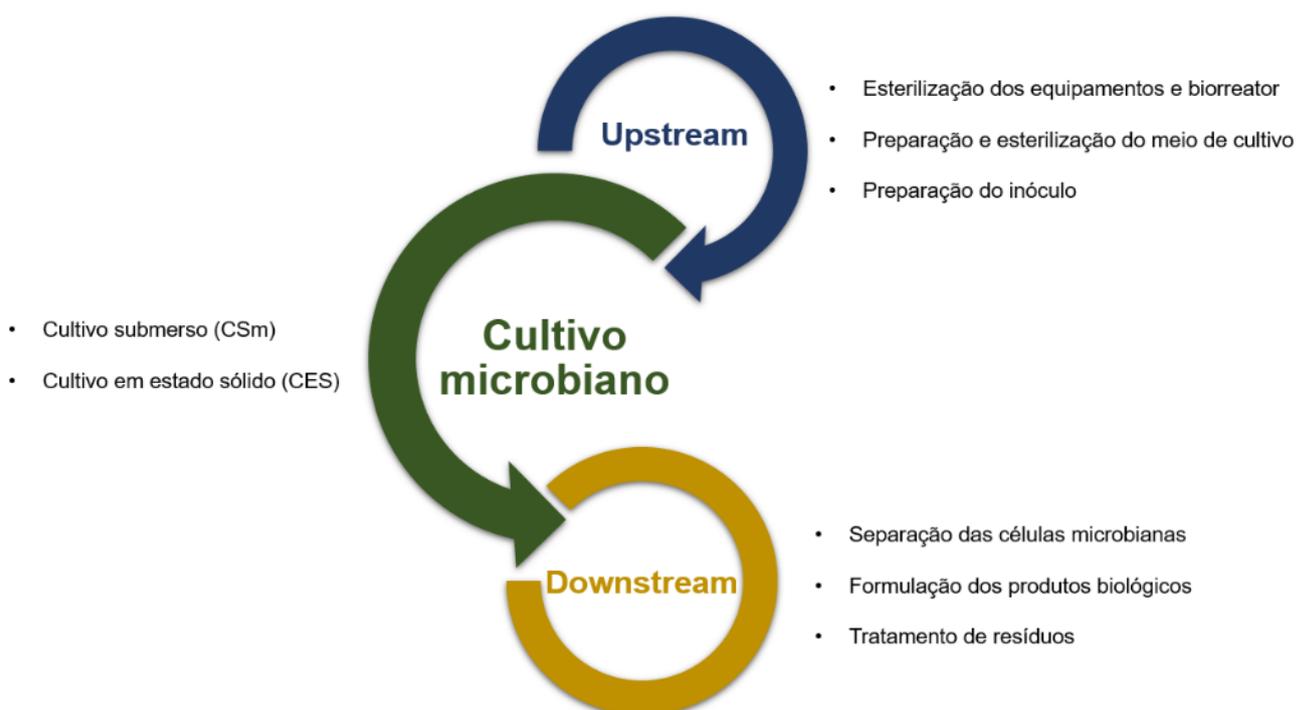
Os propágulos fúngicos produzidos por CSm, também chamados de conídios submersos ou blastosporos são menos desejados, pois possuem viabilidade mais curta, menor resistência à luz ultra-violeta, virulência e resistência a fatores abióticos mais baixa que os conídios produzidos por CES (HOLDER et al., 2007; MUÑIZ-PAREDES; MIRANDA-HERNÁNDEZ; LOERA, 2017; MUÑOZ et al., 1995). Porém, possuem infecção e germinação mais rápidas quando adicionadas ao solo (MASCARIN; JARONSKI, 2016). Apesar de ser mais comum o cultivo de fungos do gênero *Trichoderma* em CES, KOBORI et al. (2015) otimizaram a produção de microescleródios de *Trichoderma harzianum* por CSm em frascos. Os microescleródios são propágulos fúngicos mais resistentes que os conídios aéreos, e até então não haviam sido relatados na literatura a produção desses propágulos por *Trichoderma* spp. Os autores também comprovaram a eficácia dos microescleródios para o controle biológico observando uma redução no tombamento de sementes de melão em substrato infestado com *Rhizoctonia solani*. Esses estudos demonstraram a importância da avaliação de um conjunto de fatores

associados não somente à produção dos microrganismos, mas também à capacidade de ação posterior e a viabilidade dos microrganismos produzidos por diferentes formas de cultivo.

O cultivo de microrganismos em resíduos agrícolas pode resultar em esporos de alta qualidade que podem ser utilizados para inoculação de sementes ou incorporados em géis de polissacarídeos naturais (STOJANOVIĆ et al., 2019). Além disso, foi relatado que tais esporos são mais eficientes do que aqueles cultivados por CSm, pois possuem maior adesão às raízes das plantas e são mais resistentes às condições prejudiciais do meio ambiente (VASSILEV et al., 2015). Diante desse fato, percebe-se que vários fatores devem ser levados em conta para a produção dos microrganismos para posterior utilização nas formulações dos produtos biológicos, sendo que para a produção de fungos filamentosos a utilização da CES se mostra bastante promissora. O cultivo de *Trichoderma* spp. para bioformulações comerciais atualmente é feito, em sua maioria por CES.

Vale ressaltar também que além do cultivo microbiano propriamente dito, existem etapas fundamentais que antecedem e sucedem a produção dos microrganismos. Estas são denominadas respectivamente de “*upstream*” e “*downstream*”, representadas na Figura 1.4.

Figura 1. 4 - Processos *upstream* e *downstream* do cultivo microbiano envolvidos na produção de um produto biológico.



Fonte: o autor

A etapa *upstream* de um bioprocessamento de cultivo microbiano envolve principalmente a esterilização de equipamentos e meios de cultivo, assim como a preparação do inóculo das linhagens microbianas. Os processos ligados a esta etapa *upstream* são importantes para garantir a pureza do inoculante, assim como evitar a contaminação na etapa do cultivo microbiano por cepas de microrganismos indesejados. A contaminação do processo pode inviabilizar a utilização do inoculante no campo ou gerar a perda completa da produção do inoculante. A etapa *downstream* de um bioprocessamento de cultivo microbiano está relacionada à separação e purificação de produtos e subprodutos ao tratamento de efluentes e o processo de produção do biofertilizante ou inoculante. Sendo esses processos fatores cruciais para a obtenção de produtos biológicos de qualidade, para que se possa garantir o efeito benéfico do microrganismo quando aplicado ao campo, colaborar para o aumento do tempo de prateleira e a formulação desse produto.

1.4.2 Formulações

O sucesso da aplicação dos produtos biológicos no campo requer a conservação dos microrganismos, e as barreiras para a ampla comercialização dos produtos biológicos costumam ser as limitações das formulações (BASHAN et al., 2014; SCHOEBITZ; BELCHÍ, 2016). Os desafios enfrentados na formulação de produtos biológicos estão relacionados à proteção química e física insuficientes para manutenção da viabilidade celular e prevenção de problemas de dessecação e contaminação (MITTER et al., 2021). Para contornar essas dificuldades são necessários investimentos e pesquisas em novos processos de produção de biofertilizantes e proteção dos microrganismos.

VASSILEV et al. (2020) descrevem três principais funções das formulações de inoculantes: (a) proporcionar um microambiente adequado para a(s) cepa(s) microbianas, mantendo a viabilidade durante o armazenamento; (b) capacidade de suportar a competição com a microbiota nativa do solo; e (c) reduzir as perdas por predação pela microbiota após a formulação ser adicionada ao solo. Por esses motivos, a formulação é um fator importante no sucesso do produto biológico.

Em geral, existem dois tipos de bioformulações, as sólidas e as líquidas. Inoculantes líquidos são as culturas microbianas misturadas com água, óleo ou aditivos, como polímeros, que melhoram a viscosidade, capacidade de dispersão celular e estabilidade do produto (VASSILEV et al., 2020). As formulações líquidas têm a vantagem de serem mais facilmente aplicadas pelos agricultores, porém os microrganismos não são suficientemente protegidos contra as condições ambientais e contaminações e normalmente possuem baixo tempo de prateleira, pois a atividade metabólica dos microrganismos diminui rapidamente após a fabricação (KAMINSKY et al., 2019; SCHOEBITZ; BELCHÍ, 2016), e o inóculo líquido tem liberação instantânea e rápida após aplicação no solo (VASSILEV et al., 2020).

As formulações sólidas são preparadas contendo o microrganismo, um aglutinante e o transportador/carreador. Os carreadores podem ser orgânicos ou inorgânicos, onde o biofertilizante pode ser na forma granular ou microgranular, pós ou grânulos molháveis (MISHRA; ARORA, 2016; VASSILEV et al., 2020). Os carreadores normalmente são turfa, resíduos agroindustriais, vermiculita, perlita, argilas, fosfato de rocha, sulfato de cálcio e polissacarídeos (MISHRA; ARORA, 2016; SAHU; BRAHMAPRAKASH, 2016). A bioformulação sólida tem como

vantagem um mais fácil armazenamento e transporte e vida útil prolongada quando comparado com as formulações líquidas (MISHRA; ARORA, 2016). Observa-se uma crescente demanda pelo desenvolvimento de novas bioformulações para que seja possível a substituição, mesmo que parcial, dos pesticidas químicos.

Dentre as abordagens que chamam a atenção para o desenvolvimento de uma formulação, o encapsulamento, técnicas de revestimento ou incorporação de células em uma matriz, tem sido considerado como ferramenta eficiente para a proteção de microrganismos, permitindo uma liberação gradual e aumentando a vida de prateleira de produtos biológicos por proteger as células das condições adversas como temperatura, luz, pH, umidade (HOYOS-LEYVA et al., 2018; MISHRA; ARORA, 2016; SCHOEBITZ; BELCHÍ, 2016; SCHOEBITZ; LÓPEZ; ROLDÁN, 2013; VASSILEV et al., 2020). Essas técnicas tendem a estabilizar as células, proporcionando menos exposição a estresses bióticos e abióticos, potencializando sua viabilidade (SCHOEBITZ; BELCHÍ, 2016).

Nesse contexto, o amido é um biopolímero renovável e disponível amplamente na natureza e sua utilização na microencapsulação é promissora pois possui baixo custo, alta disponibilidade e diversas funcionalidades como retenção de água, alta ou baixa viscosidade, podendo encapsular diversos tipos de materiais, como vitaminas, lipídeos, pigmentos, drogas, herbicidas, proteínas e microrganismos, entre outros (HOYOS-LEYVA et al., 2018). A adesão das células ao amido pode gerar esse efeito protetor e aumentar as taxas de sobrevivência aos processos de secagem (SCHOEBITZ; BELCHÍ, 2016). Uma vantagem adicional pode ser citada sobre o uso do amido é que ele pode servir de fonte de carbono para os microrganismos presentes na formulação, não dependendo do acesso a nutrientes disponíveis no microambiente.

Melhorar a vida útil do produto biológico mantendo as suas características é essencial para o sucesso no uso. O metabolismo das células microbianas, como tolerância ao pH e temperatura, capacidade de esporulação, e tolerância à dessecação, afetam diretamente a sobrevivência dos microrganismos no processo de produção de biofertilizantes. Por isso, as condições de processamento dos biofertilizantes devem possuir temperaturas amenas. O método da extrusão a frio é uma alternativa para a granulação do biofertilizante minimizando os efeitos da inativação das células pela temperatura. Importantes sugestões para aumento da vida de prateleira do produto são a diminuição da umidade da formulação e

armazenamento em temperaturas mais frias (SABERI-RISEH et al., 2021; XAVIER; HOLLOWAY; LEGGETT, 2004). Muitos esforços vêm sendo realizados na pesquisa para melhoramento da qualidade desses produtos. Nesse cenário, estão surgindo novas técnicas para o desenvolvimento de novos produtos, com cepas previamente selecionadas atuando isoladas ou co-inoculadas.

1.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Associando as temáticas descritas nos tópicos anteriores, a produção de um biofertilizante com o princípio de um micro reator, contendo rocha fosfática, uma fonte de carbono e microrganismos incorporados em uma matriz de amido, pode ser uma alternativa sustentável na agricultura moderna. Além do mais, devido a produção de estruturas mais resistentes como os esporos, dos fungos filamentosos aqui abordados, a formulação sólida granular é uma alternativa interessante para a manutenção da viabilidade das células. A avaliação de microrganismos isolados e da combinação dos fungos *Trichoderma* e *Aspergillus* pode contribuir para a obtenção de um produto com múltiplas funções. Portanto, é de grande interesse tecnológico o desenvolvimento de um processo passível de escalonamento para a produção de biofertilizantes, utilizando microrganismos com capacidade de solubilização de fosfato, controle biológico e de crescimento de plantas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Essa tese teve como objetivo desenvolver uma rota, passível de escalonamento, para produção de biofertilizantes granulares a partir de extrusão a frio utilizando a rocha fosfática como carreador e uma fonte de nutrientes para dar suporte aos microrganismos (*Aspergillus niger* e *Trichoderma* spp.) atuarem de forma isolada ou combinada na solubilização do fósforo, controle biológico e promoção do crescimento de plantas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para o cumprimento do objetivo geral foram cumpridas as seguintes etapas:

- a) Caracterizar física, química e morfológica das rochas fosfáticas a partir de metodologias como microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios-X (DRX), fluorescência de raios X (XRF); tamanho de partículas (peneira vibratória) e área superficial específica (BET).
- b) Selecionar microrganismos a partir de cultivos líquidos para avaliar a solubilização de fósforo (P) das rochas fosfáticas brasileiras Pratápolis e Registro na forma livre e Bayóvar (Peru) utilizando as cepas de *Aspergillus niger* C, *Trichoderma harzianum* LQC99 e *Trichoderma asperelloides* LQC96 isoladas e em co-cultivo.
- c) Padronizar o processo de produção dos esporos de *Aspergillus niger* e *Trichoderma* spp.
- d) Desenvolver de um protocolo padrão para a produção do biofertilizante granular contendo rocha fosfática, amido em pó e esporos dos microrganismos encapsulados em uma matriz de amido gelatinizado.
- e) Produzir biofertilizantes granulares com as cepas isoladas de *Aspergillus niger* C e *Trichoderma asperelloides* LQC96 e combinadas em diferentes proporções, para a avaliação da solubilização de P e controle biológico do *Fusarium oxysporum* *in vitro*.
- f) Aprimorar a produção do biofertilizante visando diminuir etapas e utilizar o próprio material de cultivo dos microrganismos na formulação.

- g) Avaliar o grânulo biofertilizante com relação à viabilidade, densidade de partículas e força máxima de compressão diametral em diferentes formulações.
- h) Aplicar os grânulos biofertilizantes com as cepas isoladas e combinadas de *Aspergillus niger* C e *Trichoderma asperelloides* LQC96 em rizotron para avaliação do crescimento de plantas de tomate e da dinâmica do P em solo.

CAPÍTULO 2

Caracterização das rochas fosfáticas e solubilização em cultivo submerso das rochas em pó com microrganismos em cultivo isolado e combinado

1. INTRODUÇÃO

A presença do fósforo é indispensável para a produção de alimentos. As principais matérias-primas para a produção de fertilizantes fosfatados são as rochas fosfáticas (RFs), porém, essa é uma matéria-prima não renovável. As RFs podem ser definidas como minerais contendo concentrações de fosfato altas o suficiente para serem utilizadas comercialmente (LOTTERMOSER, 2010). Os fosfatos naturais apresentam como característica comum serem constituídos de minerais do grupo das apatitas (LOTTERMOSER, 2010; TOLEDO; PEREIRA, 2001). A diversidade dos minerais apatíticos se dá pela formação sob regimes geológicos distintos e por sofrerem transformações por intemperismo, lixiviação, precipitação e contaminações (TOLEDO; PEREIRA, 2001). O beneficiamento das RFs leva em consideração não somente a concentração dos minerais fosfatados, mas também a concentração de radioatividade do material (LOTTERMOSER, 2010).

A apatita pode ser representada de forma geral como $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$, onde X pode sofrer substituição por flúor (F) (fluorapatita) ou cloro (Cl) (clorapatita) ou hidroxila (OH) (hidroxiapatita) (Toledo, 2001). As RFs ocorrem em vários tipos de depósitos e os depósitos exploráveis podem ser divididos em: (a) fosforitas e depósitos sedimentares ou também conhecida como francolitas, são bastante encontradas nos EUA, Marrocos, Egito e Austrália oriental; (b) carbonatitos e rochas ígneas alcalinas contém a maior concentração de fosfato na forma de fluorapatitas e são encontrados no Brasil, Canadá, Austrália ocidental e Rússia; e (c) depósitos de guano, originalmente encontrados em ilhas do Oceano Pacífico (LOTTERMOSER, 2010).

Cerca de 90 % da produção mundial de fertilizantes fosfatados ocorrem a partir do processamento químico das RFs, sendo a abordagem mais comum e barata. Porém, esse processo envolve um alto custo energético e geração de resíduos nocivos ao meio ambiente (CÁNOVAS et al., 2018; CONAMA, 2011; LOTTERMOSER, 2010; UNEP, 2011). Esse modelo de produção de fertilizantes fosfatados gera fertilizantes com elevada solubilidade, ou seja, de rápida liberação

dos nutrientes (CHAVES; OBA, 2004). Isso pode gerar uma baixa eficiência no aproveitamento dos fertilizantes fosfatos, pois apesar da disponibilidade desse nutriente ser alta nos fertilizantes fosfatados, o P é altamente dependente do pH do solo. Esse nutriente pode ser rapidamente fixado a metais como ferro e alumínio em solos ácidos ($\text{pH} < 6,5$) (solos tropicais, como os solos brasileiros) e em solos mais alcalinos ($\text{pH} > 7,2$) é fixado principalmente ao cálcio e magnésio (RAVEN, 2015; TANDON et al., 2020). Estima-se que somente 15% dos fertilizantes fosfatados aplicados seja utilizado pelas plantas, sendo que o restante acaba complexado no solo ou arrastado pelas chuvas (CHAVES; OBA, 2004).

O uso direto da rocha fosfática no solo não é atrativo aos agricultores devido à baixa solubilidade desse material, que pode demorar meses/anos para ficar disponível, não sendo utilizado pelas primeiras culturas (CHAVES; OBA, 2004; PLOTEGHER, 2014). Sendo assim, algumas alternativas para aumento da solubilidade desse material vem sendo estudadas, como ativação mecânica através da moagem da rocha (PLOTEGHER, 2014), ou a utilização de microrganismos capazes de produzir ácidos orgânicos (KLAIC et al., 2017). Diante disso, há a necessidade de se utilizar os recursos naturais fosfatados de forma mais eficiente, buscando diminuir o custo da produção agrícola e reduzir os riscos ambientais associados tanto à produção de fertilizantes, como a utilização excessiva no solo.

Um fator fundamental para compreensão dos processos de solubilização biológica das RFs está relacionado com as suas características físico-químicas. Por isso, a primeira etapa desse trabalho está dedicada à caracterização das rochas brasileiras utilizadas (Registro e Pratápolis) e o estudo da solubilização biológica por cepas de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperelloides* e *Aspergillus niger* isolados e combinados, com o objetivo de selecionar a RF a ser utilizada para a produção do grânulo fertilizante e a seleção dos microrganismos solubilizadores de fosfato com maior compatibilidade.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ROCHAS FOSFÁTICAS

As rochas fosfáticas de Pratápolis ($RF_{Pratápolis}$) e a de Registro ($RF_{Registro}$), originárias do Brasil, foram gentilmente doadas pela Nutrisafra Fertilizantes Ltda. (Cosmópolis, São Paulo, Brasil). Para utilização, as rochas foram secas a 80 °C por 24 h em estufa com circulação de ar e após secagem passaram por peneiras para padronização do tamanho de partícula (<500 μm). A rocha fosfática Bayóvar ($RF_{Bayóvar}$), utilizada como um controle nos ensaios de solubilização, foi submetida a tratamento mecânico por 10 min em moinho orbital (Modelo CT-251, Servitec) constituído de pote de porcelana e bolas de alumina (KLAIC et al., 2017). As rochas foram armazenadas em sacos plásticos para posterior caracterização e utilização nos ensaios de solubilização.

2.2 CARACTERIZAÇÃO DAS ROCHAS FOSFÁTICAS

2.2.1 Análises químicas

As análises químicas das $RF_{Pratápolis}$ e $RF_{Registro}$ foram realizadas por fluorescência de raios X (FRX), utilizando a técnica de fusão de tetraborato de lítio. O flúor (F), enxofre (S) e cloro (Cl) também foram analisados a fim de confirmar as estruturas indicadas pelas análises de FRX. F foi determinado por fusão alcalina e determinação de íons específicos, o S foi determinado por análise de infravermelho, e o Cl foi determinado por fluorescência de raios-X com pó compactado. As análises foram realizadas pela SGS Geosol Laboratórios Ltda.

2.2.2 Difração raios X (DRX)

A difratometria por raios X foi aplicada às amostras das $RF_{Pratápolis}$ e $RF_{Registro}$ para avaliar as fases mineralógicas. Foi utilizado um difratômetro LabX XDR-6000 (Shimadzu, Japão) operado com radiação $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$), tensão de 30 kV e corrente de 30 mA. Os difratogramas foram registrados na faixa 2θ de 5-70°, com varredura contínua a 2°/min. Para identificação das fases cristalinas foi utilizado o software *Match!* e a biblioteca padrão Power Diffraction File 2 (PDF2).

2.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das rochas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura acoplada à espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (MEV-EDS), utilizando um microscópio JSM-6510 (JEOL, Japão). As amostras foram colocadas sob o *stub* (porta amostra) por uma fita de carbono e o excesso foi retirado com o auxílio de um soprador de ar. Em seguida, as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro e colocadas em dessecador até serem analisadas. O equipamento utilizado operou a uma tensão de aceleração de 5 kV.

2.2.4 Tamanho de partícula e área superficial

O tamanho das partículas foi avaliado em máquina agitadora de peneira (SoloTest, Brasil) durante 30 min. As peneiras utilizadas tinham de 53 a 500 µm. A partir da massa retida nas peneiras calculou-se as porcentagens relacionadas aos tamanhos de partículas. A área superficial específica foi determinada por adsorção isotérmica de nitrogênio, utilizando um instrumento Micromeritics ASAP-2020, de acordo com o método 5-point BET (Brunauer-Emmett-Teller).

2.3 SOLUBILIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS ROCHAS EM PÓ

A fim de selecionar a rocha e entender o comportamento de solubilização das cepas de *Aspergillus* e *Trichoderma* axênicas e combinadas, foram realizados ensaios de solubilização da rocha fosfática em pó em cultivo submerso (CSm). Os microrganismos utilizados e as condições de cultivo estão descritas a seguir.

2.3.1 Microrganismos

As cepas utilizadas de *Trichoderma harzianum* LQC-99 e *Trichoderma asperelloides* LQC-96, que apresentam antagonismo a fitopatógenos (REZENDE et al., 2020), foram obtidas da Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA) da Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna, São Paulo, Brasil). O *Aspergillus niger* C (BRMCTAA 82), que possui alta capacidade de solubilização de fosfato (KLAIC et al., 2017), foi obtido na Embrapa Agro Indústria de Alimentos (Rio de Janeiro, Brasil). Esses microrganismos foram armazenados a - 80 °C em uma solução de glicerol (30% em massa) e NaCl (0,9% em massa). Ambos os fungos,

Trichoderma e *Aspergillus*, foram reativados em batata dextrose ágar (BDA) (Acumedia, EUA). As cepas de *Trichoderma* spp. cresceram a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 h por 7 dias, e o *Aspergillus niger* cresceu a 30 ± 2 °C por 6 dias. Os esporos foram suspensos em solução esterilizada de Tween 80 (0,5% v/v) em água destilada, e a contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer.

2.3.2 Cultivo submerso

A partir da quantidade de P_2O_5 quantificada nos ensaios de caracterização, a adição de P foi padronizada a 670 mg/L meio de cultivo, para que todos os experimentos se iniciassem com a mesma quantidade desse componente. O meio nutriente de cultivo utilizado foi o meio PKV (PIKVOSKAYA, 1948), com a composição: glicose (1%); $(NH_4)_2SO_4$ (0,5%); NaCl (0,2%); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,1%); KCl (0,2%); $MnSO_4 \cdot H_2O$ (0,002%); $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,002%); extrato de levedura (0,5%). O pH do meio de cultura foi ajustado para 7,0 e esterilizado. Todos os materiais utilizados no cultivo e o meio de cultivo foram autoclavados a 121 °C por 20-30 min e a pressão de 1 atm.

Foi realizada uma etapa de pré-cultivo dos microrganismos antes do cultivo de solubilização das rochas fosfáticas. No pré-cultivo foram adicionados $1,2 \times 10^7$ esporos/mL de meio PKV dos esporos extraídos do cultivo em placas de BDA. O pré-cultivo e cultivo foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio PKV. Os frascos do pré-cultivo foram incubados por 48 horas, a 30 °C, em shaker com agitação a 220 rpm. Após o pré-inóculo preparado, para a solubilização das rochas em pó, foi adicionado 10% (v/v) da suspensão proveniente da etapa de pré-cultivo ao meio PKV e as diferentes rochas ($RF_{Pratápolis}$, $RF_{Registro}$ e $RF_{Bayóvar}$). Os ensaios de solubilização foram realizados a 30 °C, 220 rpm, por 120 h. Os ensaios de co-cultivo foram realizados utilizando 5% (v/v) dos inóculos de cada cepa. Os controles negativos foram a solubilização das rochas sem a presença dos microrganismos, sendo esses valores do controle subtraídos dos valores finais dos cultivos microbianos.

Após a finalização do cultivo, o meio foi filtrado utilizando bomba de vácuo com papel de filtro Whatman n ° 1, e posteriormente centrifugado a 7000 rpm por 20 min, a 20 °C. O sobrenadante coletado foi utilizado para quantificação do pH final, acidez total titulável e fósforo solúvel liberado. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, com cálculo da média e desvio padrão.

2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.4.1 Determinação do pH e acidez total titulável

O pH final do meio foi determinado em um medidor de pH (PG1800, Gehaka, Brasil). Para a determinação da acidez total foi titulado 20 mL do sobrenadante com uma solução de hidróxido de sódio (1M) e fenolftaleína como indicador (MAPA, 2013). A acidez total determina a concentração total de espécies ácidas do meio de cultura, sendo os resultados são expressos em mol de NaOH/L.

2.4.2 Determinação de fósforo solúvel

O teor de fósforo solúvel foi determinado pelo método colorimétrico adaptado de Murphy e Riley (1962) no qual a amostra reage com solução de ácido ascórbico ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$), ácido cítrico ($0,03 \text{ mol L}^{-1}$) e um reagente composto por solução de ácido sulfúrico ($4,7 \text{ mol L}^{-1}$), solução de molibdato de amônio e antimônio ($0,08 \text{ mol L}^{-1}$) e solução de tartarato de potássio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$). Esta mistura reagiu a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos, formando um complexo azul. A concentração do complexo foi determinada por espectrometria UV-Vis em 880 nm em espectrofotômetro de Microplaca Epoch 2 (BioTek, EUA).

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações entre os teores de P solubilizado foi realizado por análise de variância e o teste de comparações múltiplas de Tukey, ou de Kruskal-Wallis em casos de heterogeneidade de variância (verificada pelo teste de Bartlett). Correlações de Pearson foram calculadas entre os teores de P, acidez total titulável e pH. O nível de significância adotado foi de 5% e o software utilizado foi o R versão 4.0.0.

3 Resultados e discussão

2.3 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS, FÍSICAS E MORFOLÓGICAS DAS ROCHAS FOSFÁTICAS

As caracterizações das rochas foram realizadas para melhor compreensão das características químicas, físicas e morfológicas e entendimento de como essas características afetam a solubilização do fósforo presente nessas rochas. As características do RF_{Bayóvar} foram descritas anteriormente por Klaic et al., (2017).

As fases cristalinas da rocha Pratápolis (RF_{Pratápolis}) e da rocha de Registro (RF_{Registro}) foram investigadas pela difratometria de raios X (DRX) e os resultados estão apresentados na Figura 2.1 e 2.2. A composição química das rochas, avaliadas por fluorescência raios X (FRX), e alguns resultados das características físicas e morfológicas das rochas estão descritas na Tabela 2.1.

A análise de DRX mostrou as principais fases cristalinas presentes na RF_{Pratápolis} (Figura 2.1). Por meio dessa técnica foi possível identificar a fluorapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$, arquivo de difratograma PDF2 # 00-010-0355) e gesso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, arquivo de difratograma PDF2 # 00-036-0432) como fases principais. Fases menores, como brushita ($\text{Ca}(\text{PO}_3\text{OH}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, arquivo de difratograma PDF2 # 00-011-0293) e quartzo (SiO_2 , arquivo de difratograma PDF2 # 01-081-1665) também podem estar presentes. As fases identificadas foram consistentes com a análise química por fluorescência de raios X (Tabela 2.1), que mostrou a presença de P_2O_5 (17,80% em massa), CaO (36,10% em massa), S (8,62% em massa) e F (1,31% em massa) como principais constituintes das fases presentes na composição do RF_{Pratápolis}.

A partir dos resultados das caracterizações (Figura 2.1 e Tabela 2.1) foi possível fazer alguns cálculos e prever a porcentagem em massa das principais fases mineralógicas encontradas na rocha.

Figura 2. 1 - Padrão de difração raio X obtido para a rocha fosfática Pratápolis incluindo as informações dos picos extraídas e as fases minerais identificadas.

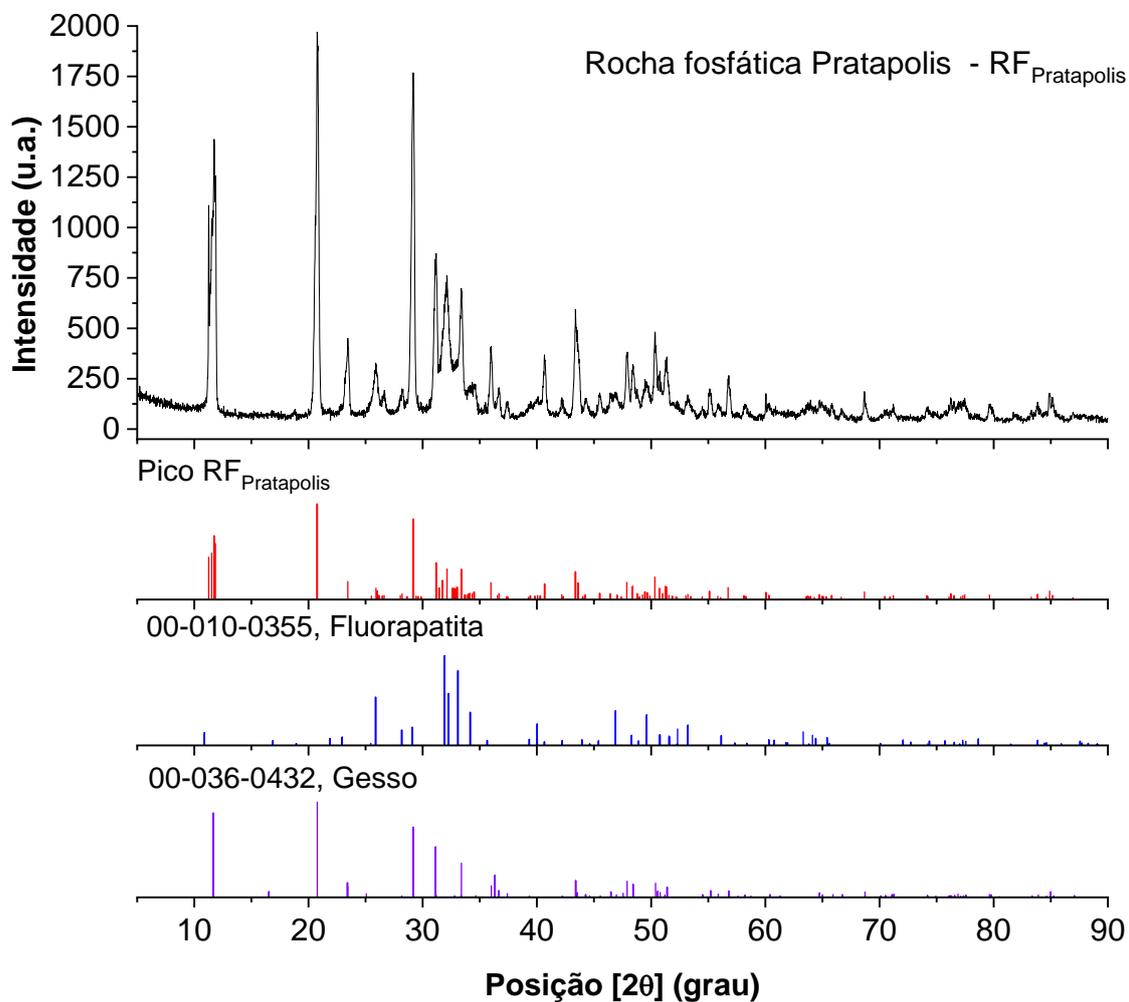


Tabela 2. 1 - Fluorescência raios X das rochas fosfáticas juntamente com os resultados de área superficial, tamanho dos poros e de partículas.

Óxidos (%)	Registro (RF_{Registro}) (% em massa)	Pratápolis (RF_{Pratápolis}) (% em massa)	Bayóvar (RF_{Bayóvar})* (% em massa)
SiO ₂	2,21	6,31	4,42
Al ₂ O ₃	3,91	1,4	0,96
Fe ₂ O ₃	14,1	1,07	0,87
CaO	34,9	36,1	46,6
MgO	0,36	0,69	0,53
TiO ₂	0,63	0,14	0,07
P ₂ O ₅	28,08	17,8	30,73
Na ₂ O	0,51	0,59	1,98
K ₂ O	0,08	0,19	0,30
MnO	1,69	0,03	0,01
Perda por ignição	6,54	14,07	10,57
Total	93,01	78,39	97,04
F (%) ^a	1,18	1,31	2,236
S (%) ^b	0,78	8,62	nd
Cl (%) ^c	<0,002	0,12	nd
Área superficial BET (m²/g)	9,59	39,36	22,2
Largura do poro de adsorção (Å)	68,85	85,43	nd
Largura do poro de dessorção (Å)	65,42	95,38	nd
Tamanho de partícula %			
53-106 µm	30,42	55,14	nd
<53 µm	64,12	15,53	nd

^a Determinado por análise de íons específicos; ^bDeterminado por espectroscopia infravermelho; ^c determinado por fluorescência raios X; nd: não determinado; *Klaic et al. (2017).

Considerando que todo o flúor (F) determinado provém apenas da fase fluorapatita (Ca₅(PO₄)₃.F, 504 g/mol), podemos calcular as frações molares de cada elemento.

$$X_F = \frac{MM_{Flúor}}{MM_{Fluorapatita}} = \frac{19}{504} = 0,0377$$

$$X_P = \frac{MM_{Fósforo}}{MM_{Fluorapatita}} = \frac{93}{504} = 0,1845$$

$$X_{Ca} = \frac{MM_{Cálcio}}{MM_{Fluorapatita}} = \frac{200}{504} = 0,3970$$

Fazendo a razão $R_{F/Ca}$ entre as duas frações molares, teremos a razão molar entre o flúor e o cálcio na fase fluorapatita:

$$R_{F/Ca} = \frac{X_F}{X_{Ca}} = \frac{0,0377}{0,3970} = 0,0950$$

Tendo o valor da razão e a quantidade de flúor determinados (Tabela 2.1), podemos calcular a quantidade de cálcio que compõe a fluorapatita:

$$R_{F/Ca} = \frac{F}{Ca} \rightarrow 0,0950 = \frac{1,31}{Ca} \rightarrow Ca = 13,79\%$$

Transformando esse valor em óxido de cálcio:

$$CaO_{Fa} = \frac{Ca \cdot 56}{40} = 19,31\%$$

Subtraindo a quantidade de óxido de cálcio para fluorapatita CaO_{Fa} do valor total CaO_{Total} (Tabela 2.1) determinado, teremos a porcentagem de óxido de cálcio nas outras fases:

$$CaO_{Outras\ fases} = CaO_{Total} - CaO_{Fa} = 36,1 - 19,31$$

$$CaO_{Outras\ fases} = 16,79\%$$

Fazendo a razão entre o flúor e o fósforo ($R_{F/P}$), podemos determinar a quantidade de fósforo que proveniente desta fase:

$$R_{F/P} = \frac{X_F}{X_P} = \frac{0,0377}{0,1845} = 0,2045$$

Com base no teor de flúor, podemos determinar a quantidade de fósforo nesta fase:

$$R_{F/P} = \frac{F}{P} \rightarrow 0,2045 = \frac{1,31}{P} \rightarrow P = 6,41\%$$

Transformando esse valor para a quantidade de pentóxido de fósforo (P_2O_5):

$$P_2O_{5\ Fa} = \frac{6,41 \cdot 142}{62} = 14,68\%$$

Subtraindo a quantidade de pentóxido de fósforo da fluorapatita ($P_2O_5 Fa$) do valor total de $P_2O_5 Total$ (Tabela 2.1) determinado, teremos o percentual de pentóxido de fósforo nas outras fases:

$$P_2O_5 Outras\ fases = P_2O_5 Total - P_2O_5 Fa = 17,8 - 14,68$$

$$P_2O_5 Outras\ fases = 3,12\%$$

E assim, podemos somar os percentuais determinados para a fase de fluorapatita e obter a quantidade, em massa, que esta fase representa na rocha fosfática (% Fa):

$$\%Fa = \%F + \%P_2O_5 Fa + \%CaO_{Fa} \rightarrow \%Fa = 35,3\%$$

Utilizando as massas restantes e assumindo que todo o P restante está na forma de brushita ($Ca(PO_3OH) \cdot 2H_2O$, 172 g/mol), podemos determinar a % de brushita (% Br) da mesma forma que foi realizado para a fluorapatita, sendo assim:

$$X_{Ca} = \frac{MM_{Cálcio}}{MM_{Fluorapatita}} = \frac{40}{172} = 0,2325$$

$$X_P = \frac{MM_{Fósforo}}{MM_{Fluorapatita}} = \frac{31}{172} = 0,1802$$

Fazendo a razão entre o fósforo e o cálcio ($R_{P/Ca}$) entre as duas frações molares, teremos a razão molar entre o flúor e o cálcio na brushita:

$$R_{P/Ca} = \frac{X_P}{X_{Ca}} = \frac{0,1802}{0,2325} = 0,775$$

Transformando o $P_2O_5 Outras\ fases$ ($\approx 3,12\%$) para P elementar ($\approx 1,36\%$) podemos calcular a quantidade de cálcio que vem da brushita:

$$R_{P/ca} = \frac{P}{Ca} \rightarrow 0,775 = \frac{1,36}{Ca} \rightarrow Ca = 1,76\%$$

Transformando esse valor para óxido de cálcio (CaO_{Br}):

$$CaO_{Br} = \frac{Ca \cdot 56}{40} = 2,46\%$$

Somando os percentuais determinados para a fase de brushita, teremos a quantidade em massa que esta representa dentro da rocha fosfática:

$$\%Br = \%P_2O_5_{\text{Outras fases}} + \%CaO_{Br} \rightarrow \%Br = 5,58\%$$

Sendo assim, para a RF_{Pratápolis} pode-se observar pelos cálculos que 35,3% em massa da rocha correspondem a fase fluorapatita e aproximadamente 5,6% correspondem a fase brushita, mostrando que as fases fosfatadas representam aproximadamente 41% da composição dessa rocha. O restante da rocha, possui outras fases constituintes, como o gesso, quartzo e outras fases minoritárias que não foram identificadas.

A Figura 2.2 mostra o perfil do difratograma da RF_{Registro}. Sendo possível observar que as principais fases cristalinas presentes no foram fluorapatita ($Ca_5(PO_4)_3F$, arquivo de difratograma PDF2 # 00-034-0011) e hidroxiapatita ($Ca_5(PO_4)_3OH$, arquivo de difratograma PDF2 # 01-089-6439). No entanto, hematita (Fe_2O_3 , arquivo de difratograma PDF2 # 00-010-0355) e traços de quartzo (SiO_2 , arquivo de difratograma PDF2 # 01-081-1665) também foram identificados. A análise de fluorescência de raios X (Tabela 2.1) confirmou a identificação dessas fases, pois revelou a presença de P_2O_5 (28,08% em peso), CaO (34,90% em massa), SiO_2 (2,21% em massa), Fe_2O_3 (14,10% em massa) e F (1,18% em massa). A presença desses componentes como principais constituintes das fases identificadas confirmam a presença de fluorapatita na RF_{Registro}.

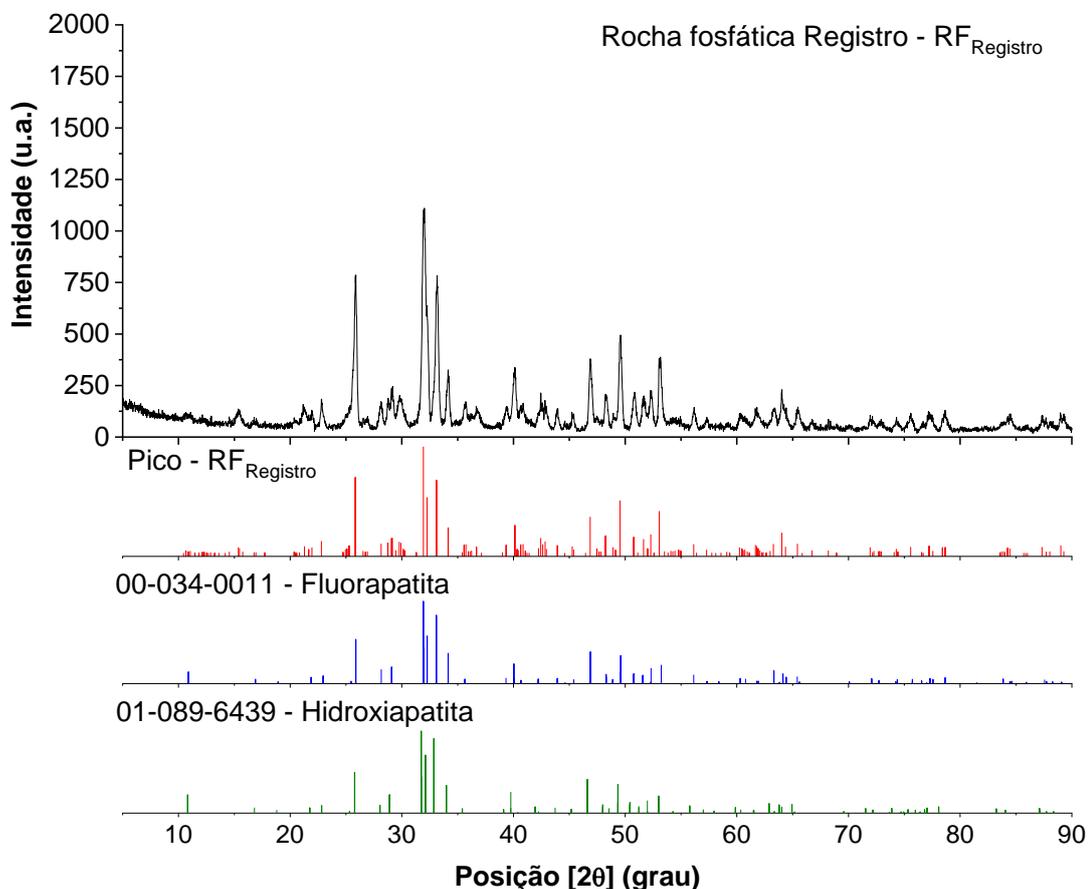
Com esses resultados, assim como realizado para a rocha Pratápolis, foi possível estimar as fases fosfatadas (fluorapatita e hidroxiapatita) da RF_{Registro}. Sendo assim, considerando que todo o flúor (F) determinado provém apenas da fase fluorapatita ($Ca_5(PO_4)_3.F$, 504 g/mol), podemos calcular as frações molares de cada elemento:

$$X_F = \frac{MM_{Flúor}}{MM_{Fluorapatita}} = \frac{19}{504} = 0,0377$$

$$X_P = \frac{MM_{Fósforo}}{MM_{Fluorapatita}} = \frac{93}{504} = 0,1845$$

$$X_{Ca} = \frac{MM_{Cálcio}}{MM_{Fluorapatita}} = \frac{200}{504} = 0,3970$$

Figura 2. 2 - Padrão de difração raio X obtido para a rocha fosfática Registro incluindo as informações dos picos extraídas e as fases minerais identificadas



Fazendo a razão $R_{F/Ca}$ entre as duas frações molares, teremos a razão molar entre o flúor e o cálcio na fase fluorapatita:

$$R_{F/Ca} = \frac{X_F}{X_{Ca}} = \frac{0,0377}{0,3970} = 0,0950$$

Tendo o valor da razão e a quantidade de flúor determinado (Tabela 2.1), podemos calcular a quantidade de cálcio que compõe a fluorapatita:

$$R_{F/Ca} = \frac{F}{Ca} \rightarrow 0,0950 = \frac{1,18}{Ca} \rightarrow Ca = 12,42\%$$

Transformando esse valor em óxido de cálcio (CaO_{Fa}):

$$CaO_{Fa} = \frac{Ca \cdot 56}{40} = 17,39\%$$

Subtraindo a quantidade de óxido de cálcio para fluorapatita CaO_{Fa} do valor total $\text{CaO}_{\text{Total}}$ (Tabela 2.1) determinado, teremos a porcentagem de óxido de cálcio nas outras fases:

$$\text{CaO}_{\text{Outras fases}} = \text{CaO}_{\text{Total}} - \text{CaO}_{\text{Fa}} = 34,9 - 17,39$$

$$\text{CaO}_{\text{Outras fases}} = 17,51\%$$

Fazendo a razão entre o flúor e o fósforo ($R_{\text{F/P}}$), podemos determinar a quantidade de fósforo que proveniente desta fase:

$$R_{\text{F/P}} = \frac{X_{\text{F}}}{X_{\text{P}}} = \frac{0,0377}{0,1845} = 0,2045$$

Com base no teor de flúor, podemos determinar a quantidade de fósforo:

$$R_{\text{F/P}} = \frac{F}{P} \rightarrow 0,2045 = \frac{1,18}{P} \rightarrow P = 5,77\%$$

Transformando esse valor para a quantidade de pentóxido de fósforo (P_2O_5):

$$\text{P}_2\text{O}_{5\text{Fa}} = \frac{P \cdot 142}{62} = 13,21\%$$

Subtraindo a quantidade de pentóxido de fósforo da fluorapatita ($\text{P}_2\text{O}_{5\text{Fa}}$) do valor total de $\text{P}_2\text{O}_{5\text{Total}}$ (Tabela 2.1) determinado, teremos o percentual de pentóxido de fósforo nas outras fases:

$$\text{P}_2\text{O}_{5\text{Outras fases}} = \text{P}_2\text{O}_{5\text{Total}} - \text{P}_2\text{O}_{5\text{Fa}} = 28,08 - 13,21$$

$$\text{P}_2\text{O}_{5\text{Outras fases}} = 14,87\%$$

E assim, podemos somar os percentuais determinados para a fase de fluorapatita e obter a quantidade, em massa, que esta fase representa na rocha fosfática Registro (% Fa):

$$\%Fa = \%F + \%P_2O_{5\text{Fa}} + \%CaO_{\text{Fa}} \rightarrow \%Fa = 31,78\%$$

Utilizando as massas restantes e assumindo que todo o P restante está na forma de hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, 502 g/mol), podemos determinar a % de hidroxiapatita (% Ha):

$$X_{\text{Ca}} = \frac{MM_{\text{Cálcio}}}{MM_{\text{Fluorapatita}}} = \frac{200}{502} = 0,3984$$

$$X_P = \frac{MM_{Fósforo}}{MM_{Fluorapatita}} = \frac{93}{502} = 0,1852$$

Fazendo a razão entre o fósforo e o cálcio ($R_{P/Ca}$) entre as duas frações molares, teremos a razão molar entre o flúor e o cálcio na hidroxiapatita:

$$R_{P/Ca} = \frac{X_P}{X_{Ca}} = \frac{0,1852}{0,3984} = 0,465$$

Transformando o P_2O_5 Outras fases ($\approx 14,87\%$) para P elementar ($\approx 6,493\%$) podemos calcular a quantidade de cálcio que vem da hidroxiapatita:

$$R_{P/Ca} = \frac{P}{Ca} \rightarrow 0,465 = \frac{6,493}{Ca} \rightarrow Ca = 13,96\%$$

Transformando esse valor para óxido de cálcio (CaO_{Ha}):

$$CaO_{Ha} = \frac{Ca \cdot 56}{40} = 19,55\%$$

Somando os percentuais determinados para a fase hidroxiapatita, teremos a quantidade em massa que esta representa dentro da rocha fosfática:

$$\%Ha = \%P_2O_5 \text{ Outras fases} + \%CaO_{Ha} \rightarrow \%Ha = 34,42\%$$

Os resultados da análise mineralógica indicaram que aproximadamente 32% em massa da $RF_{Registro}$ estão na fase fluorapatita, e 34% em massa na fase hidroxiapatita, o que representa 66,2% da sua composição em fases fosfatadas. A $RF_{Registro}$ apresentou quantidades superiores de fases fosfatadas quando comparada a $RF_{Pratápolis}$, que apresentou de fase fosfatada aproximadamente 41%. Segundo descrito por Klaic et al. (2017) as principais fases observadas na $RF_{Bayóvar}$ foram a uma fase apatita (fluorapatita e hidroxiapatita) e quartzo, e pela análise mineralógica, as fases fosfatadas apresentaram, aproximadamente 75% (em massa) da quantidade dessa rocha.

As morfologias das rochas fosfáticas foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (Figuras 2.3 e 2.4). As características físicas, como área de superfície e tamanho dos poros, estão descritas na Tabela 2.1. Os tamanhos das partículas foram determinados por meio de um sistema de agitador de peneira, que revelou que a maior parte ($55,14 \pm 2,6\%$) da $RF_{Pratápolis}$ possuía partículas na faixa de

53-106 μm , enquanto $64,12 \pm 1,41\%$ das partículas da $\text{RF}_{\text{Registro}}$ eram menores que 53 μm . Embora o tamanho de partícula do $\text{RF}_{\text{Registro}}$ seja menor que o do $\text{RF}_{\text{Pratápolis}}$, observou-se que a área superficial da $\text{RF}_{\text{Pratápolis}}$ (39,36 m^2/g) era cerca de 4 vezes maior do que a do $\text{RF}_{\text{Registro}}$ (9,59 m^2/g) e cerca de 2 vezes maior do que a área do $\text{RF}_{\text{Bayóvar}}$ (22,2 m^2/g).

A largura de poro de adsorção e dessorção se revelaram superiores na $\text{RF}_{\text{Pratápolis}}$ quando comparada a $\text{RF}_{\text{Registro}}$, esses dados não foram determinados para a $\text{RF}_{\text{Bayóvar}}$. As características de área superficial e largura de poros podem ter uma importante influência na capacidade de acesso dos microrganismos ao mineral. As imagens MEV das rochas mostraram que a superfície do $\text{RF}_{\text{Pratápolis}}$ era menos estruturada (Figura 2.3), aparentemente mostrava maiores fissuras, enquanto o $\text{RF}_{\text{Registro}}$ era mais liso, com uma superfície mais compacta (Figura 2.4).

Como a solubilização das rochas depende muito das características físicas e químicas do material, esses resultados são importantes para a compreensão dos resultados de cultivo microbiano, que estão apresentados no próximo tópico.

Figura 2. 3 - Microscopia eletrônica de varredura da rocha fosfática Pratápolis mostrando as características das superfícies das partículas (a) aumento de 1000 vezes e (b) 5000 vezes.

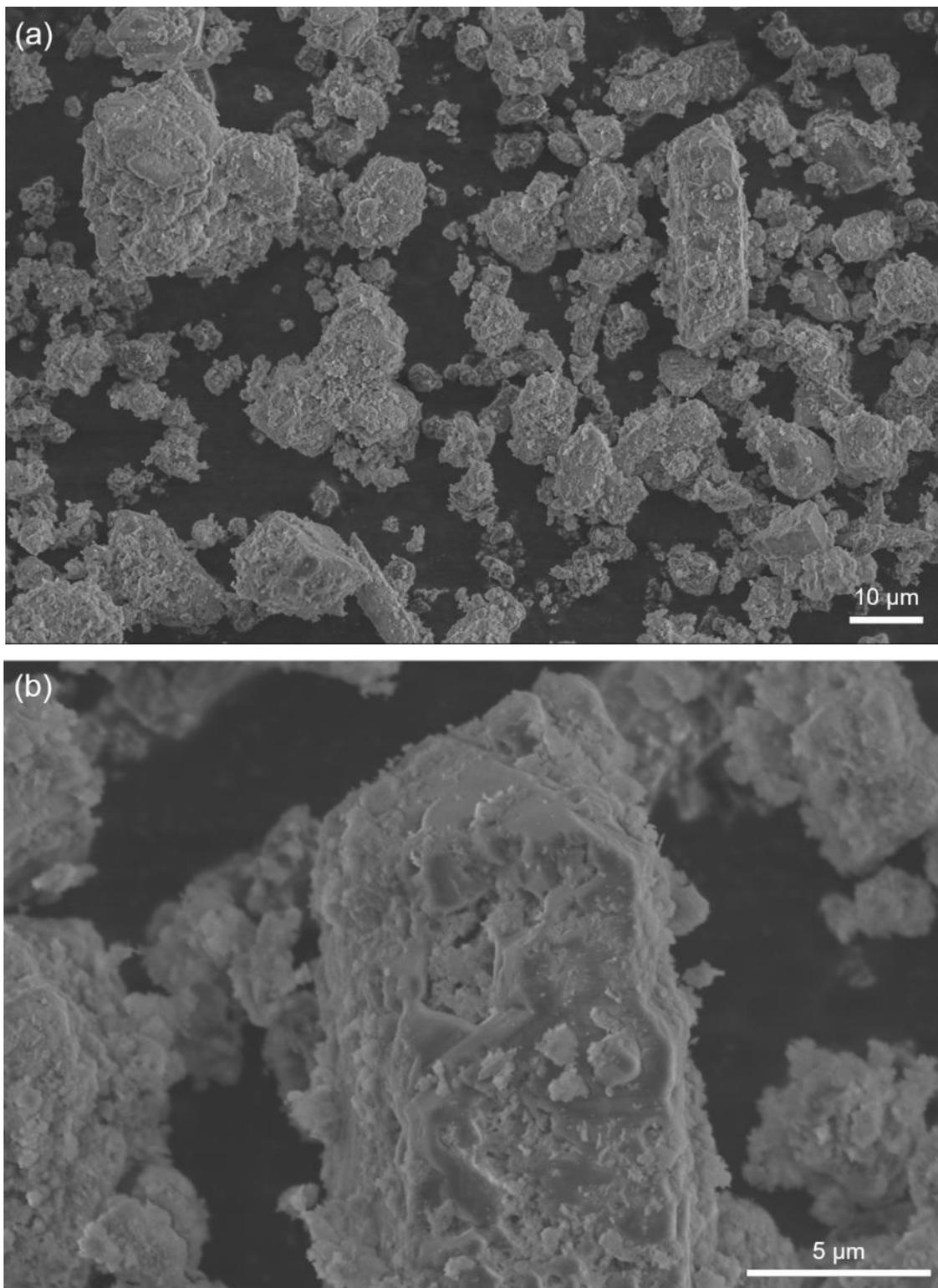
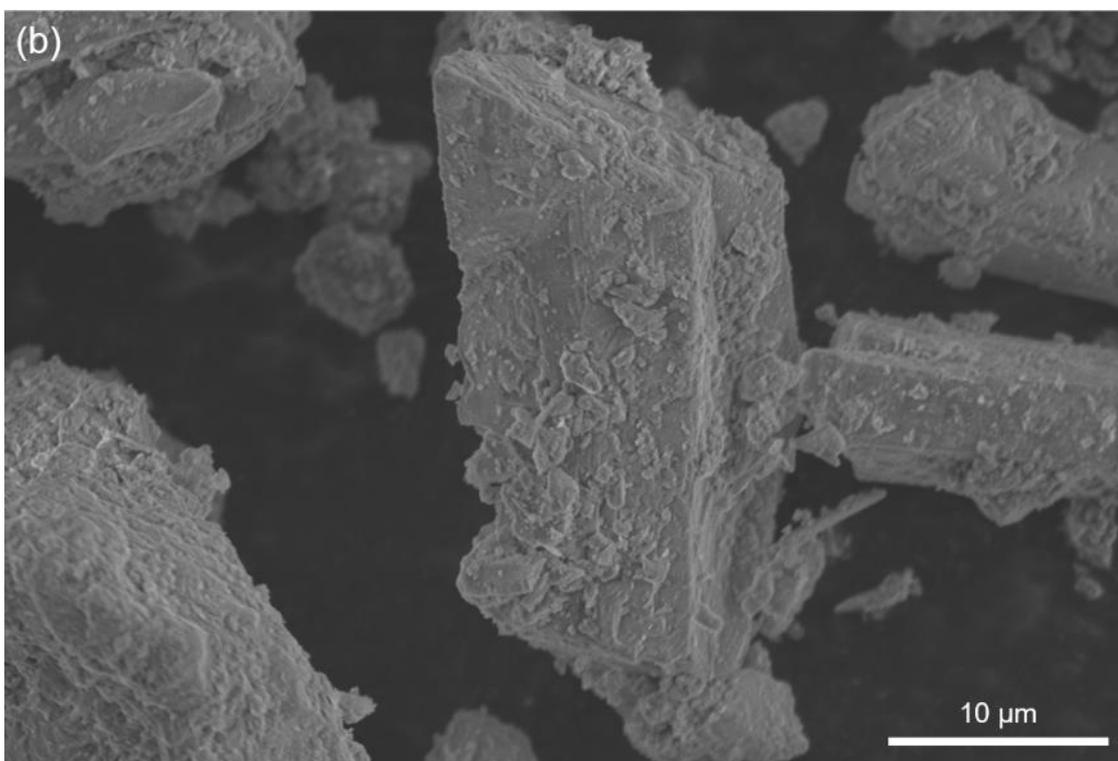
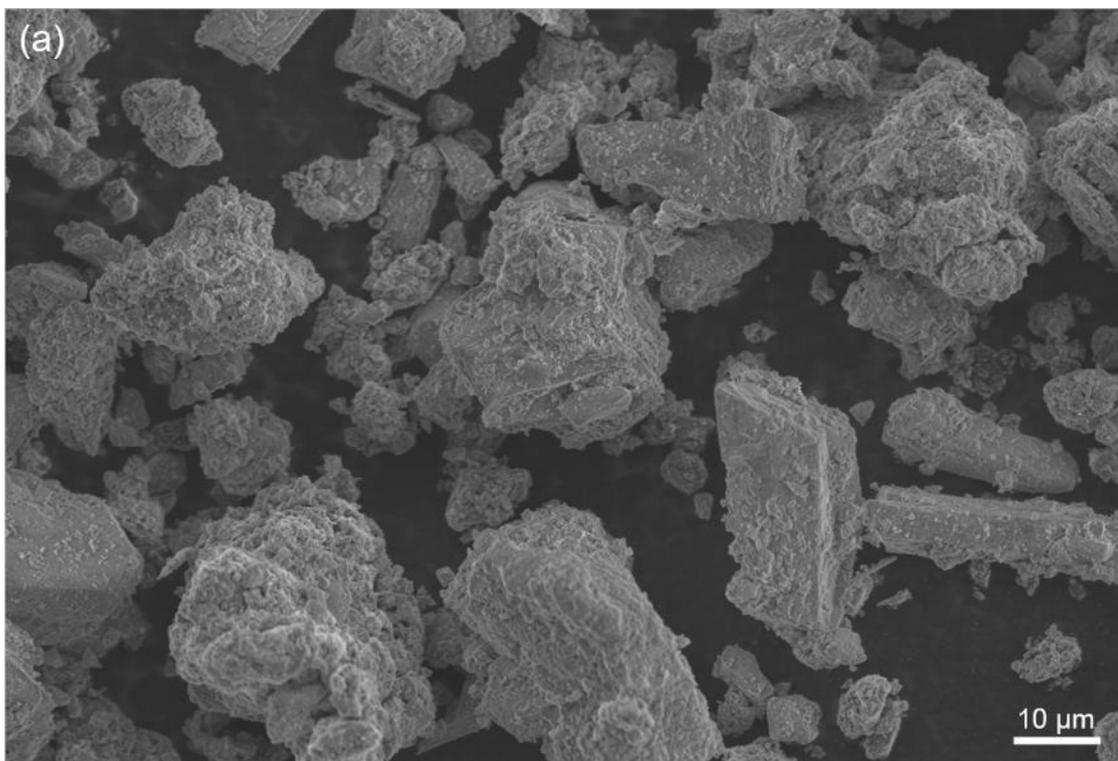


Figura 2. 4 - Microscopia eletrônica de varredura da rocha fosfática Registro mostrando as características das superfícies das partículas (a) aumento de 1000 vezes e (b) 2500 vezes.



2.4 SOLUBILIZAÇÃO MICROBIANA DE P DAS ROCHAS FOSFÁTICAS

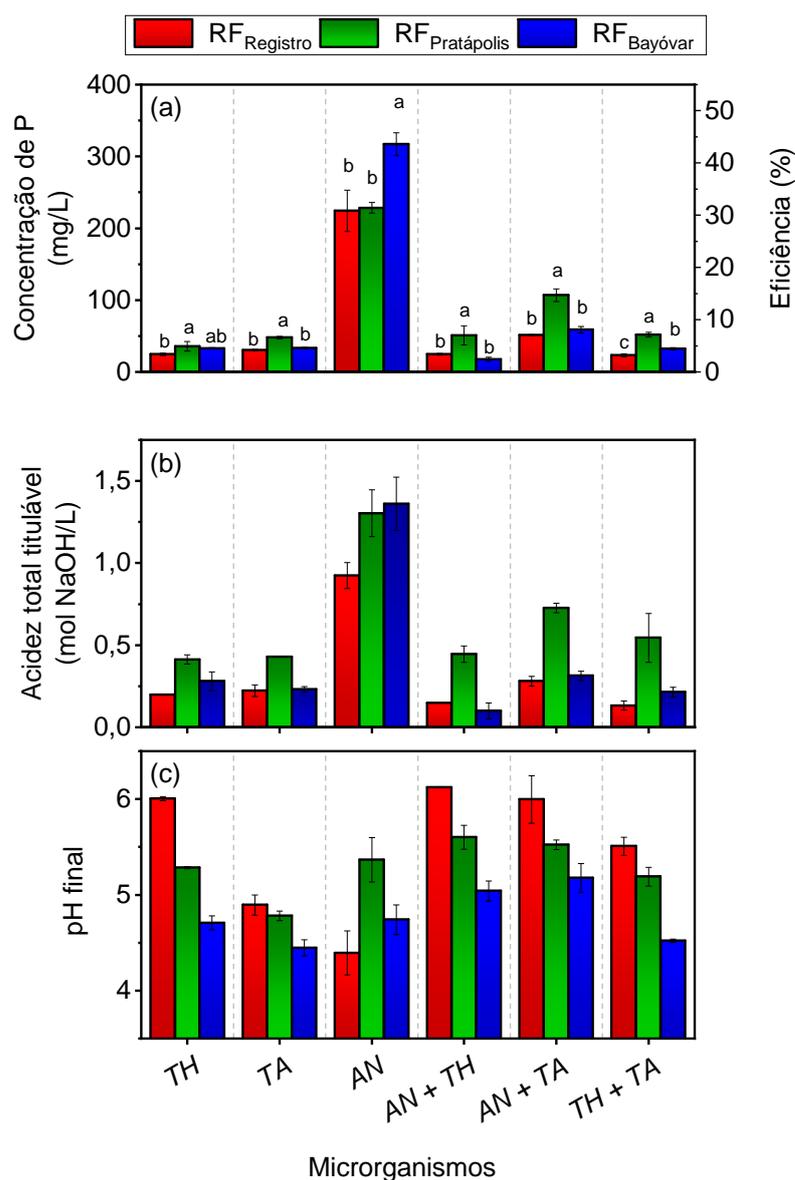
O potencial de solubilização biológica de P foi avaliado utilizando cepas de *Aspergillus niger*, *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma asperelloides* de forma isolada e em co-cultivo, nas três diferentes rochas fosfáticas (RF_{Registro}, RF_{Pratápolis} e RF_{Bayóvar}). Para a padronização dos experimentos, foi adicionada a mesma quantidade de P em todos os cultivos. Os resultados obtidos de quantidade de P solubilizado, eficiência da solubilização, acidez total titulável e pH final do cultivo estão descritos na Figura 2.5.

Pode-se observar que o *A. niger* foi o mais eficiente dos fungos em promover a solubilização biológica do P presente nas três diferentes RFs. A concentração de P solubilizado por esse microrganismo foi aproximadamente 7,5 vezes maior que as obtidas com as cepas de *Trichoderma*, e também foi superior aos cultivos com as co-culturas dos microrganismos.

Para o cultivo isolado de *A. niger*, observou-se que uma diferença estatística significativa na solubilização do P contido na rocha RF_{Bayóvar}, sendo superior aos valores obtidos para as rochas RF_{Pratápolis} e RF_{Registro}. A acidez total titulável produzido pelo *A. niger* foi superior à quantidade produzida pelas cepas de *Trichoderma*, indicando que o mecanismo de solubilização do P por *A. niger* foi devido à acidificação do meio pela produção de ácidos orgânicos. Isso foi evidenciado pela alta correlação de Pearson entre acidez total titulável e a concentração de P ($r = 0,94$, Figura 2.6).

O padrão de produção de ácidos orgânicos é específico para cada isolado de fungo. *Aspergillus* é conhecido por sua alta capacidade de produção de ácidos orgânicos, especialmente os ácidos cítrico, oxálico e glucônico, que desempenham papéis fundamentais na solubilização de fosfato (CHUANG et al., 2007; KLAIC et al., 2018b; MENDES et al., 2014; REYES et al., 2001).

Figura 2. 5 - Solubilização biológica das rochas fosfáticas utilizando inoculações de microrganismos isolados e combinados. (a) quantidade de P solubilizado e eficiência de solubilização; (b) acidez titulável; (c) pH final do cultivo. Os experimentos foram realizados em cultivo submerso com os pós de rocha fosfática em meio de cultura PKV (pH inicial 7,0), 30 °C e 220 rpm por 120 h. Os cultivos foram inoculado e co-inoculado com *Aspergillus niger* (AN), *Trichoderma harzianum* (TH) e *Trichoderma asperelloides* (TA).

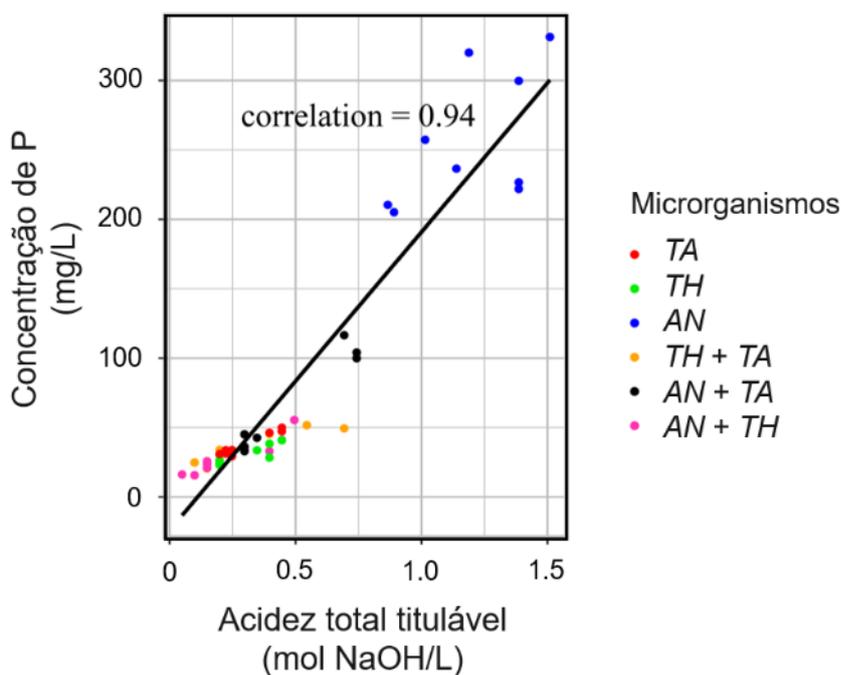


*Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey (nível de confiança de 95%) para diferentes rochas fosfáticas, mas os mesmos microrganismos.

Mesmo a RF_{Bayóvar} tendo sido utilizada como um controle positivo, pois já havia passado por um processo físico (moagem) para aumento da solubilidade

através do aumento área superficial (PLOTTEGHER, 2014) e favorecimento do acesso dos microrganismos aos minerais, com exceção do cultivo com *A. niger* isolado, os cultivos na presença das cepas de *Trichoderma* (*T. harzianum* e *T. asperelloides*), incluindo os cultivos com co-inoculação, apresentaram diferenças estatísticas significativas e maior solubilização da RF_{Pratápolis} (Figura 2.5). A maior solubilização dessa rocha pode ser explicada devido as suas características morfológicas e químicas abordadas anteriormente. A RF_{Pratápolis} possui maior área superficial e maiores tamanhos de poros do que a RF_{Registro}, o que facilita o acesso dos microrganismos aos minerais. E como a quantidade inicial de P foi padronizada, a solubilização das rochas ficou dependente das características físico-químicas desses minerais.

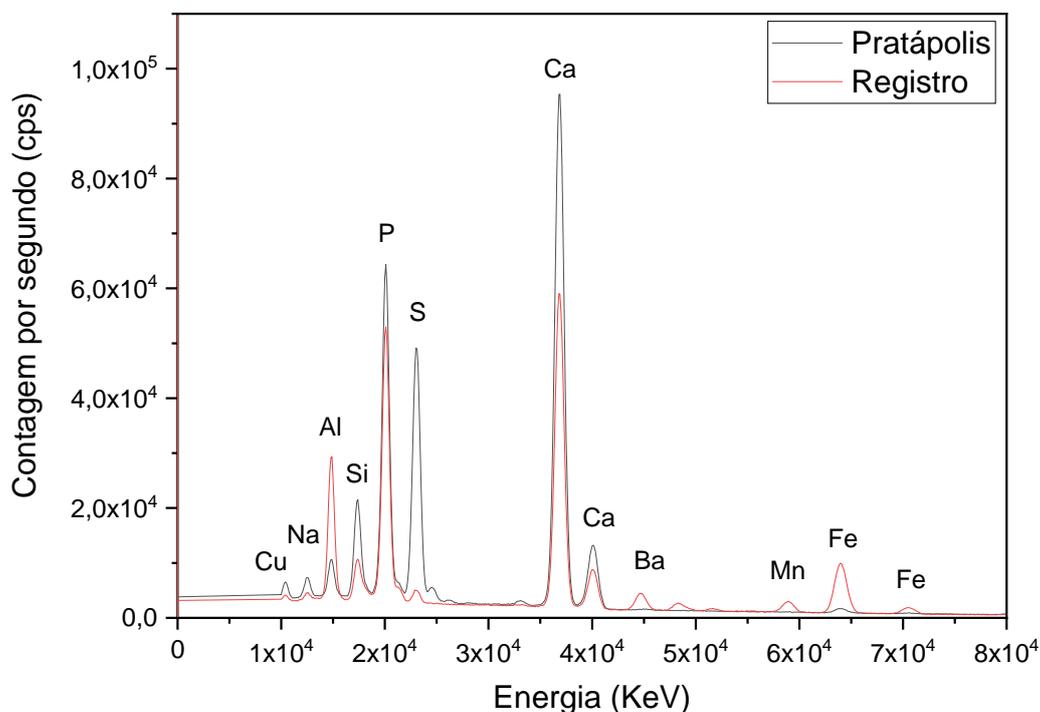
Figura 2. 6 - Correlação estatística de Pearson entre a concentração de P e acidez total titulável para os cultivos submersos usando a rocha em pó.



Os menores valores de solubilização, que foram encontrados para a RF_{Registro}, possivelmente estão relacionados aos menores tamanhos de área superficial, a sua estrutura mais compacta e a presença de maiores quantidades de Fe₂O₃ (14,1%) e MnO (1,69%), dados apresentados na Tabela 2.1. Outra forma de comprovação da superioridade da presença de elementos como Fe, Al e Mn na amostra de RF_{Registro} foram os resultados da espectroscopia por energia dispersiva (EDS- Energy

Dispersive Spectroscopy), apresentados na Figura 2.7. Sabe-se que elementos como Fe, Mn, Cu e Zn, mesmo que liberados em pequenas quantidades no meio, podem afetar negativamente a capacidade dos microrganismos de produzir ácidos orgânicos (GADD, 1999; PAPAGIANNI, 2007) e, conseqüentemente, afetar a capacidade de solubilização do P. Esses efeitos ficam evidenciados nas Figuras 2.5b e 2.5c, onde observa-se valores de acidez total titulável inferiores no cultivo da RF_{Registro} e pH final de cultivo, normalmente superiores aos cultivos com as demais rochas.

Figura 2. 7 - Espectro de EDS das rochas fosfáticas brasileiras Pratápolis e Registro.



Nos experimentos de co-cultivo, o tratamento que apresentou maior solubilização de fósforo foi a combinação das cepas de *A. niger* e *T. asperelloides*, utilizando a RF_{Pratápolis} (Figura 2.5a), com uma eficiência de $15,8 \pm 1,28\%$. A eficiência de solubilização da mesma rocha, com o *T. asperelloides* isolado foi metade ($7,07 \pm 0,28\%$) da eficiência do co-cultivo. E o cultivo com *A. niger* isolado foi o aproximadamente o dobro ($33,79 \pm 1,10\%$) da eficiência do co-cultivo. Esses resultados sugerem que ambas as cepas têm capacidade de crescimento sinérgico,

sendo a redução da solubilização de P no co-cultivo pode ser explicada pela competição por nutrientes e espaço e consequente redução da produção de ácidos orgânicos pelo *A. niger*.

A ação sinérgica das cepas de fungos do gênero *Aspergillus* e *Trichoderma* foi demonstrada para a produção de várias enzimas, resultando em degradação mais eficiente de materiais lignocelulósicos (FLORENCIO et al., 2016; MAEHARA et al., 2018; RABELLO et al., 2014; WANG et al., 2015). No entanto, até onde sabemos, não há estudos publicados que avaliem a ação desses microrganismos combinados em produtos utilizados na agricultura.

Com esses resultados foi possível selecionar as cepas que atuaram de forma mais sinérgica em co-cultivo (*A. niger* e *T. asperelloides*) e, dentre as duas rochas brasileiras avaliadas (Pratápolis e Registro) para seleção e utilização no desenvolvimento do grânulo biofertilizante, a RF_{Pratápolis} apresentou propriedades mais favoráveis de solubilização devido as suas características físico-químicas.

3. CONCLUSÕES

- As características físico-químicas das rochas têm influência direta na solubilização do P presente.
- A correlação estatística de Pearson de 0,94 mostrou que a solubilização do P no cultivo submerso das rochas em pó é explicada pela produção de ácidos orgânicos.
- *Aspergillus niger* foi o fungo com maior capacidade de produção de ácidos orgânicos e conseqüentemente maior solubilizador das rochas fosfáticas avaliadas.
- A RF_{Pratápolis} se mostrou a melhor opção para utilização no estudo da produção dos biofertilizantes devido as suas características físico-químicas e a possibilidade do crescimento sinérgico do combinado de *A. niger* com o *T. asperelloides*.
- Os microrganismos escolhidos para a continuação dos estudos de forma isolada e combinada foram o *A. niger* com o *T. asperelloides*.

CAPÍTULO 3

Produção do grânulo biofertilizante com amido, rocha fosfática e microrganismos e avaliação de sua solubilização por cultivo submerso

1. INTRODUÇÃO

Na última década, a importância da interação microrganismos-plantas cada vez mais tem sido alvo de estudos. Os microrganismos rizosféricos desempenham funções essenciais como fornecimento de macro e micronutrientes, além de colaborar com a retenção de água do solo (QIU et al., 2019b). A utilização dos microrganismos na agricultura tem se mostrado uma ferramenta importante para promover a saúde e a produtividade das culturas de forma mais sustentável. Os microrganismos podem ser utilizados em cepas puras ou em consórcios, sendo a associação dos microrganismos bastante interessante visto que no solo, diversas espécies crescem em conjunto. Portanto, entender a ação dos microrganismos isolados e combinados é bastante importante para entender seus mecanismos de ação e gerar produtos de maior qualidade.

Dentro desse aspecto, vale ressaltar que as cepas escolhidas para estudo nesse trabalho foram o *A. niger*, microrganismo bastante conhecido pela sua capacidade de produção de ácidos orgânicos e capacidade de solubilização de fosfato, e a cepa de *T. asperelloides*. O gênero *Trichoderma* é bastante conhecido pela sua capacidade de controle biológico e promoção de crescimento em plantas. Segundo a Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico (ABCBio), o mercado de bio defensivos no Brasil em 2020 foi de R\$1,179 bilhões, um crescimento de 70% em relação a 2019. No contexto mundial, o mercado de produtos biológicos está entre as indústrias de crescimento mais rápido globalmente, com uma taxa de crescimento anual estimada entre de 15% (MARKETS AND MARKETS, 2020).

Diante do potencial desse mercado, o estudo de novas formulações, metodologias para produção dos microrganismos e desenvolvimento

tecnológico para a produção de produtos biológicos se faz necessária. Uma das maiores dificuldades desse segmento é de manter a viabilidade do produto biológico, o que muitas vezes dificulta a produção e comercialização devido ao baixo tempo de prateleira. Para superar essa barreira algumas estratégias como o aprisionamento dos microrganismos em uma matriz estão sendo estudados.

O fungo *Fusarium oxysporum* é um patógeno hemibiotrófico habitante do solo, que reduz a produtividade o tomateiro em casa de vegetação e no campo. Esse patógeno atinge os vasos do xilema, induzindo ao murchamento progressivo e, eventualmente, à morte da planta (HERRERA-TÉLLEZ et al., 2019). A utilização de métodos químicos para o controle desse patógeno pode causar danos ao meio ambiente (HERRERA-TÉLLEZ et al., 2019) e apresenta baixa eficiência. Nesse contexto, o controle biológico se mostra uma estratégia promissora pela sua capacidade de atuação específica, por não gerar resistência nos patógenos e não contaminar o meio ambiente.

Este capítulo visa obter um grânulo biofertilizante contendo rocha fosfática, amido e os microrganismos (*A. niger* e *T. asperelloides*) isolados e combinados para entender o potencial de solubilização do P da RF no grânulo e o comportamento dos microrganismos no controle biológico *Fusarium oxysporum in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ROCHA FOSFÁTICA

A rocha fosfática de Pratápolis ($RF_{Pratápolis}$) foi selecionada para a utilização na produção dos grânulos biofertilizantes, como descrito no Capítulo 2. Essa rocha, originária do Brasil, foi gentilmente doada pela Nutrisafra Fertilizantes Ltda. (Cosmópolis, São Paulo, Brasil). Para sua utilização, a rocha passou pelo processo de secagem a 80 °C por 24 h em estufa com circulação de ar e posteriormente foi peneirada para padronização do tamanho de partícula (<500 μm).

2.2 MICRORGANISMOS

Os microrganismos selecionados para a produção dos biofertilizantes foram o *Trichoderma asperelloides* LQC-96 e o *Aspergillus niger* C (BRMCTAA 82). A cepa de *T. asperelloides* foi obtida da Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA) da Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna, São Paulo, Brasil). O isolado de *A. niger* foi obtido na Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro, Brasil). Os microrganismos foram armazenados a - 80 °C em uma solução de glicerol (30% em massa) e NaCl (0,9% em massa). Ambos os fungos foram reativados em ágar batata dextrose (PDA) (Acumedia, EUA). A cepa de *T. asperelloides* cresceu a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 h por 7 dias, e o *A. niger* cresceu a 30 ± 2 °C por 6 dias. Os esporos foram retirados através da raspagem da placa com solução esterilizada de Tween 80 (0,5% v/v) em água destilada para utilização na CES para a produção massal dos microrganismos. A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer. O *Fusarium oxysporum*, utilizado nos bioensaios de antagonismo *in vitro*, foi fornecido pela ESALQ/USP (Piracicaba, São Paulo, Brasil).

2.3 PRODUÇÃO MASSAL DOS MICRORGANISMOS

Para a produção do grânulo de biofertilizante foi necessário grandes quantidades de esporos dos microrganismos. A partir do cultivo em placa de

Petri foi realizada o cultivo em estado sólido (CES) em grãos de arroz (MASCARIN et al., 2019; VIMAL et al., 2017). Os esporos de *T. asperelloides* e de *A. niger* foram produzidos em sacos de polipropileno (23 x 40 cm) com grãos de arroz parboilizado, classe longo fino, tipo 1 (marca Qualidade). Para a produção do *T. asperelloides*, 200 g de arroz seco foram imersos em 400 mL de água por 30 min. Para o cultivo de *A. niger* a mesma quantidade de arroz foi imersa em água, porém por 5 min. O excesso de água foi removido utilizando uma peneira e o substrato foi autoclavado (121 °C por 20 min). Uma suspensão de conídios ($1,2 \times 10^7$ esporos/g_{arroz seco}) foi adicionada ao arroz esterilizado e incubado por 7 dias a 28 °C sob fotoperíodo de 12 h (12 h escuro /12 h de luz) para *T. asperelloides* e a 30 °C para *A. niger* sem fotoperíodo, também por 7 dias. Os sacos de polipropileno foram agitados todos os dias durante o CES. Após 7 dias, os esporos foram recuperados dos grãos de arroz em uma solução Tween 80 (1%), colocada em Erlenmeyer de 1L (aproximadamente 250 mL de solução para cada 100 g de arroz cultivado) em shaker a 25 °C, 300 rpm por 30 min. A suspensão de esporos foi separada do arroz através da utilização de gazes estéreis. Para concentrar os esporos, reduzindo a quantidade de água, foi utilizado o processo de centrifugação a 12000 rpm, 20 min, 15 °C. A partir da suspensão concentrada foi realizada uma diluição seriada para a contagem de conídios, realizada em câmara de Neubauer. Essa suspensão concentrada foi utilizada para a produção do grânulo biofertilizante.

2.4 PRODUÇÃO DOS GRÂNULOS BIOFERTILIZANTES COM AMIDO

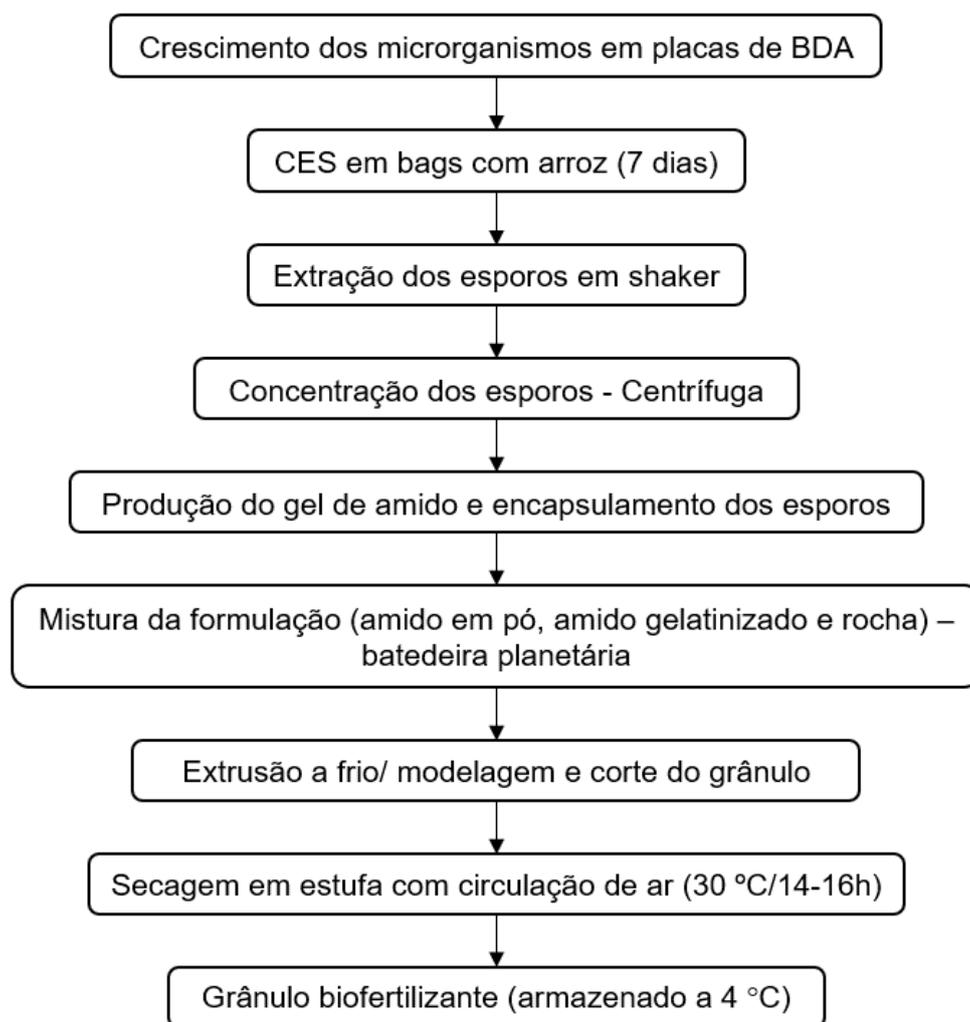
Baseado no processo de produção dos compósitos em gel de amido descrito por Klaic et al. (2018), buscou-se realizar a produção em grânulos por extrusão a frio para transformar a produção dos grânulos biofertilizantes escalonável. Para isso, diversos testes experimentais foram realizados para a definição da formulação e do processo de produção massal dos microrganismos. Um dos desafios encontrados foi o ajuste da quantidade de água adicionada no processo. Era sabido que para um bom crescimento do microrganismo presente no grânulo era necessário que a formulação possuísse pelo menos 30% de fonte de carbono. Porém, o amido a ser adicionado não poderia ser proveniente somente do gel, pois a quantidade de água na formulação seria excessiva, não sendo possível passar a massa pelo processo

de extrusão. Sendo assim, diversos testes foram realizados para a definição da formulação e das condições de produção dos microrganismos. As condições estabelecidas estão apresentadas a seguir.

As etapas da produção de grânulos biofertilizantes com amido estão descritas na Figura 3.1. O grânulo foi preparado contendo 70% de rocha fosfática Pratápolis e 30% de amido, em massa seca (amido de milho Amidex 3001, consistindo de 70% de amilopectina e 30% de amilose). Uma fração de 5% desse amido foi usada para produzir o gel de amido (matriz) onde os esporos foram encapsulados. O processo de gelatinização foi uma adaptação do procedimento descrito por Giroto et al. (2014). Uma solução contendo 15% de amido, 5% de glicerol e 80% de água destilada foi preparada sob agitação, seguindo as seguintes etapas: (a) dispersão do amido e glicerol em água à temperatura ambiente, por 10 min; (b) processo de gelatinização sob agitação vigorosa a 90 °C por 30 min (formação de um gel pegajoso); (c) redução da temperatura para 30 - 40 °C; (d) adição da suspensão concentrada de esporos (1×10^9 esporos/g_{amido total} presente nos grânulos) sob agitação, por 10 min.

Com os esporos encapsulados na matriz de amido, o gel foi adicionado à fração sólida em pó da formulação (rocha e amido) e homogeneizado em um misturador planetário Gatromaq BP-05 (G. Paniz, Brasil). A modulação da massa foi realizada a partir de uma extrusora manual, onde obteve-se grânulos biofertilizantes cilíndricos com aproximadamente 5 mm de comprimento e 9 mm de espessura. Foi retirada a umidade do biofertilizante extrusado sob estufa de circulação de ar a 30 °C por 14 - 16 h, após, os grânulos foram armazenados a 4 °C, no escuro, até que os experimentos de solubilização, antagonismo *in vitro* e viabilidade. Todos os grânulos compostos foram preparados usando este procedimento. As diferentes proporções de inóculo (*A. niger* e *T. asperelloides*) são mostradas na Tabela 3.1.

Figura 3. 1 - Fluxograma da produção dos grânulos biofertilizantes contendo amido em pó, rocha fosfática Pratápolis e esporos de microrganismos encapsulados em gel de amido.



Os grânulos do biofertilizante foram caracterizados por meio de microtomografia de raios X (MicroCt) (Modelo 1172, SkyScan) para observar a dispersão dos materiais e validar o processo de produção. As amostras granulares compostas foram colocadas em um suporte giratório e as imagens foram capturadas usando uma etapa de rotação de 0,2°, rotação de 180° e média de cinco quadros. As imagens foram reconstruídas a partir dos cortes tomográficos com o software NRecon (SkyScan).

Tabela 3. 1 - Quantidades inoculadas de *Aspergillus niger* e *Trichoderma asperelloides* nos grânulos biofertilizantes produzidos com rocha fosfática de Pratápolis.

Grânulo biofertilizante (GB)		<i>A. niger</i> *	<i>T. asperelloides</i> *
Inóculo	Nomenclatura		
Sem microrganismo (controle)	GB _{Control}	-	-
<i>A. niger</i>	GB _{AN}	10 ⁹	-
<i>T. asperelloides</i>	GB _{TA}	-	10 ⁹
<i>A. niger</i> (50%) e <i>T. asperelloides</i> (50%)	GB ^(1:1) _{AN+TA}	5 × 10 ⁸	5 × 10 ⁸
<i>A. niger</i> (75%) e <i>T. asperelloides</i> (25%)	GB ^(3:1) _{AN+TA}	7,5 × 10 ⁸	2,5 × 10 ⁸
<i>A. niger</i> (25%) e <i>T. asperelloides</i> (75%)	GB ^(1:3) _{AN+TA}	2,5 × 10 ⁸	7,5 × 10 ⁸

* Quantidade de esporos/g_{amido total} do biofertilizante. Formulação dos grânulos biofertilizantes: 70% de RF_{Pratápolis} e 30% de amido, resultando em uma concentração de P₂O₅ de 12,46%.

As imagens do crescimento dos microrganismos nos grânulos crescidos em placas de petri com BDA foram tiradas com câmera digital (Canon EOS Rebel T3i). A avaliação microscópica das hifas/crescimento do *A. niger* e do *T. asperelloides* foi realizada em microscópio biológico óptico Bel, modelo Solaris T, com câmara USB Eureka 5.0 trinocular. Cinco aliquotas de 15 µL de suspensão de esporos de *T. asperelloides* e *A.niger* foram colocadas para crescer em placa de petri com BDA a 28 °C e a 30 °C, respectivamente. Após 16 h foi adicionado uma gota de azul de lactofenol (aproximadamente 8 µL) em cada ponto e analisado no microscópio. O azul de lactofenol foi produzido com 20 g de fenol; 20 g de ácido láctico; 20 g de água destilada; 40 g de glicerol; 0,1g de azul de algodão (ou azul de metila) homogeneizado em capela de exaustão de gases com agitador magnético por 10 min.

2.5 VIABILIDADE DOS GRÂNULOS BIOFERTILIZANTES

A viabilidade dos fungos nos grânulos foi determinada pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Os grânulos biofertilizantes foram armazenados em sacos plásticos no escuro, a temperatura de 4 °C. A determinação da viabilidade dos grânulos biofertilizantes foi realizada de acordo com a adaptação da metodologia descrita por Pinto; Lucon; Bettiol, (2019). A viabilidade foi analisada logo após a produção e depois em 6 e 12

meses de armazenamento. 10 g dos biofertilizantes foram adicionados em Erlenmeyer de 250 mL com 90 mL de água destilada autoclavada. Os biofertilizantes granulares foram solubilizados em shaker por 2 h a 250 rpm. Foi realizada uma diluição seriada e 100 µL foram adicionados a placas de petri com BDA + Triton X-100 (reduzidor de colônias). As placas foram incubadas a temperatura de 28 °C por 48 h e então foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC).

2.6 SOLUBILIZAÇÃO DOS GRÂNULOS BIOFERTILIZANTES EM CULTIVO SUBMERSO (CSm)

Para fins de comparação, assim como nos cultivos com as rochas em pó, foram adicionados, em massa de biofertilizante, a quantidade de 670 mg/L de P ao meio de cultivo. O meio nutriente de cultivo utilizado foi o meio PKV (PIKVOSKAYA, 1948), com a composição: glicose (1%); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,5%); NaCl (0,2%); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1%); KCl (0,2%); $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,002%); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,002%); extrato de levedura (0,5%). O pH do meio de cultura foi ajustado para 7,0 e esterilizado. Todos os materiais utilizados no cultivo e o meio de cultivo foram autoclavados a 121 °C por 20-30 min e a pressão de 1 atm. Foi avaliado o perfil temporal de solubilização do P presente nos grânulos por CSm. O experimento foi realizado por 7 dias em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 50 ml de meio de cultivo PKV. Após a finalização do cultivo, o meio foi filtrado utilizando bomba de vácuo com papel de filtro Whatman n° 1, e posteriormente centrifugado a 7000 rpm por 20 min, a 20 °C. O sobrenadante coletado foi utilizado para quantificação do pH final, acidez total titulável e fósforo solúvel liberado. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, com cálculo da média e desvio padrão.

2.7 INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL *IN VITRO* DE *Fusarium oxysporum* por *T. asperelloides* E *A. niger* CONTIDO NOS GRÂNULOS BIOFERTILIZANTES

Foram avaliados os efeitos do *T. asperelloides* e do *A. niger*, contidos nos biofertilizantes armazenados por 100 dias, no crescimento micelial de *F. oxysporum*. Os grânulos biofertilizantes foram colocados diametralmente

opostos ao disco (0,8 cm de diâmetro) de *F. oxysporum* em placa de Petri de 9 cm contendo meio BDA. As imagens do crescimento do confronto dos microrganismos foram tiradas com câmera digital (Canon EOS Rebel T3i) após 2, 5, 6 e 9 dias de incubação em câmara de crescimento a 28 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12h (12h claro/12h escuro).

2.8 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.8.1 Determinação do pH e acidez total titulável

O pH final da cultura foi determinado em um medidor de pH (PG1800, Gehaka, Brasil). Para a determinação da acidez total foi titulado 20 mL do sobrenadante com uma solução de hidróxido de sódio (1M) e fenolftaleína como indicador (MAPA, 2013). A acidez total determina a concentração total de espécies ácidas em uma fração do extrato do meio de cultura, onde os resultados são expressos em mol de NaOH/L.

2.8.2 Determinação de fósforo solúvel

O teor de fósforo solúvel foi determinado pelo método colorimétrico adaptado de Murphy e Riley (1962) no qual a amostra reage com solução de ácido ascórbico ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$), ácido cítrico ($0,03 \text{ mol L}^{-1}$) e um reagente composto por solução de ácido sulfúrico ($4,7 \text{ mol L}^{-1}$), solução de molibdato de amônio e antimônio ($0,08 \text{ mol L}^{-1}$) e solução de tartarato de potássio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$). Esta mistura reagiu a 50°C durante 15 minutos, formando um complexo azul. A concentração do complexo foi determinada por espectrometria UV-Vis em 880 nm em espectrofotômetro de Microplaca Epoch 2 (BioTek, EUA).

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações entre os teores de P solubilizado foram realizados por análise de variância e o teste de comparações múltiplas de Tukey ou de Kruskal-Wallis em casos de heterogeneidade de variância (verificada pelo teste de Bartlett). Correlações de Pearson foram calculadas entre os teores de P, acidez total titulável. O nível de significância adotado foi de 5% e o software utilizado foi o R versão 4.0.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PRODUÇÃO DOS GRÂNULOS BIOFERTILIZANTES

O biofertilizante granulado foi desenvolvido a fim de combinar as habilidades dos microrganismos de solubilização de fósforo, biocontrole de patógenos e promoção de crescimento das plantas, usando um processo de extrusão a frio com rocha fosfática e amido. Para a produção desse compósito foi necessário grandes quantidades de microrganismos. Para isso, foram realizados o cultivo em estado sólido dos microrganismos, extração e concentração dos esporos (Figura 3.2). Posteriormente à extração e adição dos esporos no gel de amido e produção da massa do biofertilizante, a massa foi modulada pela extrusão a frio e realizou-se o corte dos grânulos, como ilustrado na Figura 3.2.

A Figura 3.3a ilustra o processo de produção e a caracterização dos grânulos pela tomografia de raios X, mostrando que as partículas estavam homogeneamente distribuídas na matriz. As imagens de microscopia óptica (Figura 3.3c) do crescimento dos microrganismos mostraram que o crescimento das hifas de *A. niger* foi concentrado em torno dos grânulos compostos, enquanto o crescimento de *T. asperelloides* foi mais expansivo. O mesmo comportamento foi observado para o crescimento desses microrganismos nos grânulos biofertilizantes. Sendo visível a capacidade do *A. niger* modificar a superfície e crescer mais próximo do biofertilizante, enquanto o crescimento de *T. asperelloides* não modificou as características da superfície do grânulo e seu crescimento se estende ao redor do mesmo (Figura 3.3b). Na combinação dos microrganismos, também foi observado esse comportamento de crescimento, onde o *A. niger* apresenta maior crescimento dentro e ao redor do biofertilizante, enquanto *T. asperelloides* cresceu no meio circundante.

Figura 3. 2 - Imagens do cultivo em estado sólido de *T. asperelloides* em bags com arroz por 7 dias; (b) arroz após extração dos esporos do *T. asperelloides* cultivado; (c) modelagem da massa em extrusão a frio; (d) corte dos grânulos biofertilizantes.

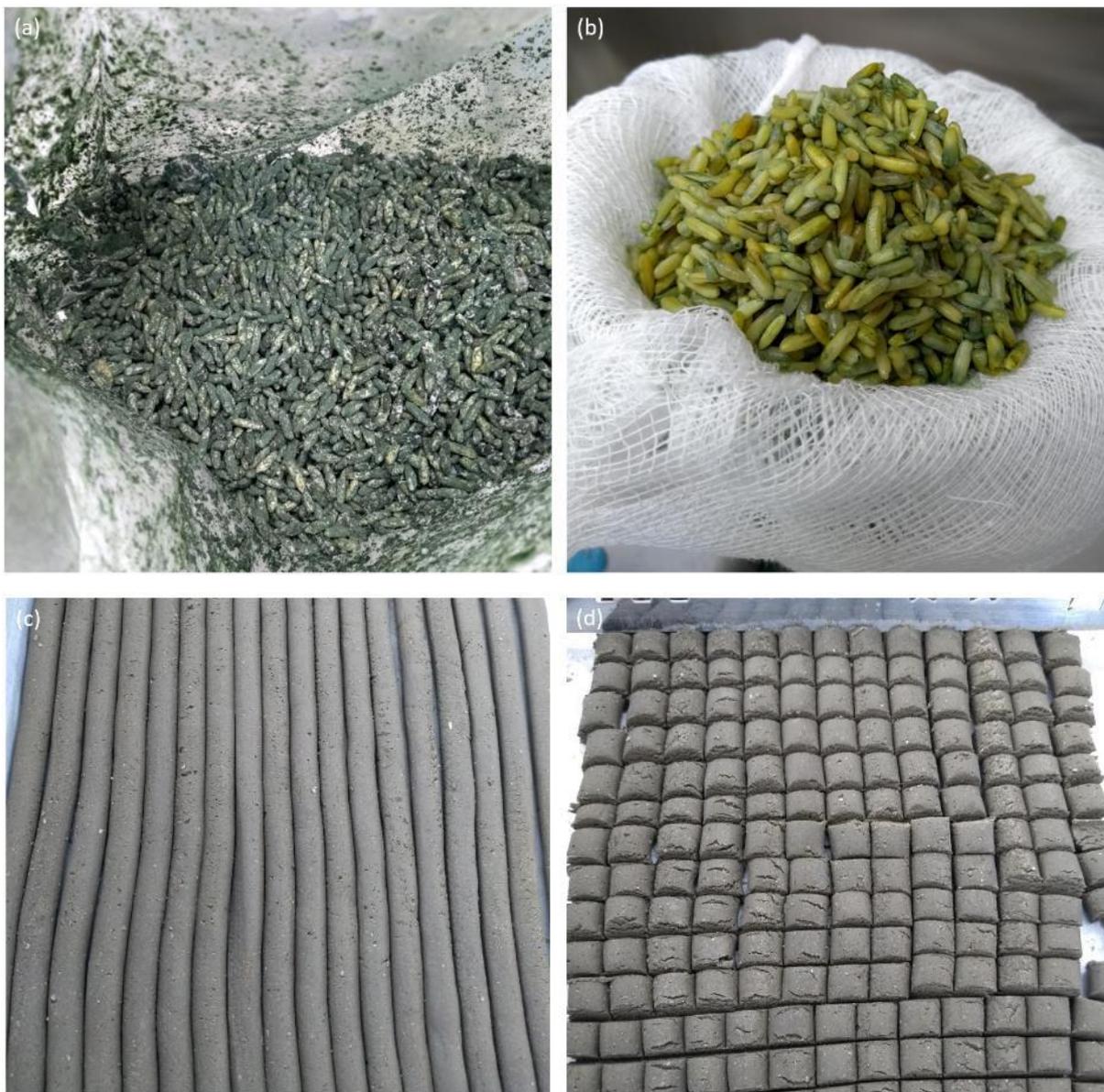
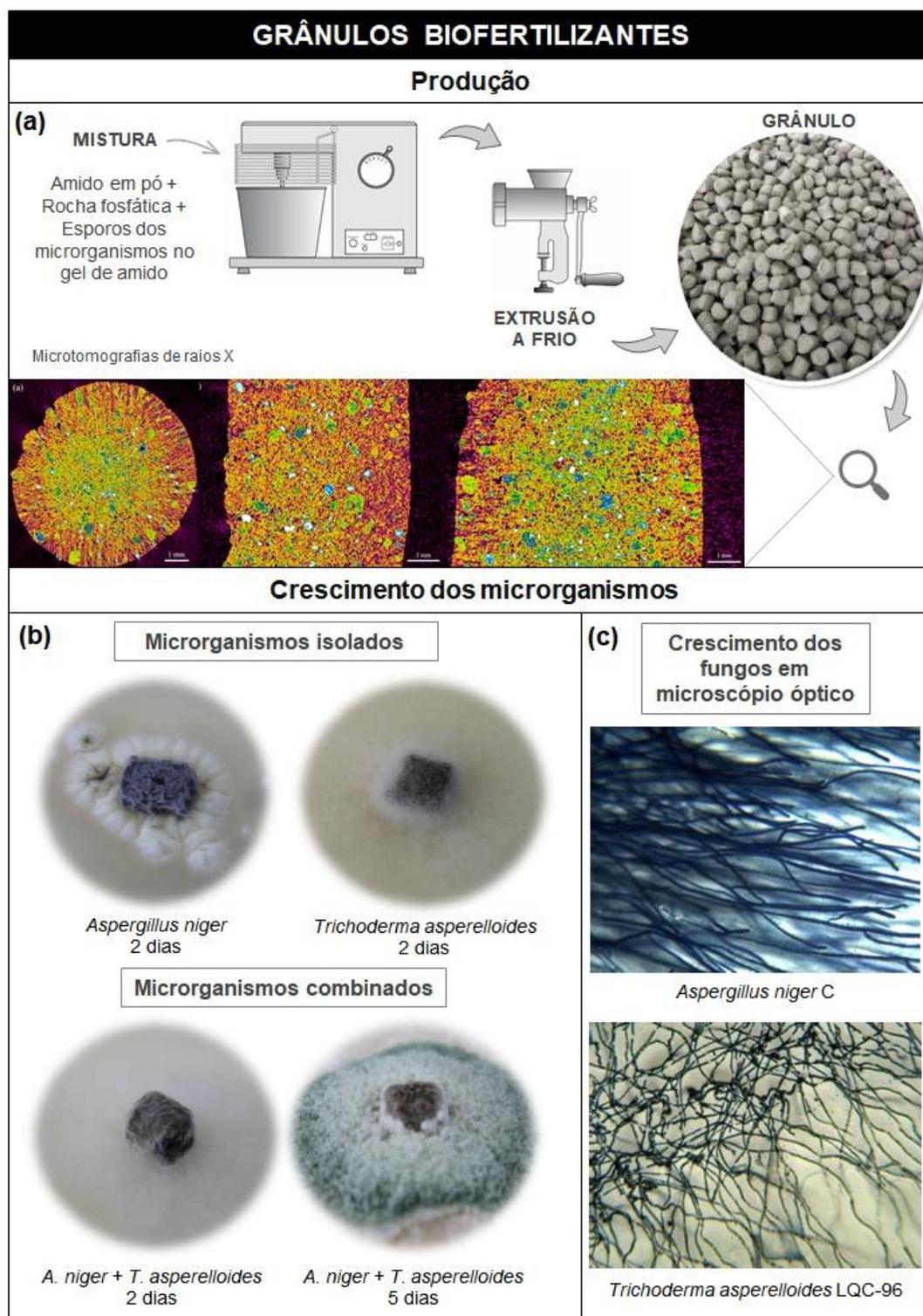


Figura 3. 3 - (a) Ilustração esquemática da produção dos grânulos biofertilizantes, com imagens de microtomografia de raios-X; (b) Crescimento dos microrganismos axênicos e em combinação dos grânulos biofertilizantes em placas de Petri contendo BDA; (c) Imagens de microscopia óptica do crescimento de esporos e hifas de *Aspergillus niger* e *Trichoderma asperelloides*.



3.2 SOLUBILIZAÇÃO BIOLÓGICA DE P PRESENTE NOS GRÂNULOS

Após a produção dos grânulos, foi avaliado o potencial dos microrganismos, isolados e combinados (em diferentes proporções), em promover a solubilização do P da RF_{Pratápolis} integrada na estrutura do grânulo, por cultivo submerso. Os grânulos foram ativados em meio de cultivo em meio PKV e o perfil temporal de solubilização do P foi monitorado durante 168 h. Diferentes formulações de grânulos foram testadas, usando as proporções de esporos de *A. niger* e *T. asperelloides* mostradas na Tabela 3.1. A Figura 3.4 mostra os resultados para os grânulos biofertilizantes (GB) em termos de eficiência de solubilização de P, acidez total titulável e pH do meio.

A ativação microbiológica dos grânulos biofertilizantes potencializou a solubilização da RF e aumentou a disponibilidade de P, em relação ao tratamento controle (GB_{Controle}) sem inoculação. Entre os grânulos inoculados, o grânulo com *A. niger* (GB_{AN}) apresentou a maior eficiência de solubilização de P após 120 h (66,3%, aproximadamente 475 mg P/L). O tratamento GB_{AN} também apresentou a maior acidez titulável no meio, o que resultou na maior redução do pH. Para todos os grânulos, o menor pH foi obtido nas primeiras 24 h, enquanto a acidez total do meio geralmente se manteve constante durante as 168 h de cultivo. Nenhuma diferença significativa na solubilização de P entre 48 e 120 h foi observada para compósitos co-inoculados usando diferentes proporções de *A. niger* e *T. asperelloides* (GB^(1:1)_{TA} + AN, GB^(3:1)_{TA} + AN, e GB^(1:3)_{TA} + AN). Esses resultados indicam que as quantidades desses microrganismos podem variar entre 25 e 75% no grânulo biofertilizante, sem afetar a solubilização do P, que permaneceu em torno de 35-45% após 48 h de cultivo. Sendo assim, para a produção e aplicação do biofertilizante nos experimentos em plantas (Capítulo 4), foi escolhida a combinação do 1:1 de *A. niger* e *T. asperelloides*.

O uso do compósito com *T. asperelloides* (GB_{TA}) também não resultou em nenhuma mudança estatística significativa na solubilização de P após 48 h, com a eficiência permanecendo em torno de 14% (teste de Tukey, nível de confiança de 95%). A aplicação do teste de Pearson resultou em um coeficiente (r) de 0,86 para a correlação entre a concentração de P e a acidez total titulável (Figura 3.5), fornecendo mais evidências de que a solubilização do P foi principalmente devido à produção de ácidos orgânicos pelos microrganismos.

Figura 3. 4 - Perfil temporal da (a) solubilização e eficiência de P; (b) acidez total titulável e (c) pH do cultivo dos grânulos biofertilizantes com diferentes proporções entre o *Aspergillus niger* (AN) e o *Trichoderma asperelloides* (TA) em cultivo submerso a 30 °C, 220 rpm, meio PKV com pH inicial 7,0.

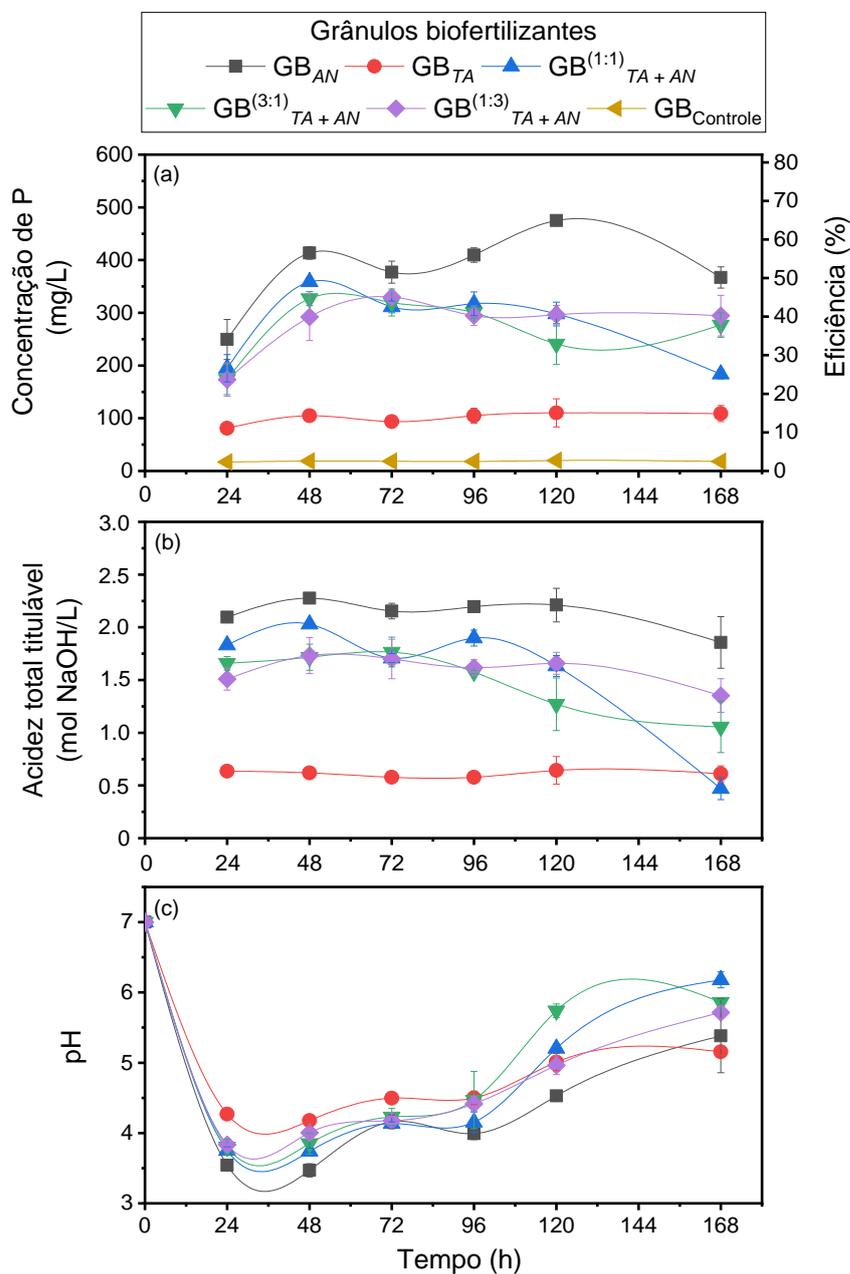
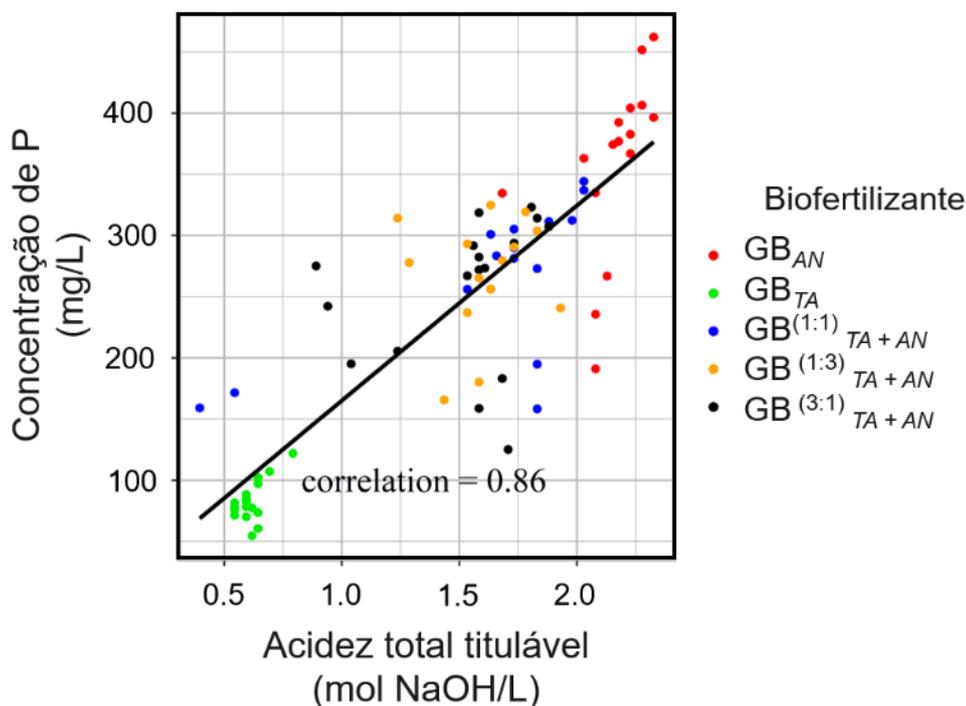
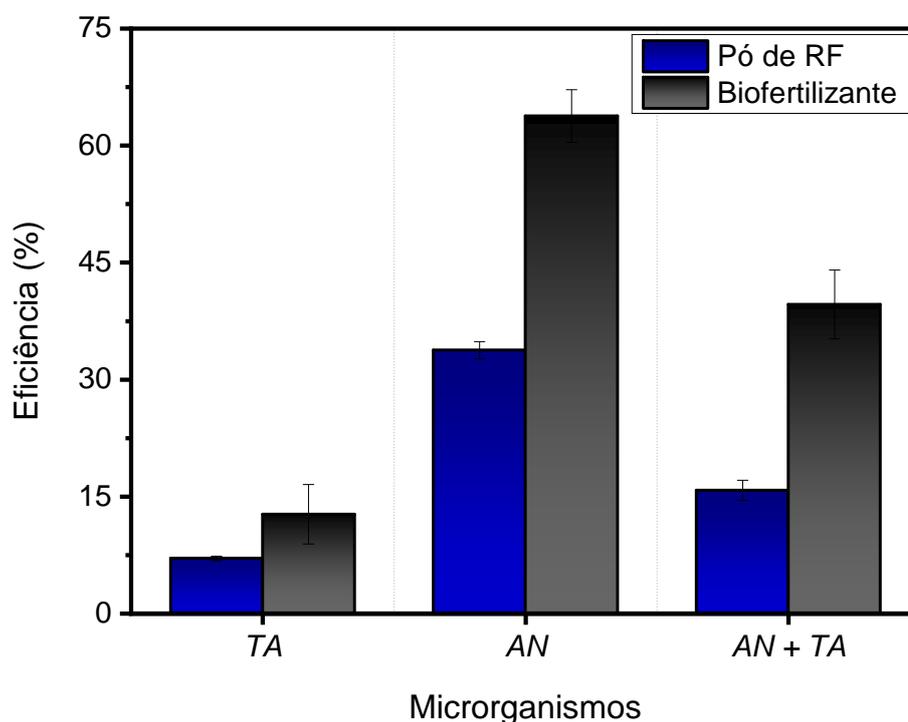


Figura 3. 5 - Correlação estatística de Pearson entre a concentração de P e acidez total titulável para os cultivos submersos de solubilização dos grânulos biofertilizantes.



A Figura 3.6 mostra a comparação da solubilização do P da RF_{Pratápolis} em pó (resultados apresentados no capítulo 2) e dos grânulos biofertilizantes após 120 h de cultivo, revelando uma solubilização significativamente superior do sistema granular. O uso de *A. niger* isolado resultou em um aumento de 89% na solubilização de P da RF no grânulo biofertilizante quando comparado a rocha em pó. O aumento de solubilização de P foi ainda mais expressivo (150%) no co-cultivo do *A. niger* com o *T. asperelloides*. Nenhuma diferença estatisticamente significativa na eficiência de solubilização foi observada entre o co-cultivo do biofertilizante (GB^(1:1)_{TA + AN}) e a cultura com pó de rocha do cultivo do *A. niger* isolado (teste de Tukey, nível de confiança de 95%). O uso do grânulo com os microrganismos mistos proporcionou não apenas a mesma capacidade de solubilização de P que o uso de *A. niger* com a rocha em pó, mas também tem a vantagem de colocar no sistema um microrganismo com alta capacidade de controle biológico (*Trichoderma*). Além do mais, esses resultados são muito promissores, pois indicam que a interação do microrganismo com a RF no grânulo biofertilizante potencializou a solubilização de P.

Figura 3. 6 - Comparação entre as eficiências de solubilização de P da rocha fosfática Pratápolis (RF_{Pratápolis}) nas formas de pó e grânulos biofertilizantes em cultivos de *Aspergillus niger* (AN) e *Trichoderma asperelloides* (TA) isolados e em co-cultivo. Os ensaios foram realizados por 120 h em meio PKV, pH inicial 7,0, em shaker a 30 °C e 220 rpm.



O aumento da solubilização de P observado nos grânulos pode ser explicado pela maior interação entre os microrganismos e as partículas de rocha dispersas no compósito. Nesse sistema, os microrganismos foram encapsulados junto com a RF dispersa, de forma que sua proliferação e a forma com que os microrganismos cresceram resultou em maior interação com a rocha quando comparados ao sistema onde os microrganismos e o pó de RF estavam dispersos no meio. Este efeito positivo na taxa de solubilização de P também foi observado por Klaic et al. (2018a), que desenvolveu compostos fertilizantes com encapsulamento simultâneo de esporos RF e *A. niger*. Klaic et al. (2018a) mostraram que a dispersão das partículas de rocha na matriz encapsulante aumentou a área de contato das partículas

disponíveis para reação com os ácidos orgânicos produzidos pelos MSFs, resultando em maiores taxas de solubilização de P. Foi demonstrado que o crescimento da biomassa ao redor das partículas de RF promove um cisalhamento natural das partículas de rocha, onde a biomassa microbiana penetra nas partículas, conforme observado para os grânulos compostos produzidos por Lian et al. (2008). Esses resultados indicam o potencial do grânulo como biofertilizante para solubilização biológica da RF, como uma possível alternativa e um método ecologicamente correto para fornecer suplementação de P às plantas.

Além disso, o processo de extrusão a frio foi eficaz para a produção dos grânulos biofertilizantes. A matriz de amido foi capaz de preservar os microrganismos e fornecer nutrientes para o crescimento inicial de ambas as linhagens. A viabilidade média, das cepas isoladas e combinadas no biofertilizante granulado após a produção foi de cerca de $7 - 9 \times 10^7$ UFC/g, enquanto as viabilidades após 6 e 12 meses de armazenamento a 4 °C foram cerca de $0,7 - 3 \times 10^7$ UFC/g e $2 - 5 \times 10^6$ UFC/g, respectivamente. A metodologia proposta para a produção dos grânulos biofertilizantes abre caminho para estudos de uma diversidade de materiais (como fertilizantes orgânicos) e outros microrganismos benéficos para a agricultura. Além do mais, o processo produtivo dos grânulos biofertilizantes da forma com que foi realizado é passível de escalonamento.

3.3 INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Fusarium oxysporum* POR *T. asperelloides* E *A. niger* DOS GRÂNULOS BIOFERTILIZANTES

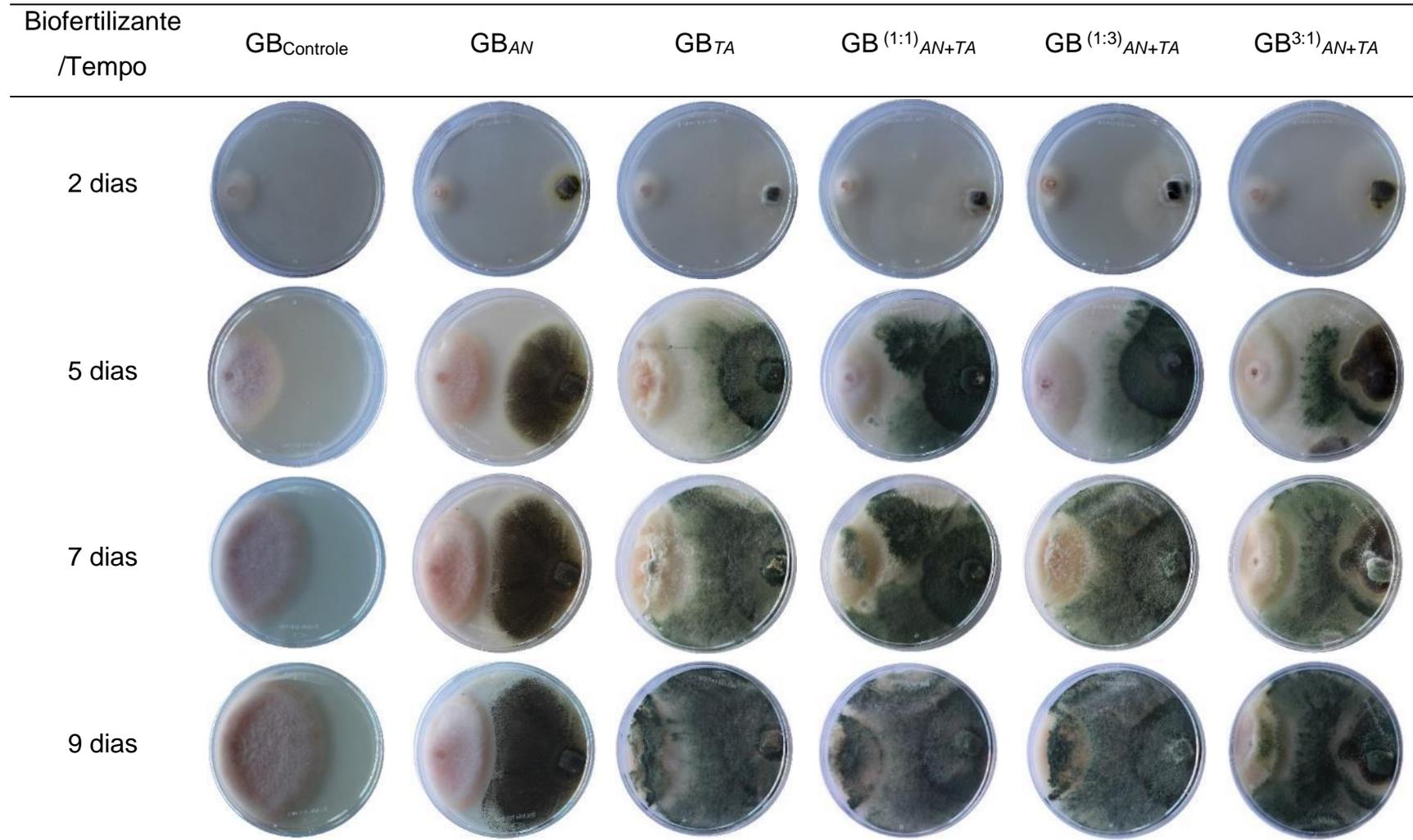
O controle biológico de doenças de plantas usando *Trichoderma* spp. é uma alternativa que tem sido empregada no manejo integrado de pragas (LI et al., 2018; RAYMAEKERS et al., 2020), com a área tratada com *Trichoderma* crescendo anualmente (BETTIOL; SILVA; CASTRO, 2019; BUENO et al., 2020). A capacidade de biocontrole dos grânulos biofertilizantes foi avaliada *in vitro*, a fim de determinar se a presença do *A. niger* pode afetar negativamente a capacidade do *T. asperelloides* de inibir o *F. oxysporum*. Os resultados mostraram que *A. niger* (GB_{AN}) não inibiu o crescimento de *F. oxysporum* e nenhuma interação ou sobreposição desses microrganismos foi observada (Figura 3.7). Após 7 dias de crescimento, os grânulos que continham *T. asperelloides* em qualquer quantidade (GB_{TA}, GB^(1:1)_{TA} +

AN , $GB^{(3:1)}_{TA+AN}$ e $GB^{(1:3)}_{TA+AN}$) foram capazes de inibir o crescimento micelial de *F. oxysporum*, apresentando crescimento sobreposto ao patógeno (Figura 3.7).

Nestes ensaios, foi observado que o crescimento do *A. niger* nos grânulos biofertilizantes levou à modificação da estrutura do grânulo. Esta ação também foi observada para os grânulos co-inoculados ($GB^{(1:1)}_{TA+AN}$, $GB^{(3:1)}_{TA+AN}$ e $GB^{(1:3)}_{TA+AN}$), com efeito sinérgico dos microrganismos combinados. No caso do biofertilizante $GB^{(1:3)}_{TA+AN}$, observou-se que *A. niger* apresentou capacidade de crescimento local no grânulo e no entorno, mas o *T. asperelloides* cresceu sobre *A. niger*. Além disso, a capacidade de expansão do *T. asperelloides* foi maior, com crescimento em toda a placa. Ramírez-Cariño et al. (2020) observaram que a taxa de crescimento do *T. asperelloides* foi três vezes maior que a de *F. oxysporum*, o que proporciona uma vantagem significativa do antagonista na competição por espaço e nutrientes.

Os resultados mostraram que o *A. niger* teve capacidade de crescimento local no grânulo, enquanto *T. asperelloides* cresceu extensivamente, atacando o patógeno *F. oxysporum* (Figuras 3.3 e 3.7). Este resultado é interessante uma vez que o *A. niger*, que cresce mais localmente, apresentou maior capacidade de produção de ácidos orgânicos e, conseqüentemente, solubilização de P. Os resultados também demonstraram que a presença de *A. niger* não afetou o potencial do *T. asperelloides* em inibir o *F. oxysporum*, tendo a sua função principal de controle biológico mantida no grânulo biofertilizante.

Figura 3. 7 - Inibição crescimento micelial do *Fusarium oxysporum* por *Trichoderma asperelloides* (TA) e *Aspergillus niger* (AN).



As hifas de *Trichoderma* podem envolver e estrangular as hifas do patógeno, secretando enzimas que degradam as paredes celulares (ALAMRI; HASHEM; MOSTAFA, 2012; ANEES et al., 2010; HARMAN et al., 2004; MONTE; BETTIOL; HERMOSA, 2019). Uma redução de cerca de 66% na severidade da murcha de *Fusarium* do tomateiro na presença de *T. asperelloides* foi observada por Ramírez-Cariño et al. (2020), o que confirma o resultado obtido do potencial desta espécie no controle de *Fusarium*. Igualmente importante é a capacidade de *Trichoderma* como promotores de crescimento de plantas e indutores de resistência sistêmica (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2009; HARMAN et al., 2004; MARTÍNEZ-MEDINA et al., 2013; MONTE; BETTIOL; HERMOSA, 2019), tornando este gênero de microrganismo especialmente adequado para uma agricultura sustentável. Os resultados obtidos até o momento demonstram o potencial dos microrganismos, atuando isoladamente ou em co-cultivo nos grânulos biofertilizantes, para o biocontrole e solubilização do fósforo.

4. CONCLUSÕES

- A capacidade de solubilização do grânulo contendo *A. niger* foi superior à capacidade do grânulo contendo *T. asperelloides* ou o co-cultivo de *A. niger* e *T. asperelloides*.
- A solubilização do grânulo co-inoculado não apresentou diferenças estatisticamente significativas com a solubilização do cultivo isolado de *A. niger* com a rocha fosfática Pratápolis em pó nas mesmas condições de cultivo.
- A solubilização do fosfato de rocha pode ser explicada pela produção de ácidos orgânicos pelos microrganismos, com uma correlação de Pearson de 86%.
- As proporções de *A. niger* e *T. asperelloides* variando entre 25 e 75% não afetaram a capacidade desses microrganismos na solubilização de P.
- A capacidade de controle biológico do *T. asperelloides*, avaliada *in vitro*, sobre o *F. oxysporum* não foi afetada com a presença do *A. niger* nos grânulos biofertilizantes combinados.
- Pelos resultados obtidos, observa-se o potencial desse método de produção do grânulo biofertilizante, como a possibilidade de aumento de escala da produção dos grânulos e até mesmo a utilização de outros tipos de materiais, não necessariamente a rocha fosfática como carreador dos microrganismos.

CAPÍTULO 4

Estudo da formulação do grânulo biofertilizante e promoção de crescimento de tomate em rizotron

1. INTRODUÇÃO

A utilização de microrganismos na agricultura tem se mostrado uma tendência na busca de uma agricultura mais sustentável visando a substituição, pelo menos parcial, dos fertilizantes químicos e a manutenção da qualidade do solo. No entanto, diversos desafios são enfrentados na produção e no uso de microrganismos na agricultura, pois os produtos agroquímicos são formulados e padronizados para armazenamento de longo prazo, geração de resultados rápidos e facilidade de armazenamento e uso pelos agricultores.

Para consolidar o desenvolvimento e o uso de biofertilizantes na agricultura é necessário investimento em pesquisa e desenvolvimento em diversas áreas de conhecimento, visando obter um produto com capacidade de gerar os efeitos benéficos esperados nas plantas. Além de selecionar as cepas com capacidade para uso na agricultura, é preciso estabelecer formas de produção em massa dos microrganismos, desenvolver formulações que mantenham a qualidade e o tempo de prateleira desses produtos a fim de torná-los competitivos no mercado.

Como abordado nos capítulos anteriores, os gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* desempenham papéis fundamentais na produção de ácidos orgânicos, ciclagem de nutrientes, controle biológico e promoção de crescimento das plantas. O rendimento na produção dos conídios está relacionado a espécie cultivada e as características nutricionais e físicas dos substratos. A produção industrial do *Trichoderma* é geralmente realizada em cultivo em estado sólido (CES) com substratos como: grãos de arroz, milho, milheto, trigo, sorgo, cascas e farelos (MASCARIN et al., 2019). Porém, após a extração dos conídios os substratos utilizados, normalmente os grãos de arroz, acabam sendo resíduos da produção ou utilizados em caldeiras para geração de energia. Entretanto, esse substrato ainda possui alto teor nutricional. Visto que, além de ser rico em nutrientes, o próprio meio de cultivo também pode carregar ácidos orgânicos ou metabólitos que favoreçam a

solubilização dos minerais presentes na rocha fosfática, o crescimento das plantas e o controle biológico, uma proposta interessante seria utilizar o próprio arroz de cultivo na formulação do grânulo biofertilizante (GB), visando a utilização mais sustentável do substrato do CES.

Portanto, com o objetivo de desenvolver um processo para produção do grânulo incorporando o próprio substrato de cultivo, neste capítulo foram avaliadas diferentes formulações para o desenvolvimento dos grânulos biofertilizantes, contendo o arroz em diferentes proporções, com e sem a adição de gel de amido e um comparativo entre os grânulos produzidos com amido de milho em pó e os microrganismos encapsulados no gel e com os microrganismos diretamente carregados do arroz de cultivo. Avaliando a viabilidade dos microrganismos e características de densidade de partícula e a força de resistência a compressão das diferentes formulações.

Além disso, uma etapa essencial para elucidar a utilização desse produto é sua aplicação em plantas. O tomate está entre as hortaliças do tipo fruto mais consumidas do mundo, sendo uma excelente fonte de vários micronutrientes e antioxidantes para a dieta humana. Porém, diversas doenças afetam a planta e a utilização de controle biológico tem se mostrado promissora (AL-ASKAR et al., 2021; HERRERA-TÉLLEZ et al., 2019). Como discutido anteriormente (Capítulo 3), *Trichoderma asperelloides* tem potencial de controle biológico do *Fusarium oxysporum*, um patógeno comum em cultivares de tomate. Por isso, nesta etapa do estudo, os grânulos biofertilizantes foram avaliados na promoção do crescimento de tomate em rizotron. No estudo foram avaliados os grânulos isolados de *A. niger*, *T. asperelloides* e a combinação desses microrganismos, visando compreender a ação no desenvolvimento da planta e na dinâmica do P do solo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ROCHA FOSFÁTICA

As rochas fosfáticas (RF) de Pratápolis (RF_{Pratápolis}) e a de Registro (RF_{Registro}), originárias do Brasil, foram gentilmente doadas pela Nutrisafra Fertilizantes Ltda. (Cosmópolis, São Paulo, Brasil). Para utilização nos grânulos biofertilizantes, as rochas foram secas a 80 °C por 24 h em estufa com circulação de ar e após secagem passaram por peneiras para padronização do tamanho de partícula (<500 µm). A RF_{Registro} foi somente utilizada em testes para desenvolvimento da formulação dos grânulos biofertilizantes. A RF_{Pratápolis}, que havia sido previamente selecionada (Capítulo 2), foi utilizada nas formulações estudadas nesse capítulo.

2.2 MICRORGANISMOS

Os microrganismos utilizados foram o *Trichoderma asperelloides* LQC-96 e o *Aspergillus niger* C (BRMCTAA 82). A cepa de *T. asperelloides* foi obtida da Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA) da Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna, São Paulo, Brasil). O *A. niger* foi obtido na Embrapa AgroIndústria de Alimentos (Rio de Janeiro, Brasil). Os microrganismos foram armazenados a - 80 °C em uma solução de glicerol (30% em massa) e NaCl (0,9% em massa). Ambos os fungos foram reativados em batata dextrose ágar (BDA) (Acumedia, EUA). A cepa de *T. asperelloides* cresceu a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 h por 7 dias e a de *A. niger* a 30 ± 2 °C por 6 dias. Os esporos foram retirados através da raspagem da placa com solução esterilizada de Tween 80 (0,5% v/v) em água destilada para utilização no cultivo em estado sólido para a produção massal dos microrganismos. A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer.

2.3 PRODUÇÃO MASSAL DE MICRORGANISMOS

Para a produção do grânulo de biofertilizante foi necessário grandes quantidades de esporos dos microrganismos, e a partir do cultivo em placa, foi realizada o cultivo em estado sólido (CES) em grãos de arroz (MASCARIN et al., 2019; VIMAL et al., 2017). Os esporos de *T. asperelloides* e de *A. niger* foram

produzidos em sacos de polipropileno (23 x 40 cm) com grãos de arroz parboilizado, classe longo fino, tipo 1 (marca Qualidade). Para a produção do *T. asperelloides*, 200 g de arroz seco foram imersos em 400 mL de água por 30 min. Para o cultivo de *A. niger* a mesma quantidade de arroz foi imersa em água, porém por 5 min. O excesso de água foi removido utilizando uma peneira e o substrato foi autoclavado (121 °C por 20 min). A suspensão de conídios ($1,2 \times 10^7$ esporos/g_{arroz seco}) obtida através do crescimento em placas com BDA, como descrito no item 2.2 foi adicionada ao arroz esterilizado e incubado por 7 dias a 28 °C sob fotoperíodo de 12 h (12 h escuro /12 h de luz) para *T. asperelloides* e a 30 °C para *A. niger* sem fotoperíodo, também por 7 dias. Os sacos de polipropileno foram agitados todos os dias durante a CES.

2.4 ESTUDO DAS DIFERENTES FORMULAÇÕES

Devido ao alto descarte de arroz de cultivo após a extração de esporos alguns testes foram realizados com a utilização desse material, visando a minimização na geração de resíduos e a diminuição dos custos de produção do biofertilizante. Esse descarte também ocorre na produção comercial de *Trichoderma*. O arroz normalmente vai para as caldeiras para a geração de vapor ou é descartado como resíduo industrial. Porém, esse resíduo orgânico é rico nutricionalmente e capaz de sustentar o crescimento dos microrganismos. Portanto, foi realizado um teste substituindo o amido em pó pelo resíduo de arroz do cultivo em estado sólido (CES). Os grânulos produzidos com esse arroz foram colocados em solo para visualizar o crescimento do microrganismo.

Esse teste foi realizado com a utilização do *T. asperelloides* e após a extração dos esporos (descrita no item 2.3 do Capítulo 3), o arroz foi seco em estufa com circulação de ar a 70 °C por aproximadamente 16 h e passou pelo moinho de facas para a diminuição do tamanho das partículas. O arroz em pó resultante substituiu o amido de milho em pó no processo de produção do GB (processo descrito no item 2.4 do Capítulo 3). A ilustração do crescimento desse microrganismo no teste está apresentada na Figura 4.1, sendo possível observar o potencial da utilização desse resíduo na produção do grânulo pois o *Trichoderma* cresceu na superfície e no entorno do GB.

Figura 4. 1 - Crescimento do *Trichoderma asperelloides* no grânulo biofertilizante produzido com 70% de rocha fosfática Registro, 25% de resíduo de arroz e 5% de gel de amido encapsulado com 10^9 esporos/g_{Fonte de carbono}.



Porém, visualizando o processo de produção do GB como um todo, a adição de mais etapas (secagem e moagem do arroz da CES) não seria o método mais viável para a utilização do arroz de cultivo, portanto, modificou-se a metodologia de produção dos GB, buscando utilizar o arroz cultivado diretamente na formulação, excluindo as etapas de separação e concentração dos esporos. Assim, o arroz colonizado foi batido em liquidificador e o gel de amido gelatinizado foi incorporado no próprio liquidificador para a formação de uma pasta, que foi homogeneizada com a rocha, esse processo está descrito na seção 2.5.

Após definir o processo para utilização do arroz de cultivo na formulação, foram avaliadas diferentes formulações de biofertilizante modificando: a quantidade de arroz, a quantidade de gel de amido e a quantidade de glicerol adicionada no gel. Como resposta, foram avaliadas a viabilidade das formulações pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), a densidade dos grânulos (g/cm^3) e a força máxima (N) de resistência a compressão diametral de 5 diferentes formulações contendo o *T. asperelloides*. As quantidades adicionadas de rocha fosfática Pratápolis, arroz cultivado, gel de amido e a quantidade de glicerol presente no gel das diferentes formulações avaliadas estão descritas na Tabela 4.1.

Tabela 4. 1 - Diferentes formulações de grânulos biofertilizantes de *Trichoderma asperelloides* e suas nomenclaturas.

Código Biofertilizante	Formulação (%)			
	Rocha fosfática Pratápolis	Arroz cultivado	Gel de amido	Glicerol no gel de amido
GB ₃₀	70	30	0	0
GB _{27,5} ^(SG)	70	27,5	2,5	0
GB ₂₅ ^(SG)	70	25	5	0
GB ₂₅ ^(C5G)	70	25	5	5
GB ₂₅ ^(C20G)	70	25	5	20

2.4.1 Viabilidade dos grânulos biofertilizantes

Os grânulos biofertilizantes (GBs) foram armazenados em frascos plásticos de 50 mL com tampa de rosca, no escuro, a temperatura de 4 °C e a temperatura ambiente. A determinação da viabilidade dos GBs foi realizada de acordo com a adaptação da metodologia descrita por Pinto; Lucon; Bettiol (2019). A viabilidade foi analisada logo após a produção dos grânulos e no tempo de 1, 2, 3 e 5 meses de armazenamento nas diferentes temperaturas, na qual 10 g dos biofertilizantes foram adicionados em Erlenmeyer de 250 mL com 90 mL de água destilada autoclavada. Os biofertilizantes granulares foram solubilizados em shaker por 2 h a 250 rpm. Foi realizada uma diluição seriada e 100 µL foram adicionados a placas de Petri com batata dextrose ágar (BDA) e Triton X-100, como redutor de colônias. As placas foram incubadas a temperatura de 28 °C por 48 h e então foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC).

2.4.2 Densidade e resistência mecânica dos grânulos biofertilizantes

A densidade (D_{GB}) dos grânulos biofertilizantes foi medida através de um picnômetro, utilizando querosene a partir da seguinte equação:

$$D_{GB} = \frac{M_1}{(M_1 + M_2) - M_3} \times \frac{1}{D_{líq}},$$

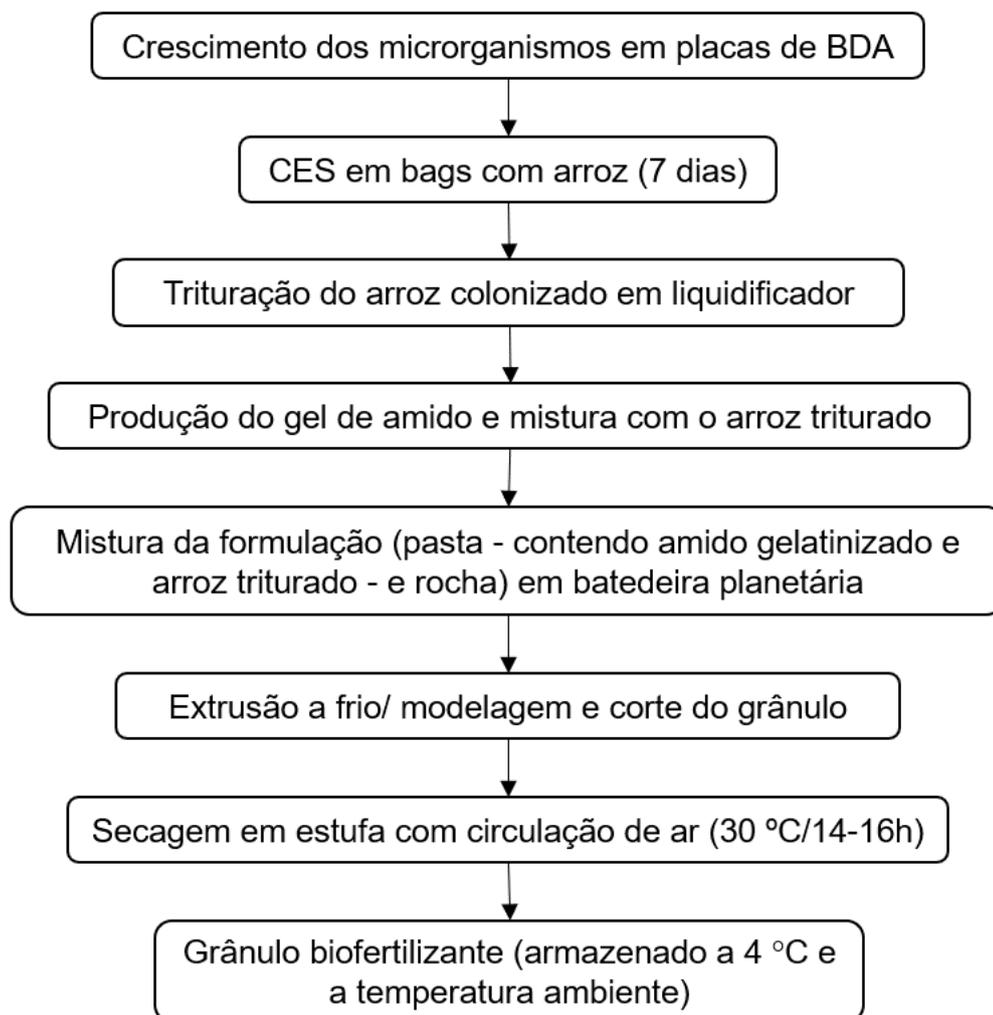
onde a M_1 representa a massa dos grânulos secos (g), M_2 a massa do picnômetro com o líquido (querosene) (g), M_3 a massa do picnômetro com líquido e grânulos biofertilizantes(g) e a $D_{líq}$ a densidade do líquido utilizado (g/cm^3).

A resistência mecânica a compressão diametral foi medida a partir do equipamento Máquina Universal de ensaios mecânicos, modelo DL 3000 (EMIC), no Laboratório de Nanotecnologia para o Agronegócio (LNNA) na Embrapa Instrumentação São Carlos. Foram realizados ensaios com no mínimo 12 corpos de prova de cada formulação. Esse experimento visou avaliar a variação de resistência a compressão diametral das diferentes formulações. Os resultados obtidos indicam a força máxima de resistência (N) a compressão dos grânulos biofertilizantes.

2.5 PRODUÇÃO DO GRÂNULO BIOFERTILIZANTE UTILIZADO NO CULTIVO DE TOMATEIRO EM RIZOTRON

Os grânulos biofertilizantes utilizados no experimento do rizotron foram produzidos a partir da utilização do arroz de cultivo, as etapas de produção estão descritas na Figura 4.2. O grânulo foi produzido contendo 70% de rocha fosfática Pratápolis, 25% de arroz onde os fungos foram cultivados e 5 % de gel de amido gelatinizado. O processo de gelatinização foi uma adaptação do procedimento descrito por Giroto et al. (2014). O gel foi produzido contendo 15% de amido, 5% de glicerol e 80% de água destilada. O gel foi preparado sob agitação, seguindo as seguintes etapas: (a) dispersão do amido e glicerol em água à temperatura ambiente, por 10 min; (b) processo de gelatinização sob agitação vigorosa a 90 °C por 30 min (formação de um gel viscoso); (c) redução da temperatura para 30 - 40 °C; (d) adição e homogeneização do gel de amido ao arroz cultivado batido em liquidificador para a formação de uma pasta.

Figura 4. 2 - Fluxograma da produção dos grânulos biofertilizantes contendo arroz colonizado pelos fungos e triturado, amido gelatinizado e rocha fosfática Pratápolis.



A essa pasta foi adicionada à rocha fosfática e a mistura foi homogeneizada em misturador planetário Gatromaq BP-05 (G. Paniz, Brasil). A modulação da massa foi realizada a partir de uma extrusora manual, onde obteve-se grânulos biofertilizantes cilíndricos com aproximadamente 5 mm de comprimento e 9 mm de espessura. A umidade do biofertilizante extrusado foi reduzida em estufa de circulação de ar a 30 °C por 14-16 h. Após essa etapa, os GBs foram armazenados a 4 °C, por cerca de uma semana antes do início do experimento em rizotron.

2.6 APLICAÇÃO DOS GRÂNULOS BIOFERTILIZANTES DE *A. niger* E *T. asperelloides* ISOLADOS E COMBINADOS NO DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS DE TOMATE EM RIZOTRON

A fim de avaliar a promoção de crescimento em rizotrons, mudas de tomate salada obtidas a partir de sementes do cultivar de tomate gaúcho (Feltrin SA) adquiridas no comércio local em São Carlos, foram transplantadas para os rizotrons construídos com tubos de PVC com 100 cm de comprimento e 17,5 cm de diâmetro, cortados longitudinalmente ao meio. O substrato utilizado no experimento foi o Vivato Slim Plus (MAPA: SP-003662-5.000004 - Technes agrícola Ltda. Catanduva/SP, Brasil). As matérias-primas inclusas no substrato são: casca de pinus bio-estabilizada, vermiculita, moinha de carvão vegetal, água e espuma fenólica. O substrato continha pH 6,0; densidade (base seca) 260 kg/m³; umidade 48%; aditivos fertilizantes 1,5% e aditivos corretivos 0,2%.

Em todos os rizotrons foram adicionados primeiramente uma camada de 70 cm de substrato e o produto (grânulos fertilizantes) foram adicionados e homogeneizados com o restante de substrato necessário para preencher os 30 cm restantes do rizotron. Em cada rizotron foi adicionado uma quantidade de 70 g de biofertilizante (contendo em média $1,3 \times 10^7$ UFC/g_{GB}), aplicada a 12-13 L de substrato seco. Todos os dias as plantas foram regadas com a mesma quantidade de água em todos os rizotrons. O ensaio foi conduzido com sete repetições e cinco tratamentos, sendo eles: 1) controle somente com o substrato (C_S); 2) controle com grânulo sem microrganismo (C_{GSM}); 3) grânulo biofertilizante com *A. niger* (GB_{AN}); 4) grânulo biofertilizante com *T. asperelloides* e *A. niger* (GB^(1:1)_{TA+AN}); e 5) grânulo biofertilizante com *T. asperelloides* (GB_{TA}). O grânulo controle, sem microrganismos, foi produzido após a esterilização do arroz em autoclave, seguindo os mesmos passos de produção, porém sem a presença dos microrganismos.

Semanalmente foi avaliado o comprimento da raiz (cm), a altura das plantas (cm) e o diâmetro da base da haste (mm). Aos 39 dias de plantio as plantas foram retiradas dos rizotrons e avaliado, além das variáveis já citadas, o volume do sistema radicular (mL), a massa fresca e seca do sistema radicular (g), massa fresca e seca da parte aérea (g); e a partir de tratamento de imagens, a área do sistema radicular. As massas secas da parte aérea e do sistema radicular foram medidas após secagem a 60 °C até peso constante. Amostras do solo, da camada de 0 a 20

cm do rizotron foram coletadas e analisadas a quantidade de P lábil extraído com resina (g/dm^3) e a atividade da enzima β -glucosidase do solo ($\mu\text{g p-nitrofenol/gsolo.h}$).

Apesar de ter sido observado e tentado utilizar mudas bastante similares, a altura inicial das plantas nem sempre foi a mesma, portanto, buscando minimizar os efeitos das diferenças iniciais, a partir dos resultados obtidos semanalmente de altura da planta, comprimento da raiz e diâmetro da haste foram calculados os coeficientes de crescimento dessas variáveis expressos em cm/dia, cm/dia e mm/dia, respectivamente, realizando um ajuste linear dos dados. A mudança na altura da planta, comprimento da raiz e diâmetro da base da haste foi calculada a partir da diferença entre os valores finais e iniciais dessas variáveis (final-inicial) e, a diferença percentual das mesma variáveis foi calculada a partir dos valores finais e iniciais $((\text{final-inicial})/\text{inicial} \times 100)$. Todos os resultados passaram por tratamentos estatísticos descritos no item 2.8.

Ao final dos 39 dias de crescimento das plantas, as imagens foram obtidas com câmera digital (Canon EOS Rebel T3i) e tratadas usando o ImageJ (rsbweb.nih.gov/ij, software livre) conforme apresentado na Figura 4.3. As fotos do rizotron foram tiradas com a presença de fita métrica para que fosse possível setar a escala da imagem no software através de uma dimensão conhecida. A partir disso, a imagem foi binarizada (Figura 4.3b), sendo possível medir a área do sistema radicular.

Figura 4. 3 - Tratamento das imagens contendo o sistema radicular das plantas no rizotron usando o software ImageJ, onde (a) imagem obtida do experimento em rizotron, e (b) imagem binarizada.



A qualidade do solo, importante para a saúde das plantas, foi avaliada determinando a quantidade da enzima β -glucosidase. A presença dos microrganismos é fundamental para a produção enzimática no solo, sendo assim avaliou-se a quantidade dessa enzima no substrato da camada de 0-10 cm do rizotron, para compreender se os diferentes tratamentos e os diferentes microrganismos tinham a capacidade de produção ou estimular a produção dessa enzima. O procedimento analítico baseia-se na determinação colorimétrica do p-nitrofenol liberado pelas β -glucosidases do solo, quando o solo é incubado com uma solução tamponada de p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (DENG; POPOVA, 2015).

2.7 FRACIONAMENTO DE FÓSFORO DO SOLO

O fracionamento do P do solo foi realizado para melhor entendimento da solubilização e disponibilização do P. Inicialmente foi realizado o fracionamento do P do substrato puro, sem ter sido utilizado no cultivo do tomateiro. Após a retirada das plantas dos rizotrons, uma amostra de solo foi retirada da camada de 0 a 20 cm de cada equipamento, e posteriormente foi seca e peneirada em 2 mm. Essa análise foi realizada na ESALQ/USP, Piracicaba, de acordo com a metodologia proposta por Hedley; Stewart; Chauhan (1982), com modificações feitas por dos Santos (2000), usando sequencialmente extratores de menor à maior força de extração, os quais removem P inorgânico (P_i) das formas mais disponíveis às mais estáveis. Foram adicionados 0,5 g de solo em extratores sequenciais: 1) resina de troca aniônica (P_{RTA}); 2) NaHCO_3 0,5 mol/L ($P_{i\text{ BIC}}$ e $P_{o\text{ BIC}}$); 3) NaOH 0,1 mol/L ($P_{i\text{ NaOH-0,1}}$ e $P_{o\text{ NaOH-0,1}}$); 4) HCl 1,0 mol/L (P_{HCl}) e 5) NaOH 0,5 mol/L ($P_{i\text{ NaOH-0,5}}$ e $P_{o\text{ NaOH-0,5}}$). Para todas as cinco etapas, a suspensão foi agitada por 16 horas em um agitador de ponta a ponta (33 rpm) e centrifugada por 20 min (a 3500 rpm). O fósforo orgânico (P_o) foi calculado pela diferença entre o P total e o P_i em cada extrator.

Ao final da extração sequencial, o solo residual remanescente foi seco a 50 °C, moído e digerido por H_2SO_4 concentrado, H_2O_2 30% e MgCl_2 saturado para extrair o P residual (BROOKES; POWLSON, 1981). A concentração de P nos extratores ácidos foi medida de acordo com o procedimento descrito por Murphy; Riley (1962). Para extratores alcalinos, o procedimento utilizado foi o de Dick; Tabatabai (1977).

2.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as comparações entre a densidade dos grânulos e a força máxima de resistência a compressão diametral foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Tukey com intervalo de significância de 95 %.

Nos resultados do experimento do rizotron foram realizados análise de variância e o teste de comparações múltiplas de Duncan, ou de Kruskal-Wallis em casos de heterogeneidade de variância (verificada pelo teste de Bartlett). Devido à alta variância nos resultados do fracionamento de P do solo o tratamento estatístico utilizado foi teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi de 95 % e o software utilizado foi o R versão 4.0.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DIFERENTES FORMULAÇÕES DE GBs COM *T. asperelloides*

Pode-se observar que não houve diferenças estatísticas significativas na densidade dos GBs com as diferentes formulações contendo o arroz cultivado na presença ou ausência de gel de amido (Tabela 4.2).

Tabela 4. 2 - Resultados da densidade de partícula (g/cm³) e força máxima (N) do grânulo biofertilizante.

Biofertilizante	Densidade de partícula (g/cm ³)*	Força máxima (N)*
GB₃₀	3,19 ± 0,001 a	27,40 ± 4,30 c
GB_{27,5}^(SG)	3,35 ± 0,099 a	29,72 ± 5,14 c
GB₂₅^(SG)	3,16 ± 0,001 a	66,11 ± 15,66 a
GB₂₅^(C5G)	3,27 ± 0,087 a	49,93 ± 9,94 b
GB₂₅^(C20G)	3,30 ± 0,011 a	43,49 ± 7,46 b

*média ± desvio padrão, letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey com 95% de confiança.

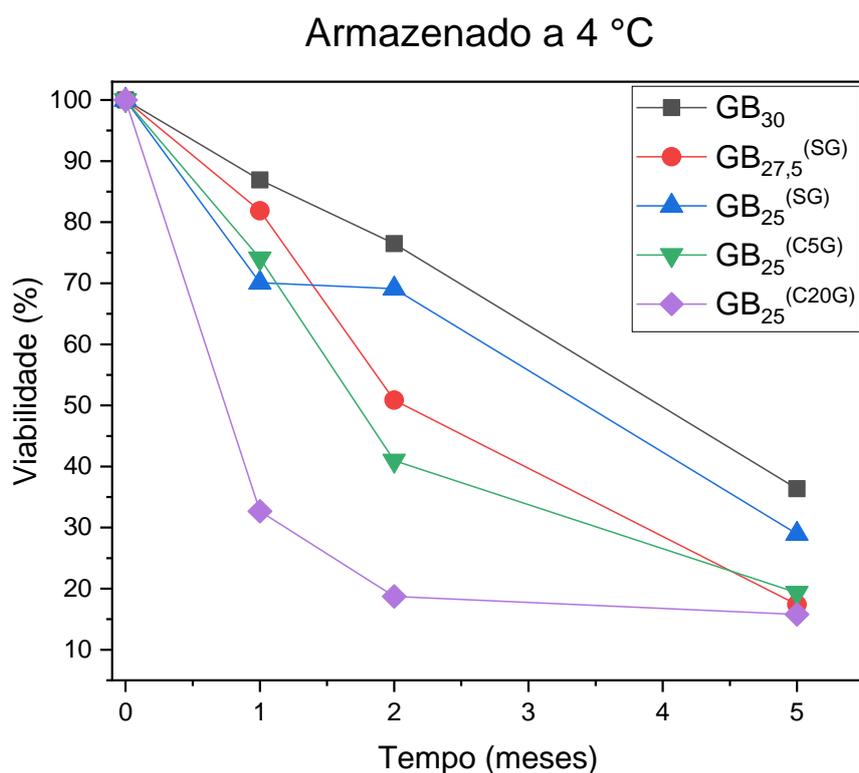
A presença de 5 e 20 % de glicerol na formulação do gel de amido (GB₂₅^(C5G) e GB₂₅^(C20G)) resultou em valores de força máxima nos ensaios de compressão sem diferenças estatísticas significativas entre si. Os grânulos biofertilizantes GB₃₀ e GB_{27,5}^(SG) apresentaram menores valores de força máxima de resistência a compressão diametral e sem diferença estatística significativa entre essas formulações. Entretanto, observa-se que o GB com 5 % de gel de amido sem a presença de glicerol (GB₂₅^(SG)) possui resistência a compressão diametral superior e com diferença estatisticamente significativa das demais formulações.

As viabilidades percentuais dos grânulos biofertilizantes armazenados a 4 °C e ambiente são apresentadas nas Figuras 4.4 e 4.5, respectivamente, enquanto na Tabela 4.3 são apresentados os valores em UFC/g_{GB}.

O grânulo com maior quantidade de glicerol no gel de amido apresentou uma queda de viabilidade mais acentuada comparada as demais formulações. Enquanto no primeiro mês as demais formulações continuaram com 70-90% de viabilidade, já no primeiro mês de armazenamento a viabilidade do GB₂₅^(C20G) caiu para,

aproximadamente, 35%. Comparativamente, a menor queda da viabilidade foi a observada na formulação GB₃₀ que continha somente (70%) rocha fosfática e arroz cultivado (30%), que ao final de 5 meses armazenada a temperatura de 4 °C manteve 40% de sua viabilidade.

Figura 4. 4 - Viabilidade das diferentes formulações de grânulos biofertilizantes de *Trichoderma asperelloides* por 5 meses armazenados a temperatura de 4 °C.



A temperatura ambiente o GB_{27,5}^(SG) teve queda na viabilidade de aproximadamente 35% e o GB₃₀ apresentou queda de quase 80% no 1° mês de armazenamento, enquanto os demais grânulos apresentaram perda total de viabilidade nesse mesmo período (Figura 4.7). Após 2 meses todas as formulações já haviam perdido a viabilidade. Apesar de não se ver o crescimento desses microrganismos nos grânulos armazenados, devido a sua baixa umidade, o aprisionamento dos microrganismos com o carreador (rocha) não foi suficiente para manter a viabilidade dos biofertilizantes.

Figura 4. 5 - Viabilidade das diferentes formulações de grânulos biofertilizantes de *Trichoderma asperelloides* por 5 meses armazenados a temperatura ambiente.

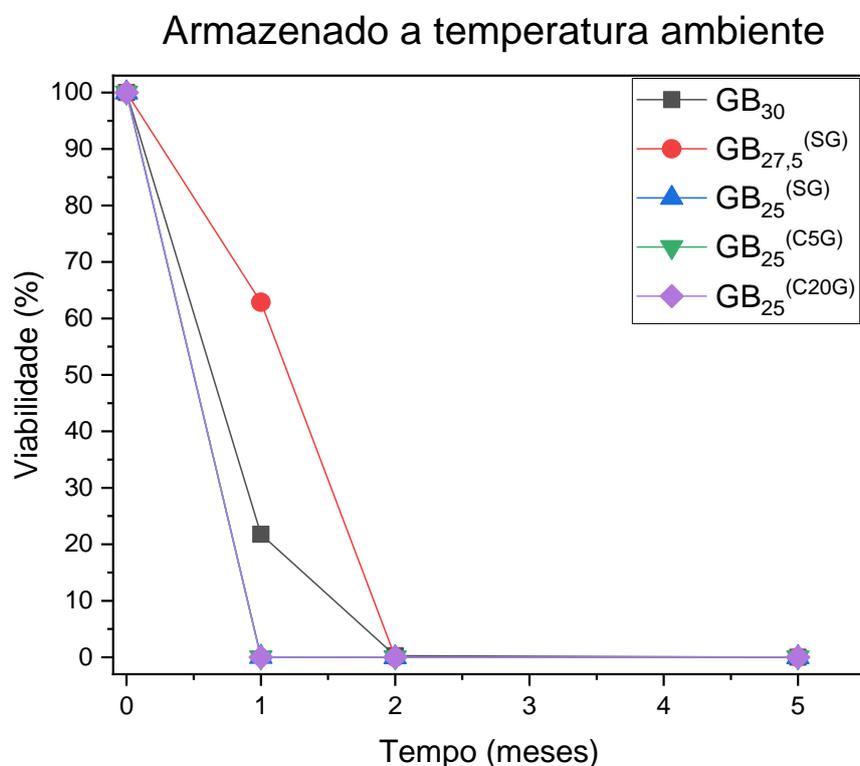


Tabela 4. 3 - Viabilidade (UFC/g_{GB}) das diferentes formulações dos grânulos biofertilizantes de *Trichoderma asperelloides* produzidos com arroz de cultivo.

Biofertilizantes*	Armazenamento	Viabilidade (UFC/g _{GB})				
		Pasta arroz	0 meses	1 mês	2 meses	5 meses
GB ₃₀	4 °C	2,68×10 ⁸	9,32×10 ⁷	8,10×10 ⁷	7,13×10 ⁷	3,39×10 ⁷
	Temp. ambiente			2,03×10 ⁷	2,55×10 ⁵	0
GB _{27,5} ^(SG)	4 °C	2,50×10 ⁸	8,16×10 ⁷	6,68×10 ⁷	4,15×10 ⁷	1,42×10 ⁷
	Temp. ambiente			5,13×10 ⁷	5,25×10 ²	0
GB ₂₅ ^(SG)	4 °C	1,61×10 ⁸	5,18×10 ⁷	3,63×10 ⁷	3,58×10 ⁷	1,50×10 ⁷
	Temp. ambiente			3,63×10 ⁴	0	0
GB ₂₅ ^(C5G)	4 °C	1,43×10 ⁸	1,35×10 ⁷	1,00×10 ⁷	5,53×10 ⁶	2,61×10 ⁶
	Temp. ambiente			0	0	0
GB ₂₅ ^(C20G)	4 °C	3,46×10 ⁸	3,58×10 ⁷	1,17×10 ⁷	6,70×10 ⁶	5,65×10 ⁶
	Temp. ambiente			0	0	0

3.2 COMPARATIVO DOS GRÂNULOS DE AMIDO COM GRÂNULOS DE ARROZ CULTIVADO

Além do estudo das diferentes formulações contendo *T. asperelloides* com os grânulos produzidos com arroz de cultivo, avaliou-se a viabilidade, a densidade e a resistência do grânulo biofertilizante nas formulações com os microrganismos *T. asperelloides* e *A. niger* isolados e combinados. A única diferença na formulação dos grânulos foi a substituição do amido em pó da formulação pelo arroz cultivado. Portanto, a formulação utilizada para esses experimentos foi de 70% de rocha fosfática Pratápolis, 25% de amido em pó ou arroz cultivado e 5% de gel de amido. A formulação do gel de amido continha: 80% água destilada; 15% de amido; e 5% de glicerol.

Na Tabela 4.4 estão apresentados os resultados de densidade e de força máxima aplicada nos grânulos com amido e arroz, assim a comparação estatística entre as médias pelo teste de Tukey a 95% de confiança. De forma geral, foram observadas diferenças estatísticas entre as densidades dos grânulos de amido e de arroz, sendo a densidade dos grânulos de arroz ligeiramente superior a densidade dos grânulos formulados com amido em pó. Porém, apesar da maior densidade dos grânulos de arroz, observa-se que a resistência a compressão desses grânulos foi inferior a resistência dos grânulos produzidos com amido em pó, o que pode ser explicado pelo fato de que o arroz cultivado teve a estrutura das suas cadeias quebradas pelo consumo e ação das enzimas e outros diversos metabólitos produzidos pelos microrganismos ali cultivados. O grânulo com amido em pó não teve suas características de cadeia afetadas pois o microrganismo não teve contato com essa fonte de carbono antes de ser adicionado a formulação, o que permitiu que a estrutura se mantivesse mais resistente. Vale ressaltar também que a moagem do arroz cultivado não gerava partículas tão pequenas como as do amido em pó, portanto no processo de extrusão a possibilidade de elas não terem se agrupado uniformemente e terem formado trincas é maior do que nos grânulos com a formulação do amido em pó.

Tabela 4. 4 - Resultados da densidade de partícula (g/cm^3) e força máxima (N) do grânulo biofertilizante de *Aspergillus niger* (AN) e *Trichoderma asperelloides* (TA) produzidos com amido em pó e arroz cultivado.

Biofertilizante	Densidade de partícula (g/cm^3)*	Força máxima (N)*
GB AMIDO	2,97 ± 0,030 B	82,03 ± 19,52 A
GB _{AN}	2,95 ± 0,019 c	79,40 ± 13,63 a
GB _{TA}	3,00 ± 0,004 bc	87,66 ± 24,95 a
GB _{TA+AN}	2,95 ± 0,027 c	79,40 ± 18,96 a
GB ARROZ	3,26 ± 0,027 A	46,31 ± 8,86 B
GB _{AN}	3,28 ± 0,094 a	44,62 ± 7,75 b
GB _{TA}	3,27 ± 0,087 a	46,93 ± 9,94 b
GB _{TA+AN}	3,23 ± 0,063 ab	47,21 ± 9,03 b

*Média ± desvio padrão, letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey com 95% de confiança. As letras minúsculas representam o comparativo entre os grânulos biofertilizantes com diferentes microrganismos. As letras maiúsculas indicam o comparativo entre a média dos grânulos de amido e arroz.

Outro fator importante é que a utilização direta do arroz colonizado na formulação, além de levar todas as formas dos microrganismos produzidos, também carrega todos os metabólitos que ali estavam presentes durante o cultivo do microrganismo na CES. Esses metabólitos podem contribuir para a solubilização de P, principalmente os que foram excretados no cultivo de *A. niger* devido a sua capacidade de produção de ácidos orgânicos, como observado nos capítulos anteriores desse trabalho. E para o controle biológico e crescimento das plantas, os metabólitos produzidos pelo *T. asperelloides* (MEYER; MAZARO; SILVA, 2019) também desempenham importante função.

A viabilidade dos grânulos biofertilizantes com os microrganismos isolados e combinados nas diferentes temperaturas de armazenamento, formulados tanto com amido como com arroz cultivado, são apresentados nas Tabelas de 4.5 a 4.10. Nas Figuras 4.6 a 4.9 são apresentadas a viabilidade percentual dos grânulos nas diferentes condições de armazenamento.

Tabela 4. 5 - Viabilidade do grânulo biofertilizante produzido com amido de milho em pó com *Aspergillus niger* (AN) armazenados a temperatura de 4 °C e temperatura ambiente.

GB_{AN} – Amido – Viabilidade (UFC/g_{GB})		
Tempo (meses)	4 °C	Temp. ambiente
0	5,03 × 10 ⁶	5,03 × 10 ⁶
1	3,68 × 10 ⁶	3,74 × 10 ⁵
2	3,12 × 10 ⁶	4,43 × 10 ⁴
5	2,57 × 10 ⁶	0

Tabela 4. 6 - Viabilidade do grânulo biofertilizante produzido com amido de milho em pó com *Trichoderma asperelloides* (TA) armazenados a temperatura de 4 °C e temperatura ambiente.

GB_{AN} – Amido – Viabilidade (UFC/g_{GB})		
Tempo (meses)	4 °C	Temp. ambiente
0	1,08 × 10 ⁷	1,08 × 10 ⁷
1	9,12 × 10 ⁶	5,13 × 10 ⁶
2	6,85 × 10 ⁶	2,05 × 10 ⁵
5	6,03 × 10 ⁶	0

Tabela 4. 7 - Viabilidade do grânulo biofertilizante produzido com amido de milho em pó com *Trichoderma asperelloides* (TA) e *Aspergillus niger* (AN) armazenados a temperatura de 4 °C e temperatura ambiente.

GB_{TA + AN} – Amido – Viabilidade (UFC/g_{GB})				
Tempo (mês)	4 °C		Temperatura ambiente	
	AN	TA	AN	TA
0	2,38 × 10 ⁶	5,73 × 10 ⁶	2,38 × 10 ⁶	5,73 × 10 ⁶
1	1,03 × 10 ⁶	3,60 × 10 ⁶	9,25 × 10 ⁴	1,14 × 10 ⁶
2	7,40 × 10 ⁵	2,93 × 10 ⁶	0	0
5	6,55 × 10 ⁵	2,55 × 10 ⁶	0	0

Tabela 4. 8 - Viabilidade do grânulo biofertilizante produzido com arroz de cultivo com *Aspergillus niger* (AN) armazenados a temperatura de 4 °C e temperatura ambiente.

GB_{AN} – Arroz – Viabilidade (UFC/g_{GB})		
Tempo (meses)	4 °C	Temp. ambiente
0	1,44 × 10 ⁷	1,44 × 10 ⁷
1	1,52 × 10 ⁷	1,13 × 10 ⁶
2	7,95 × 10 ⁶	1,43 × 10 ⁵
5	6,35 × 10 ⁶	3,03 × 10 ³

Tabela 4. 9 - Viabilidade do grânulo biofertilizante produzido com arroz de cultivo com *Trichoderma asperelloides* (TA) armazenados a temperatura de 4 °C e temperatura ambiente.

GB_{TA} – Arroz – Viabilidade (UFC/g_{GB})		
Tempo (meses)	4 °C	Temp. ambiente
0	1,35 × 10 ⁷	1,35 × 10 ⁷
1	1,00 × 10 ⁷	0
2	5,53 × 10 ⁶	0
5	2,61 × 10 ⁶	0

Tabela 4. 10 - Viabilidade do grânulo biofertilizante produzido com arroz de cultivo com *Trichoderma asperelloides* (TA) e *Aspergillus niger* (AN) armazenados a temperatura de 4 °C e temperatura ambiente.

GB_{TA + AN} – Arroz – Viabilidade (UFC/g_{GB})				
Tempo (mês)	4 °C		Temperatura ambiente	
	AN	TA	AN	TA
0	1,00 × 10 ⁷	1,25 × 10 ⁷	1,00 × 10 ⁷	1,25 × 10 ⁷
1	4,16 × 10 ⁶	1,10 × 10 ⁷	4,70 × 10 ⁵	1,48 × 10 ⁶
2	2,15 × 10 ⁶	8,35 × 10 ⁶	1,28 × 10 ⁴	1,77 × 10 ⁵
5	2,10 × 10 ⁶	7,00 × 10 ⁶	1,21 × 10 ⁴	1,78 × 10 ³

A viabilidade dos grânulos foi superior quando armazenado a temperatura de 4 °C e com os microrganismos isolados, mantendo a viabilidade dos grânulos de *T. asperelloides* e *A. niger* em torno de 55% após 5 meses de armazenamento. Nesse mesmo período, a viabilidade desses microrganismos combinados foi de 40%. A viabilidade do *T. asperelloides* armazenado a temperatura ambiente por 1 mês caiu para 50% e para o *A. niger* e o grânulo combinado a viabilidade no primeiro mês foi em torno de 10%. A partir de 2 meses de armazenamento a temperatura ambiente todos os grânulos apresentaram perda quase total da viabilidade. Esses resultados reforçam a influência da temperatura na manutenção ou queda de viabilidade dos microrganismos presentes nos grânulos.

Além da temperatura, outro fator essencial para manutenção da viabilidade de produtos biológicos é a forma com que é realizado o empacotamento e o armazenamento dos produtos, o que não foi o foco desse estudo. Porém, utilizando uma atmosfera controlada e embalagens apropriadas, mesmo a temperatura ambiente, é possível aumentar a viabilidade dos GBs.

Figura 4. 6 - Viabilidade percentual dos diferentes grânulos contendo *Aspergillus niger* (AN) e *Trichoderma asperelloides* (TA) nos grânulos biofertilizantes produzidos com amido de milho em pó e armazenados a 4 °C.

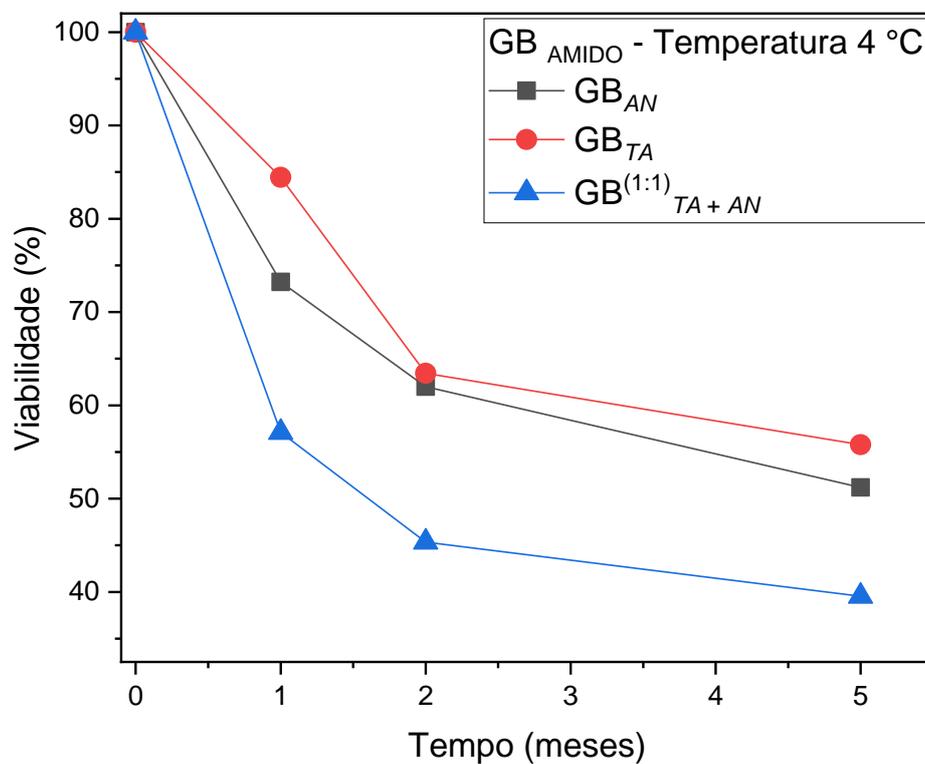
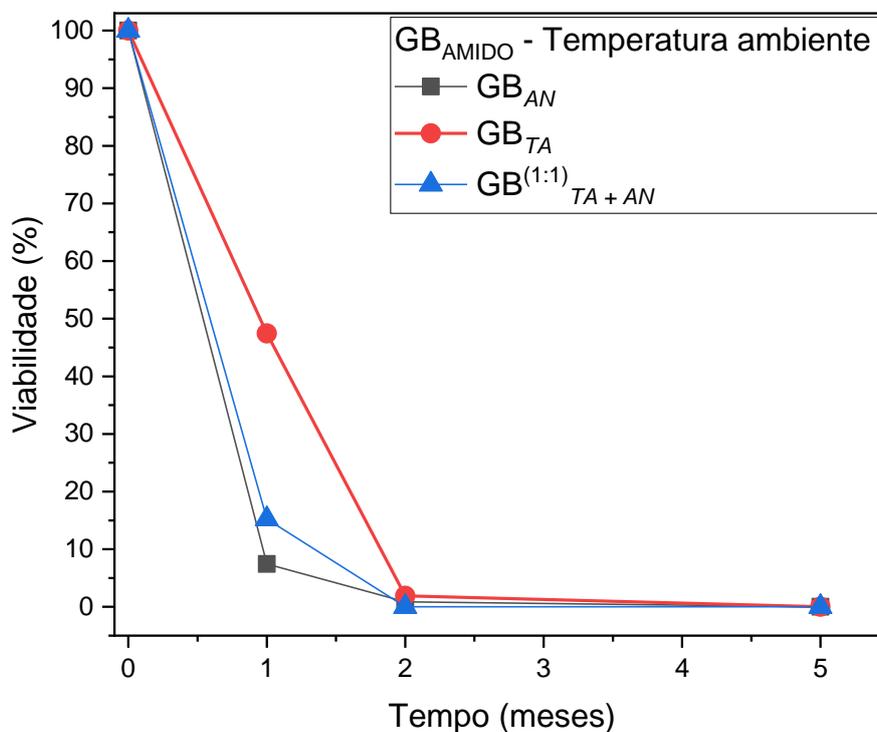


Figura 4. 7 - Viabilidade percentual dos diferentes grânulos contendo *Aspergillus niger* (AN) e *Trichoderma asperelloides* (TA) nos grânulos biofertilizantes produzidos com amido de milho em pó e armazenados a temperatura ambiente.



De maneira geral, os grânulos formulados com amido de milho em pó mantiveram a viabilidade do *T. asperelloides* um pouco superior a viabilidade dos grânulos produzidos com *A. niger* e pela combinação dos microrganismos. Esse resultado não foi observado na formulação com arroz cultivado, onde observou-se uma superioridade da viabilidade dos grânulos de *A. niger* ou do grânulo combinado de *A. niger* e *T. asperelloides*. Ao final de 5 meses armazenados a 4 °C esses grânulos apresentavam ainda uma viabilidade de aproximadamente 45% enquanto o grânulo com *T. asperelloides* isolado a viabilidade caiu para 20% (Figuras 4.8 e 4.9).

Figura 4. 8 - Viabilidade percentual dos diferentes grânulos contendo *Aspergillus niger* (AN) e *Trichoderma asperelloides* (TA) nos grânulos biofertilizantes produzidos com arroz de cultivo e armazenados a 4 °C.

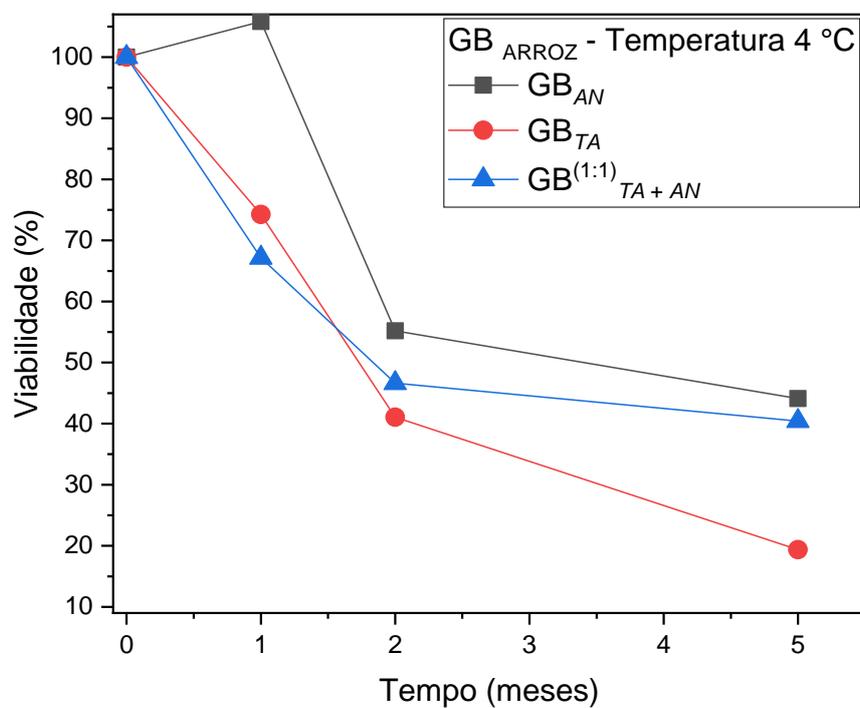
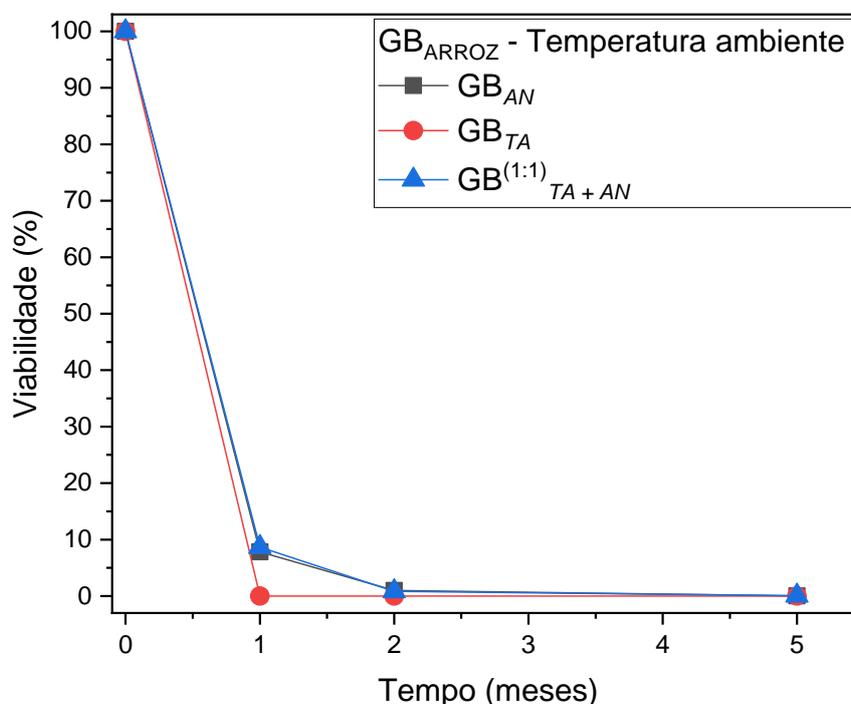


Figura 4. 9 - Viabilidade percentual dos diferentes grânulos contendo *Aspergillus niger* (AN) e *Trichoderma asperelloides* (TA) nos grânulos biofertilizantes produzidos com arroz de cultivo e armazenados a temperatura ambiente.



Ademais, observa-se que a viabilidade dos grânulos com a formulação de arroz armazenados a temperatura ambiente teve uma queda ainda mais acentuada logo no primeiro mês de armazenamento quando comparado com a formulação de amido de milho em pó. Isso pode ser associado ao encapsulamento dos esporos na matriz de amido, que possibilitou uma maior proteção para os esporos, conseguindo manter a viabilidade um pouco superior no primeiro mês de armazenamento. Porém, ambas as formulações, com os microrganismos isolados ou combinados, perderam a viabilidade a temperatura ambiente logo no segundo mês de armazenamento.

É uma tendência o uso e estudo de materiais e formulações para encapsulamento de microrganismos para uso na agricultura, justamente devido a proteção dos microrganismos, que pode contribuir para uma vida útil prolongada e a liberação microbiana controlada das formulações (JOHN et al., 2011; SABERIRISEH et al., 2021). Uma técnica que poderia ser estudada futuramente na

formulação dos grânulos biofertilizantes visando aumentar a vida de prateleira do produto seria recobrir o grânulo com alguma camada de polímero, para evitar as trocas gasosas e proteger os microrganismos.

Os grânulos biofertilizantes, tanto produzidos com amido de milho em pó e com arroz cultivado, ao final do processo de produção e secagem mantinham a umidade final, em base seca, de aproximadamente 2,5%, o que não era suficiente para possibilitar o crescimento dos microrganismos na temperatura ambiente mesmo com os grânulos ricos em fontes de carbono (Figura 4.10). Contudo, apesar do microrganismo não se reproduzir no material durante o armazenamento, a vida de prateleira do produto não é alta a temperatura ambiente, sendo essa uma das maiores dificuldades encontradas na produção de insumos biológicos.

Figura 4. 10 - Imagens do armazenamento dos grânulos biofertilizantes em frascos de plástico com tampa a temperatura ambiente.



Esse trabalho demonstrou que a utilização da extrusão a frio se mostrou uma prática adequada para produção dos grânulos biofertilizantes, não diminuindo a viabilidade do produto durante o processamento. E o processo desenvolvido para produção do grânulo, de fato provou que o GB funciona como um biorreator granular.

Para aumentar a vida de prateleira desse produto, futuramente são necessários estudos avaliando diferentes tipos de embalagens e atmosfera controlada no interior das mesmas, avaliando a redução dos níveis de oxigênio, para diminuir ao máximo a atividade metabólica dos fungos. Além disso, um estudo sobre as dimensões do GB (diâmetro e comprimento) e a cinética de secagem para obter os menores valores possíveis de atividade de água no produto podem contribuir para melhoria da vida de prateleira do grânulo biofertilizante.

Com relação as formulações avaliadas, observou-se que a adição do glicerol reduziu a viabilidade do produto mesmo quando armazenado a temperatura de 4 °C demonstrando que esse pode ser um componente retirado da formulação.

A utilização direta do arroz de cultivo após a CES (onde os microrganismos são adicionados em sua totalidade a formulação), além de reduzir os resíduos gerados pela etapa de produção microbiana, reduz as etapas de extração dos microrganismos e a adição de outras fontes de carbono (amido de milho). Isso torna o processo desenvolvido nesse trabalho mais sustentável e diminui o custo de produção do grânulo biofertilizante, sendo um importante diferencial da formulação.

Ademais, o processo desenvolvido nesse trabalho para a produção dos GBs abre porta para o estudo de diferentes carreadores e microrganismos, dependendo da finalidade desejada do bioproduto.

3.3 APLICAÇÃO DOS GRÂNULOS BIOFERTILIZANTES NO CULTIVO DE TOMATE EM RIZOTRON

Os grânulos formulados com 70% de rocha fosfática Pratápolis, 25% de arroz cultivado (com *T. asperelloides*, *A. niger* e a combinação desses microrganismos) e 5% de gel de amido (contendo 15% de amido, 5% de glicerol e 80% de água) foram utilizados nos experimentos em rizotron. Nas Figuras 4.11 e 4.12 estão apresentadas as imagens das etapas da produção dos GBs com a utilização do arroz colonizado com *T. asperelloides* e *A. niger*, respectivamente.

Figura 4. 11 - Imagens do arroz colonizado com *Trichoderma asperelloides* após 7 dias de cultivo, arroz batido; amido gelatinizado incorporado no arroz e o grânulo biofertilizante após a extrusão a frio.



Figura 4. 12 - Imagens do arroz colonizado com *Aspergillus niger* após 7 dias de cultivo, arroz batido; amido gelatinizado incorporado no arroz e o grânulo biofertilizante após a extrusão a frio.



O diâmetro da haste da planta, a altura da planta e o comprimento da raiz da planta foram avaliados ao longo do desenvolvimento das plantas. Os resultados

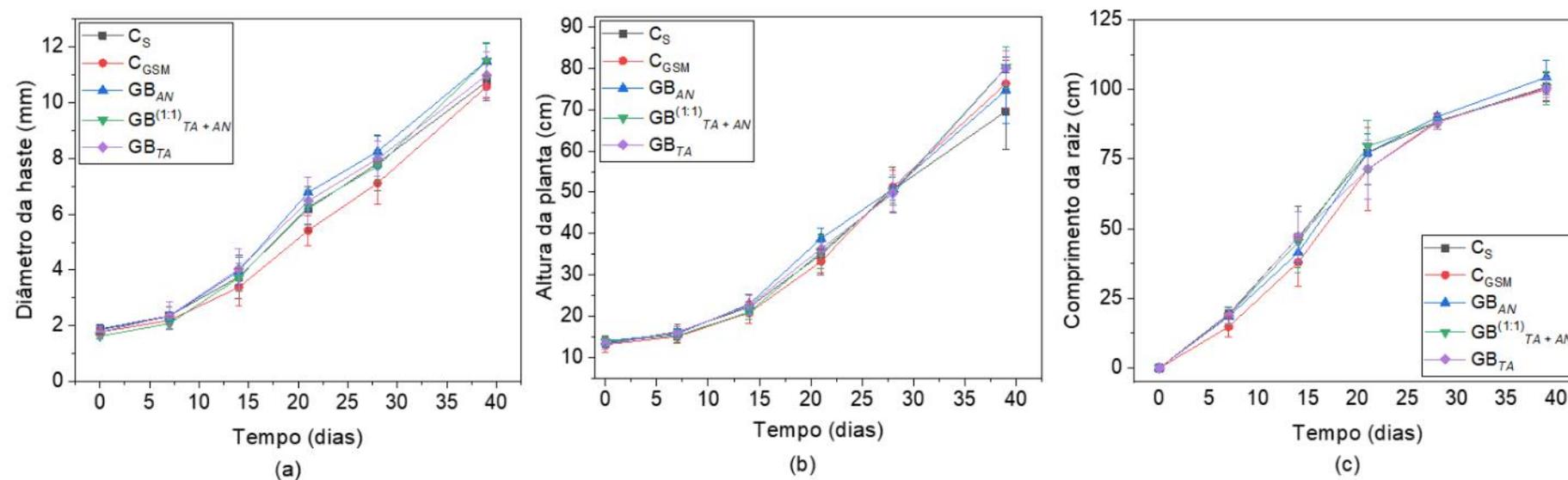
dessas variáveis estão apresentados na Figura 4.13, na qual é observada a mesma tendência de crescimento em todos os tratamentos.

Ao final do experimento foi avaliado o volume da raiz, massa fresca e seca da raiz e da parte aérea da planta, a área da raiz, a atividade de β -glicosidase do solo e o fósforo lábil extraído através de resina. Também foram calculadas as taxas de crescimento da planta (cm/dia), da raiz (cm/dia) e do diâmetro (mm/dia) e a mudança na altura, diâmetro e comprimento de raiz (final – inicial) das plantas e a diferença percentual das mesmas variáveis. Os resultados obtidos passaram por tratamento estatístico onde primeiramente foi avaliado a homogeneidade de variância pelo teste de Bartlett e a partir desse resultado ou foi utilizada a ANOVA e posterior teste paramétrico (Duncan) ou o teste não paramétrico (Kruskal-Wallis), seguindo o esquema apresentado na Figura 4.14.

As variáveis que apresentaram diferenças significativas pelo teste paramétrico de Duncan com significância de 95% foram a altura final da planta (cm) e as variáveis calculadas a partir da altura das plantas, sendo a taxa de crescimento da altura da planta (cm/dia) e a mudança de altura da planta (cm), apresentados na Tabela 4.11 e Figura 4.15. No controle (C_S) somente com o substrato os valores foram estatisticamente inferiores de altura da planta, taxa de crescimento da altura da planta e a mudança da altura final para a inicial comparados com os tratamentos onde havia a presença do *T. asperelloides* (GB_{TA}) tanto isolado como combinado com o *A. niger* ($GB^{(1:1)}_{TA+AN}$). A porcentagem de incremento desses tratamentos em relação ao controle variou de 11 a 17%. E apesar de não ter diferença estatística entre os tratamentos C_{GSM} e GB_{AN} com relação ao controle (C_S) houve também um incremento de 7 a 14% (Tabela 4.11).

Esse resultado é um indicativo de que a presença do *T. asperelloides* favoreceu o crescimento da altura das plantas de tomate. Além de controlar a murcha do *Fusarium*, a cepa de *T. asperellum* avaliada por Al-Askar et al. (2021) também apresentou resultados promissores no desenvolvimento das plantas de tomate.

Figura 4. 13 - Perfil temporal de crescimento das plantas (a) diâmetro da haste das plantas de tomate, em mm; (b) altura da planta, em cm; e (c) o comprimento da raiz, em cm, dos diferentes tratamentos. Onde, C_S – Controle com substrato; C_{GSM} – Controle com grânulo sem microrganismos; GB_{AN} – Grânulo biofertilizante com *Aspergillus niger*; $GB^{(1:1)}_{TA + AN}$ – Grânulo biofertilizante combinado de *Trichoderma asperelloides* e *A. niger*; GB_{TA} – Grânulo biofertilizante com *T. asperelloides*.



As demais variáveis avaliadas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas pelo teste paramétrico.

Figura 4. 14 - Fluxograma do tratamento estatístico realizado no experimento do rizotron.

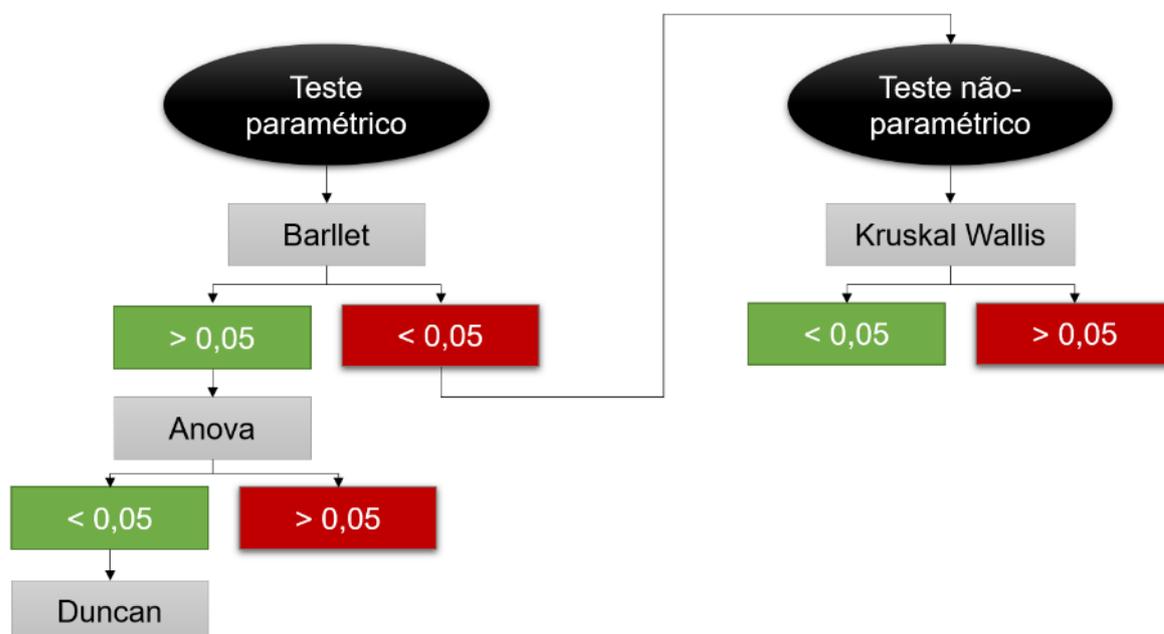
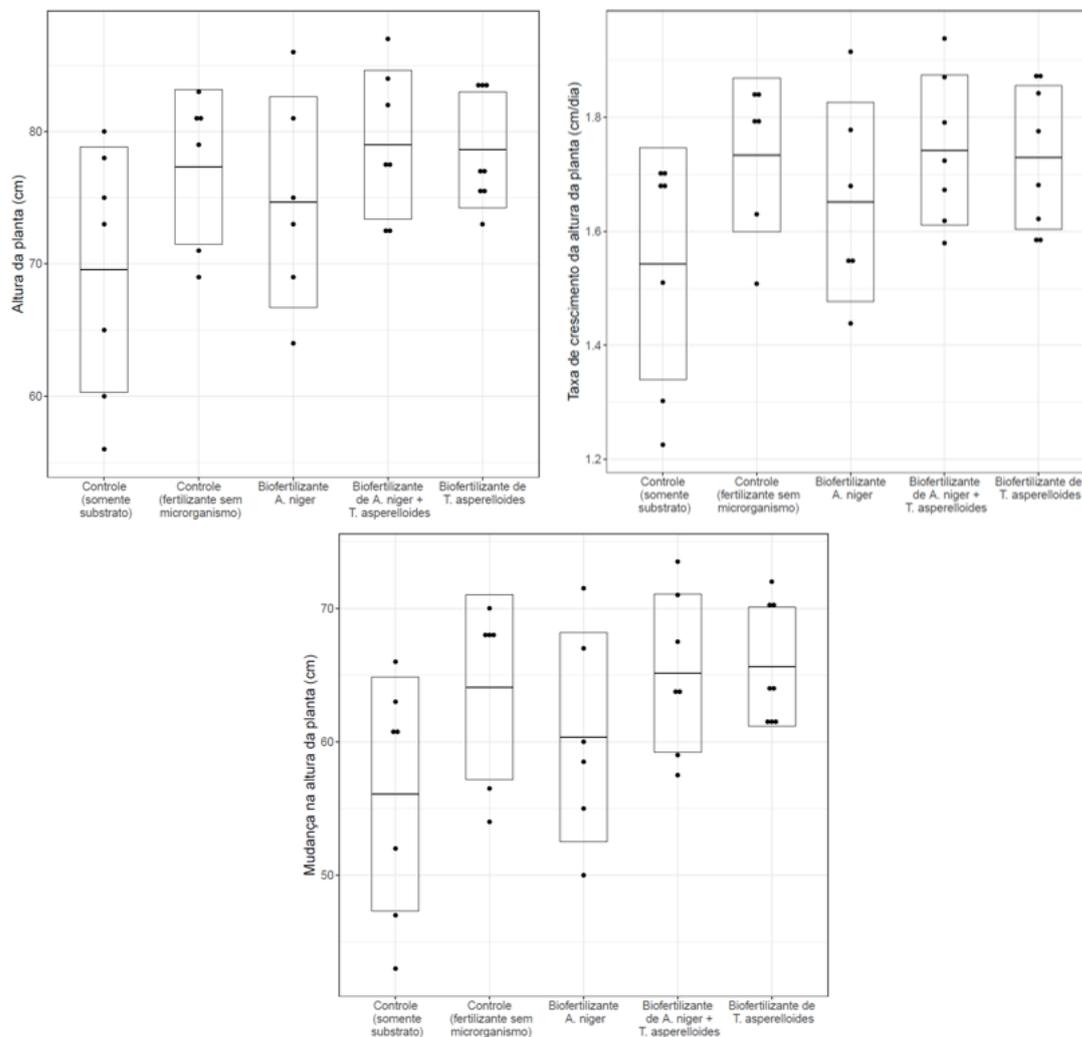


Tabela 4. 11 - Resultados médios das variáveis com diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Duncan do cultivar de tomate em rizotron.

Tratamento	Altura da planta (cm)	Taxa de crescimento da altura (cm/dia)	Mudança na altura (cm)
C _s	69,57 b	1,54 b	56,07 b
C _{GSM}	77,33 ab (11,1%)	1,73 a (12,3%)	64,08 ab (14,3%)
GB _{AN}	74,67 ab (7,3%)	1,65 ab (7,1%)	60,34 ab (7,6%)
GB ^(1:1) _{TA+AN}	79 a (13,5%)	1,71 a (11%)	65,15 a (16,2%)
GB _{TA}	78,63 a (13%)	1,73 a (12,3%)	65,63 a (17%)

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). Valores entre parênteses indicam a % de incremento em relação ao controle.

Figura 4. 15- Diagrama de caixas das variáveis que apresentaram diferenças significativas pelo teste paramétrico de Duncan.



Pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, também com um nível de confiança de 95%, as variáveis que apresentaram diferenças significativas estão apresentadas na Tabela 4.12 e Figura 4.16. Pode-se observar que a massa fresca da planta apresentou valores estatisticamente superiores para o tratamento com o grânulo biofertilizante inoculado com *A. niger* (GB_{AN}), em relação aos demais tratamentos, com um incremento de 13% comparado ao tratamento controle. Porém, esse resultado tem uma variação grande e maiores erros associados a essa medida devido a quantidade de água da planta, sendo um resultado mais aceito em ensaios com plantas a massa seca da planta.

A massa seca da planta, em g, no tratamento com *A. niger* (GB_{AN}), foi superior estatisticamente ao controle com grânulo sem microrganismos (C_{GSM}) e do grânulo combinado (GB^(1:1)_{TA+AN}). Porém, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o tratamento com os grânulos biofertilizantes com *A. niger* (GB_{AN}), o grânulo com *T. asperelloides* (GB_{TA}) e o controle com o substrato (C_S). Apesar de não haver diferença estatística entre o GB_{AN} e o C_S a porcentagem de incremento do tratamento com *A. niger* na massa seca da parte aérea da planta foi de 15,3% quando comparado ao tratamento controle. Esse é um indicativo de que o *A. niger* de fato conseguiu disponibilizar o P presente no grânulo para a planta.

Tabela 4. 12 - Resultados médios das variáveis que apresentaram diferenças estatisticamente significativas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis no experimento de plantas de tomate em rizotron para os diferentes tratamentos controles e com grânulos de *A. niger* e *T. asperelloides* isolados e combinados.

Tratamento	Massa fresca planta (g)	Massa seca planta (g)	β -glicosidase do solo ($\mu\text{g p-nitrofenol/g}_{\text{solo}\cdot\text{h}}$)	Mudança do diâmetro (%)
C _S	237,29 b	22,99 ab	177,41 b	472,30 b
C _{GSM}	211,52 b (-10,9%)	20,97 b (-8,8%)	229,20 ab (29,2%)	492,31 ab (4,2%)
GB _{AN}	270,02 a (13,7%)	26,51 a (15,3%)	331,10 a (86,6%)	518,65 ab (9,8%)
GB ^(1:1) _{TA+AN}	235,92 b (-0,6%)	21,76 b (-5,3%)	236,72 ab (33,4%)	605,62 a (28,2%)
GB _{TA}	244,39 b (3%)	24,00 ab (4,4%)	274,40 a (54,7%)	521,49 ab (10,4%)

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Valores entre parênteses indicam a % de incremento em relação ao controle.

Uma medida da saúde do solo é a avaliação de algumas enzimas presentes na fração de 0-10 cm do solo, dentre elas, a β -glicosidase, enzima relacionada ao ciclo do carbono (MENDES et al., 2018). Para essa enzima, diferenças significativas entre os tratamentos com os grânulos inoculados isolados (GB_{AN} e GB_{TA}) e o controle com o substrato (C_S) foram observadas. Os GBs com *T. asperelloides* e *A. niger* aumentaram a quantidade de β -glicosidase no substrato em 54,7% e 86,6%, respectivamente. A ação desses microrganismos de forma isolada no grânulo foi mais acentuada na produção de β -glicosidase, porém observou-se um incremento de 33,4% dessa enzima quando os microrganismos estavam combinados no grânulo

biofertilizante, apesar de não ter apresentado diferença estatística significativa. O tratamento com a presença do grânulo fertilizante não inoculado, não apresentou diferenças estatísticas na quantidade dessa enzima, mas também apresentou incremento de 29%. A β -glicosidase foi a variável que maior apresentou diferença de incremento dos GB inoculados quando comparado ao tratamento controle, o que demonstra uma melhoria na saúde do solo. E muitas vezes, a diferença nos cultivares é observada com uso sucessivo do solo após inoculado com microrganismos benéficos no solo.

O grânulo biofertilizante combinado ($GB^{(1:1)}_{TA+AN}$) somente apresentou diferença significativa estatisticamente com o controle com o substrato (C_s) para a variável da porcentagem de mudança do diâmetro, onde foi observado um incremento de 28,2%. Os grânulos com microrganismos isolados apresentaram um incremento de aproximadamente 10% no diâmetro e o grânulo sem inoculação de 4% apesar de não haver diferença estatisticamente significativa,

Conforme o grânulo fertilizante adquiria umidade do solo e os microrganismos se desenvolviam e modificavam sua estrutura, as raízes da planta penetravam e cresciam em contato direto com o grânulo, como apresentado na Figura 4.17. Esse comportamento pode ser favorável por fornecer uma ligação direta entre o biofertilizante e a raiz, sendo mais fácil o aproveitamento dos nutrientes e o contato entre os metabólitos produzidos pelos microrganismos e a raiz.

Poucas diferenças foram observadas, mesmo com os microrganismos isolados, isso se deve ao fato de que o substrato utilizado para o crescimento da planta era bastante rico em nutrientes e matéria orgânica, o que provavelmente suprimiu o efeito dos microrganismos. Possivelmente, em solos pobres a ação dos microrganismos seria mais evidenciada tanto na solubilização do fósforo como na absorção desse nutriente pela planta. Para uma visualização do experimento, a Figura 4.18 mostra as imagens dos rizotrons com os diferentes tratamentos avaliados.

Figura 4. 16 - Diagrama de caixas das variáveis que apresentaram diferenças significativas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

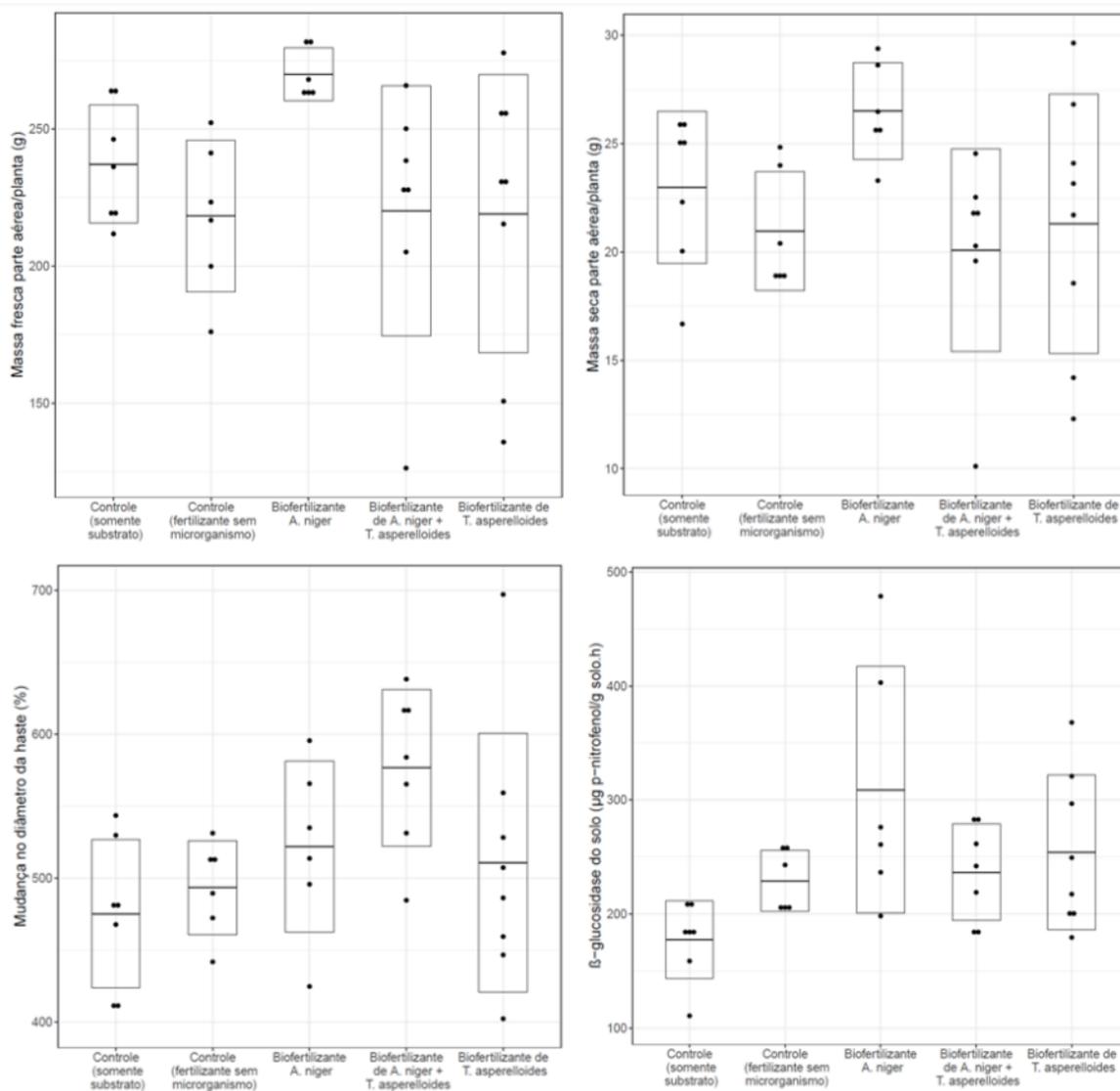


Figura 4. 17- Imagens das raízes da planta do tomate emaranhadas nos grânulos biofertilizantes.



Figura 4. 18 - Tomateiros desenvolvidos em rizotron nos diferentes tratamentos controles e com os biofertilizantes. Onde, C_S – Controle com substrato; C_{GSM} – Controle com grânulo sem microrganismos; GB_{AN} – Grânulo biofertilizante com *Aspergillus niger*, $GB^{(1:1)}_{TA + AN}$ – Grânulo biofertilizante combinado de *Trichoderma asperelloides* e *A. niger*, GB_{TA} – Grânulo biofertilizante com *T. asperelloides*.



3.4 FRACIONAMENTO DE FÓSFORO

O fracionamento do fósforo permite avaliar a dinâmica desse nutriente no solo, sua disponibilidade e capacidade de contribuir para a nutrição das plantas (GATIBONI et al., 2007; TIECHER et al., 2012). A Tabela 4.13 apresenta os resultados do fracionamento do substrato puro e após o cultivo de tomate no tratamento controle (C_S), que apresentam as frações de P mais lábeis para as mais recalitrantes, divididos em P_i (P inorgânico) e P_o (P orgânico).

Analisando o P total, o solo (substrato) utilizado apresenta altas quantidades de P. Subtraindo o P total do substrato puro com o P total do tratamento controle cultivado com a planta, observa-se que a planta absorveu aproximadamente 350 mg de P. A fração P_{iBIC} e P_{oBIC} juntamente com P_{RTA} são as frações que estão prontamente disponíveis para absorção, representando a principal forma de fornecimento de P para as plantas (TOKURA et al., 2011). Avaliando a diferença das frações do substrato puro para o substrato com o crescimento da planta (C_S), a depleção das formas mais lábeis de P (P_{RTA} e P_{iBIC}) foi tamponada principalmente pelas frações inorgânicas menos lábeis de $P_{iNaOH-0,1}$, $P_{iNaOH-0,5}$. O aumento da quantidade de P nas frações de P_{RTA} e $P_{oNaOH-0,1}$ no C_S quando comparado ao substrato puro sugere que houve a migração desse fósforo das outras frações não lábeis para a principalmente a fração lábil P_{RTA} .

O fracionamento do P da camada de 0-20 cm do substrato utilizado no experimento do rizotron nos diferentes tratamentos, foi realizado para entender o comportamento desse nutriente e como os microrganismos estavam atuando na dinâmica de disponibilização do fósforo. O tratamento estatístico realizado nos dados do fracionamento foi o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com intervalo de confiança de 95%, devido a homogeneidade de variância observada nas amostras. Os resultados do fracionamento do P com os diferentes tratamentos no crescimento do tomateiro estão descritos na Tabela 4.14.

Maior quantidade de P total foi observada nos tratamentos em que se foi colocado o grânulo fertilizante, com ou sem a presença de microrganismo, quando comparado ao tratamento controle com o substrato. O que era justamente a proposta da adição da rocha fosfática ao grânulo biofertilizante, para que o grânulo biofertilizante funcionasse com um micro-reator, onde a ação local do microrganismo pudesse solubilizar o P presente no grânulo.

Tabela 4. 13 - Fracionamento do fósforo inorgânico (Pi) e orgânico (Po) do substrato puro, sem cultivo de planta, e do tratamento controle com substrato (C_S) no cultivo do tomateiro em rizotron na camada de solo de 0 a 20 cm do rizotron.

Tratamento	Frações inorgânicas de fósforo (Pi)						Frações orgânicas de fósforo (Po)			P total
	Resina	NaHCO ₃	0,1 M NaOH	HCl	0,5 M NaOH	Residual	NaHCO ₃	0,1 M NaOH	0,5 M NaOH	
	mg/kg do solo									
Substrato puro	131,0	324,8	793,8	415,5	197,0	49,0	17,9	104,5	79,7	2113,2
C_S	183,6	214,4	558,0	385,4	114,5	20,7	21,3	150,9	42,6	1764,6

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas na fração de P_{RTA} entre os tratamentos controle (C_S) e os tratamentos com microrganismos isolados (GB_{AN} e GB_{TA}). Porém, justamente por essa ser a fração mais prontamente disponível para as plantas e, analisando a ordem de grandeza dos resultados, a diferença estatística não necessariamente indica que a presença dos microrganismos não afetou a disponibilização de P.

A presença da rocha fosfática influenciou na fração lábil Pi_{BIC} apresentando diferenças estatísticas entre os tratamentos que continham o grânulo biofertilizante, inoculados (GB_{AN} ; $GB^{(1:1)}_{TA+NA}$ e GB_{TA}), ou não inoculados (C_{GSM}), quando comparado com o tratamento controle com substrato (C_S). Esse resultado indica que parte da rocha presente ficou nessa fração prontamente disponível para a planta. A presença da matéria orgânica do substrato também pode ter influenciado na solubilização do P da rocha fosfática.

O grânulo biofertilizante com *A. niger* (GB_{AN}) apresentou diferenças estatísticas do tratamento controle (C_S) nas frações de $Pi_{NaOH-0,1}$, $Pi_{NaOH-0,5}$, indicando que a presença isolada desse microrganismo foi capaz de aumentar a quantidade de fósforo disponível nessas frações. Vale ressaltar aqui que, quando comparado o substrato puro com o tratamento controle (C_S) foi observada que justamente essas frações contribuíram de forma mais ativa na dinâmica do P. Sendo esse um indicativo de que a presença do *A. niger* pode contribuir na disponibilização de P para as plantas.

Vale lembrar que na seção 3.3 foi observado um incremento na massa seca da planta (15%) do grânulo com o *A. niger* isolado comparado com o controle. Além do mais, uso do *A. niger* em solos intemperizados pode contribuir para a dessorção de P presente nos próprios solos (NASCIMENTO et al., 2021), o que indica outra vantagem da aplicação desse microrganismo na busca de uma agricultura mais sustentável.

A presença isolada do *T. asperelloides* (GB_{TA}) gerou diferenças estatisticamente significativas na disponibilização de P da fração $Po_{NaOH-0,5}$ quando comparado aos tratamentos controles (C_S e C_{GSM}), indicando que o mecanismo de solubilização de P desse microrganismo isolado foi capaz de aumentar a quantidade de P presente nessa fração. Avaliando a Tabela 4.13, essa fração também se mostrou ativa na dinâmica do P no crescimento do tomateiro.

Tabela 4. 14 - Fracionamento do fósforo inorgânico (Pi) e orgânico (Po) na camada de solo de 0 a 20 cm do rizotron dos diferentes tratamentos com e sem a presença dos grânulos biofertilizantes no crescimento de tomateiro.

Tratamento	Frações inorgânicas de fósforo (Pi)						Frações orgânicas de fósforo (Po)			P total
	Resina	NaHCO ₃	0,1 M NaOH	HCl	0,5 M NaOH	Residual	NaHCO ₃	0,1 M NaOH	0,5 M NaOH	
	mg/kg do solo									
C_S	183,6 a	214,4 b	558,0 bc	385,4 c	114,5 b	20,7 b	21,3 a	150,9 a	42,6 b	1764,6 c
C_{GSM}	133,3 c	265,5 a	580,4 c	1666,1 a	155,8 ab	19,6 b	30,9 a	164,2 a	30,0 b	3245,0 a
GB_{AN}	168,0 ab	281,0 a	795,0 a	1622,5 ab	208,0 a	19,1 b	27,5 a	157,9 a	38,3 ab	3317,4 a
GB^(1:1)_{TA+AN}	158,2 bc	251,5 a	662,2 abc	1137,7 b	132,4 ab	24,7 a	34,8 a	164,6 a	38,4 ab	2623,3 b
GB_{TA}	169,3 ab	263,5 a	782,3 ab	1437,7 ab	163,7 ab	24,9 a	34,8 a	158,8 a	57,2 a	3557,8 a

Onde: C_S – Controle com substrato; C_{GSM} – Controle com grânulo sem microrganismos; GB_{AN} – Grânulo biofertilizante com *A. niger*; GB^(1:1)_{TA+AN} – Grânulo biofertilizante combinado de *T. asperelloides* e *A. niger*; GB_{TA} – Grânulo biofertilizante com *T. asperelloides*. Letras diferentes entre as colunas demonstram diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com o teste de Kruskal-Wallis (p<0,05).

O tratamento com o grânulo biofertilizante combinado ($GB^{(1:1)}_{TA+NA}$) apresentou quantidades inferiores de P total, com diferença estatisticamente significativa, quando comparado aos demais tratamentos com grânulos com microrganismos isolados ou o grânulo sem inoculação, podendo ser devido a algum erro experimental, visto que foi adicionado a mesma quantidade de grânulos em todos os tratamentos. Esse fato pode ter influenciado nos resultados um pouco inferiores aos observados com a presença dos microrganismos isolados e ao grânulo sem microrganismos.

Com exceção do P total, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre todas as frações de P analisadas quando comparados os grânulos contendo *T. asperelloides* isolado (GB_{TA}) ou combinado com o *A. niger* ($GB^{(1:1)}_{TA+NA}$), o que é uma evidência de que a presença do *A. niger* não influenciou de forma ativa na ação do *T. asperelloides* na dinâmica de P. Novamente, com exceção do P total, a única fração com diferença estatística significativa entre os tratamentos de *A. niger* isolado (GB_{AN}) e a combinação dos microrganismos ($GB^{(1:1)}_{TA+NA}$) foi na fração de $P_{Residual}$. Porém, analisando a quantidade, a variação entre os tratamentos nessa fração foi de apenas 6 mg/kg do solo, o que dentro da quantidade total de P não se mostra expressivo. Portanto, em linhas gerais pode se colocar que nos tratamentos com grânulos biofertilizantes inoculados, apesar de a quantidade de P total ter se apresentado diferente estatisticamente a dinâmica do P não foi afetada.

A fração de P que apresentou diferenças com maiores ordens de grandeza entre o tratamento controle (C_S) e os demais tratamentos foi a fração de P_{HCl} . Essa diferença pode ser explicada devido a presença da rocha fosfática, que nessa etapa, onde a extração realizada é uma extração ácida, o P da rocha, que estava presente nos grânulos foi liberado, independente da inoculação ou não de microrganismos. Nessa fração também foi observada uma diferença estatística entre o tratamento controle (C_{GSM}) e o tratamento com microrganismos combinados ($GB^{(1:1)}_{TA+NA}$), porém essa diferença observada provavelmente está relacionada a menor quantidade de P total do tratamento ($GB^{(1:1)}_{TA+NA}$).

Pelo fato do substrato de cultivo utilizado nesse experimento ser rico, o efeito do biofertilizante não foi tão evidente, nem para a dinâmica de P nem para o crescimento das raízes e das plantas. Acredita-se que o efeito do grânulo biofertilizante produzido apresentaria resultados mais expressivos se utilizado em

solos com baixo teor nutricional. Experimentos em solos com baixa fertilidade e pHs contrastantes, realizados com *T. harzianum* e *Bacillus amyloliquefaciens*, melhoraram o crescimento de tomateiros e aquisição de P quando esse era o principal nutriente limitante, variando de forma específica com o tipo de solo e o fertilizante aplicado (MPANGA et al., 2018), o que demonstra que a capacidade de atuação dos inoculantes é influenciada pelos tipos de solo, qualidade nutricional e o tipo de fertilização aplicada, o que traz algumas dificuldades na reprodutibilidade do uso de produtos biológicos na agricultura, porém reforça o potencial de aplicação de microrganismos na agricultura e a necessidade de estudos avaliando diferentes condições de aplicações.

Outro fator importante é o uso sucessivo do solo inoculado, pois não necessariamente é observado nos primeiros ciclos da planta a melhoria da qualidade nutricional do fósforo disponível no solo, principalmente pelo fato de a rocha ser uma fonte mineral de fósforo pouco solúvel, podendo levar alguns ciclos para observar a diferença na disponibilização do P e na ação dos próprios microrganismos.

4. CONCLUSÕES

- Das formulações avaliadas com diferentes quantidades de arroz cultivado, a formulação sem gel de amido apresentou menor queda de viabilidade quando comparada as demais na temperatura de armazenamento de 4 °C.
- A presença do glicerol no gel de amido resultou em queda mais acentuada na viabilidade e diminuição na resistência mecânica de compressão diametral do grânulo.
- Os grânulos biofertilizantes que continham *T. asperelloides* apresentaram diferenças estatisticamente significativas na altura da planta de tomate.
- Pelo fato de o substrato utilizado, nos experimentos de cultivo de plantas de tomate em rizotron ser bastante rico nutricionalmente, o efeito dos biofertilizantes possivelmente foi suprimido, tanto no que se relaciona ao crescimento e desenvolvimento das plantas como na percepção da dinâmica de P. Em solos com menor qualidade nutricional esse efeito poderia parecer mais pronunciado e apresentar maiores diferenças estatisticamente significativas com o uso dos biofertilizantes.
- A combinação dos microrganismos no grânulo biofertilizante não parece ter afetado a dinâmica de P observada no fracionamento de P.
- O grânulo com *A. niger* aumentou a quantidade de P das frações que justamente apresentaram maior dinâmica na migração de P para as frações mais lábeis.

CONCLUSÕES FINAIS

A produção de biofertilizantes granulares contendo fontes minerais não processadas com microrganismos combinados capazes de acessar essas fontes, disponibilizar os nutrientes e/ou fornecer proteção e promoção de crescimento das plantas se mostrou uma potencial alternativa para aplicação na agricultura e abrindo portas para uma ampla possibilidade de estudos. Pontualmente, pode-se concluir que:

- As diferenças nas características físico-químicas das rochas influenciaram na solubilização do P presente, e que a solubilização microbiana desse material teve forte correlação estatística com a capacidade dos microrganismos de acidificar o meio.
- Os experimentos realizados em cultivos submersos demonstraram a capacidade do fungo *Aspergillus niger* como solubilizador de fontes fosfatadas minerais. No mesmo tipo de experimento observou-se também que, a partir dos grânulos biofertilizantes produzidos, a solubilização teve efeito acentuado quando comparado à rocha livre (não aprisionada ao grânulo), mostrando que, a interação dos microrganismos com a rocha foi eficaz para aumento da disponibilização de P.
- A avaliação *in vitro* do controle biológico da cepa de *Fusarium oxysporum* demonstrou que a presença do *A. niger* no grânulo biofertilizante não afetou a capacidade de controle biológico do *Trichoderma asperelloides*, o que evidenciou o potencial de atuação conjunta dessas cepas.
- A utilização dos próprios grãos de arroz cultivados se mostrou interessante visto que o substrato, além de levar o microrganismo, carrega os metabólitos produzidos e serve como fonte de nutrientes para o microrganismo se desenvolver quando adicionado ao solo. Além do mais, sua utilização diminui etapas do processo de produção do grânulo, evita a geração de resíduos e o desperdício dessa fonte, tão rica em nutrientes, utilizada no processo industrial do *Trichoderma*.

- A viabilidade dos grânulos biofertilizantes se mostrou bastante afetada com a temperatura de armazenamento do produto.
- A ação dos grânulos biofertilizantes no cultivo em rizotron de plantas de tomate demonstrou que a presença do *T. asperelloides* (isolado ou combinado ao *A. niger*) no cultivo aumentou, com significância estatística, a altura das plantas de tomate quando comparado ao tratamento controle (sem a presença de microrganismo ou fertilização).
- No mesmo experimento, através da avaliação da dinâmica das frações do P do solo (substrato de cultivo) utilizado, o *A. niger* apresentou uma diferença estatística significativa com o tratamento controle (sem a presença de nenhum microrganismo ou fertilização), nas quantidades das frações de P que contribuíram de forma mais ativa na dinâmica de absorção de P pelas plantas, o que demonstrou o potencial desse microrganismo para ser utilizado na agricultura.
- Num contexto geral, o grânulo biofertilizante carregando rocha fosfática e microrganismo pode ser uma opção mais ecológica e barata para aumentar a disponibilidade de P das plantas.
- O processo desenvolvido para a produção do grânulo biofertilizante e os experimentos realizados comprovaram a ação desse grânulo como um micro-reator, onde os microrganismos presentes nesse grânulo são capazes de utilizar e disponibilizar as fontes de nutrientes carreadoras do grânulo.

Sugestões para trabalhos futuros

- Avaliar a influência dos metabólitos, que foram carregados juntos com o arroz de cultivo para a produção do grânulo biofertilizante, na solubilização das rochas fosfáticas.
- Estudar as proporções de carreador e arroz de cultivo, e diferentes microrganismos na formulação, de forma isolada ou em co-cultivo.
- O processo desenvolvido de produção do grânulo biofertilizante é passível de escalonamento e permite o estudo de diferentes carreadores, não se limitando somente a utilização da rocha fosfática, mas podendo ser avaliadas outras fontes minerais de baixa solubilização, resíduos orgânicos, adição de macro e micronutrientes.
- Avaliar uso somente de arroz de cultivo na formulação, podendo aumentar a quantidade de microrganismos por grama de produto.
- Desenvolver estudos recobrando o grânulo biofertilizante com diferentes polímeros biodegradáveis visando o aumento da vida de prateleira dos produtos.
- Avaliar a influência de diferentes condições de armazenamento e embalagens para manutenção da viabilidade dos microrganismos.
- Estudar os efeitos das dimensões do grânulo na secagem e manutenção da viabilidade dos fungos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, M. et al. Perspectives of microbial inoculation for sustainable development and environmental management. **Frontiers in Microbiology**, v. 9:2992. 2018.

AL-ASKAR, A. A. et al. Crude citric acid of *Trichoderma asperellum*: tomato growth promotor and suppressor of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Plants**, v. 10, n. 2, p. 1–19, 2021.

ALAMRI, S.; HASHEM, M.; MOSTAFA, Y.S. *In vitro* and *in vivo* biocontrol of soil-borne phytopathogenic fungi by certain bioagents and their possible mode of action. **Biocontrol Science**, v.17, n. 4, p. 155-167, 2012.

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, p. 1–8, 2017.

ANEES, M. et al. Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. **Fungal Biology**, v. 114, n. 9, p. 691–701, 2010.

ASHOK, A. et al. Design of solid state bioreactor for industrial applications: an overview to conventional bioreactors. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 11–18, 2017.

BAHAR, N. H. A. et al. Meeting the food security challenge for nine billion people in 2050: What impact on forests? **Global Environmental Change**, v. 62, n. August 2019, p. 102056, 2020.

BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, 47, n. 2, p. 175–185, 2012.

BASHAN, Y. et al. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). **Plant and Soil**, v. 378, n. 1–2, p. 1–33, 2014.

BAYER, C. et al. Changes in soil organic matter fractions under subtropical no-till cropping systems. **Soil Science Society of America Journal**, v. 65, n. 5, p. 1473–1478, 2001.

BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M. J.; BAKKER, P. A. H. M. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 8, p. 478–486, 2012.

BETTIOL, W.; SILVA, J. C.; CASTRO, M. L. M. P. Uso atual e perspectivas do *Trichoderma* no Brasil. In: MEYER, Maurício Conrado; MAZARO, Sérgio Miguel; SILVA, Juliano Cesar Da (org.). **Trichoderma uso na agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, p. 21–43, 2019.

BOLAN, N. S et al. Influence of low-molecular-weight organic acids on the solubilization of phosphates. **Biology and Fertility of Soils**, v. 18, n. 4, p. 311–319, 1994.

BROOKES, P. C.; POWLSON, D. S. Preventing phosphorus losses during perchloric acid digestion of sodium bicarbonate soil extracts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 32, n. 7, p. 671–674, 1981.

BUENO, V. H. P. et al. Biological control in Brazil. In: VAN LENTEREN, J. C.; BUENO, V. H. P.; LUNA, M. G.; COLMENAREZ, Y. C. (org.). **Biological control in Latin America and the Caribbean: its rich history and bright future**. Boston: CABI, p. 78–107, 2020.

CALLENS, K. et al. Microbiome: The Missing Link? - Science and Innovation for Health, Climate and Sustainable Food Systems., 2019.

CÁNOVAS, C. R. et al. Valorization of wastes from the fertilizer industry: Current status and future trends. **Journal of Cleaner Production**, v. 174, p. 678–690, 2018.

CHAUDHARY, T. et al. Techniques for improving formulations of bioinoculants. **3 Biotech**, v. 10, n. 5, p. 1–9, 2020.

CHAVES, A. P. Coletânea fertilizantes VI: Crítica ao modelo brasileiro de fertilizantes de alta solubilidade/Arthur Pinto Chaves, Carlos Alberto Ikeda Oba. - Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2004.

CHUANG, C. C. et al. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 43, n. 5, p. 575–584, 2007.

CNA & CEPEA. **10 de Março de 2021** www.cnabrazil.org.br. 2021. Disponível em:

https://www.cnabrazil.org.br/assets/arquivos/boletins/sut.pib_dez_2020.9mar2021.pdf
f. Acesso em: 25 maio. 2021.

CONAMA. **Resolução nº 436, de 22 de dezembro de 2011 do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA, “Dispõe sobre os limites de emissão de poluentes atmosféricos gerados na produção de fertilizantes, ácido sulfúrico, ácido nítrico e ácido fosfórico”**, 2011.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A. et al. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 149, n. 3, p. 1579–1592, 2009.

CORDELL, D.; DRANGERT, J. O.; WHITE, S. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. **Global Environmental Change**, v. 19, n. 2, p. 292–305, 2009.

CORDELL, D.; WHITE, S. Peak phosphorus: Clarifying the key issues of a vigorous debate about long-term phosphorus security. **Sustainability**, v. 3, n. 10, p. 2027–2049, 2011.

CORDELL, D.; WHITE, S. Life’s bottleneck: Sustaining the world’s phosphorus for a food secure future. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 39, p. 161–188, 2014.

COUTINHO, F. P.; FELIX, W. P.; YANO-MELO, A. M. Solubilization of phosphates in vitro by *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. **Ecological Engineering**, v. 42, p. 85–89, 2012.

DA COSTA SIMÕES, D.; CAIXETA-FILHO, J. V.; PALEKAR, U. S. Fertilizer distribution flows and logistic costs in Brazil: Changes and benefits arising from investments in port terminals. **International Food and Agribusiness Management Review**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 407–422, 2018.

DE ABREU, L. M.; PFENNING, L. H. O gênero *Trichoderma*. In: MEYER, Maurício Conrado; MAZARO, Sérgio Miguel; SILVA, Juliano Cesar Da (org.). **Trichoderma uso na agricultura**. [s.l.] : Embrapa, 2019. p. 163–179.

DE REZENDE, L. C. et al. Optimizing mass production of *Trichoderma asperelloides*

by submerged liquid fermentation and its antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 8, p. 1–14, 2020.

DENG, S.; POPOVA, I. Carbohydrate hydrolases. **Methods of Soil Enzymology**, [S. l.], v. 74078, n. 9, p. 185–209, 2015.

DÍAZ-GUTIÉRREZ, C. et al. *Trichoderma asperellum* as a preventive and curative agent to control *Fusarium* wilt in *Stevia rebaudiana*. **Biological Control**, v. 155, 2021.

DICK, W. A.; TABATABAI, M. A. Determination of orthophosphate in aqueous solutions containing labile organic and inorganic phosphorus compounds. **Journal of Environmental Quality**, v. 6, n. 1, p. 82–85, 1977.

DOS SANTOS, D. R. **Dinâmica do fósforo em sistemas de manejo de solos**. 2000. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

DRUZHININA, I. S. et al. *Trichoderma*: The genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 749–759, 2011.

FAO. **FAO Statistical Yearbook 2013 world food and agriculture** Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, 2013. DOI: 10.1017/CBO9781107415324.004. Disponível em: <http://www.fao.org/3/i3107e/i3107e00.htm>.

FAO. Food and Agriculture Organization - FAOSTAT. [S. l.], 2020. Disponível em: <http://www.fao.org/home/en/>.

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179–188, 2015.

FAYIGA, A. O.; NWOKE, O. C. Phosphate rock: Origin, importance, environmental impacts, and future roles. **Environmental Reviews**, v. 24, n. 4, p. 403–415, 2016.

FERREIRA, F. V.; MUSUMECI, M. A. *Trichoderma* as biological control agent: scope and prospects to improve efficacy. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 1–17, 2021.

FLORENCIO, C. et al. Secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated by submerged and sequential fermentation processes: Enzyme production for sugarcane bagasse hydrolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 90, p. 53–60, 2016.

FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant and Soil**, v. 321, n. 1–2, p. 35–59, 2009.

GADD, G. M. Fungal production of citric and oxalic acid: Importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes. **Advances in Microbial Physiology** v. 41, p 47-92, 1999.

GARCÍA-LÓPEZ, A. M.; AVILÉS, M.; DELGADO, A. Plant uptake of phosphorus from sparingly available P- sources as affected by *Trichoderma asperellum* T34. **Agricultural and Food Science**, v. 24, n. 3, p. 249–260, 2015.

GARCÍA-LÓPEZ, A. M.; AVILÉS, M.; DELGADO, A. Effect of various microorganisms on phosphorus uptake from insoluble Ca-phosphates by cucumber plants. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 179, n. 4, p. 454–465, 2016.

GATIBONI, L. C. et al. Biodisponibilidade de formas de fósforo acumuladas em solo sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, n. 4, p. 691–699, 2007.

GIROTO, A. S. et al. Study of a nanocomposite starch-clay for slow-release of herbicides: Evidence of synergistic effects between the biodegradable matrix and exfoliated clay on herbicide release control. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 23, p. n/a-n/a, 2014.

GOLDSTEIN, A. H.; ROGERS, R. D.; MEAD, G. Mining by Microbe. **Nat Biotechnol**, v. 11, p. 1250–1254, 1993.

GREWAL, H. S.; KALRA, K. L. Fungal production of citric acid. **Biotechnology Advances**, v. 13, n. 2, p. 209–234, 1995.

GUPTA, R.; ANAND, G.; GAUR, R.; YADAV, D. Plant–microbiome interactions for sustainable agriculture: a review. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 27, n. 1, p. 165–179, 2021.

GUZMÁN-GUZMÁN, P. et al. *Trichoderma* species: Versatile plant symbionts. **Phytopathology**, v. 109, n. 1, p. 6–16, 2019.

GYANESHWAR, P. et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v. 245, n. 1, p. 83–93, 2002.

HARMAN, G. E. et al. *Trichoderma* species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43–56, 2004.

HEDLEY, M. J.; STEWART, J. W. B.; CHAUHAN, B. S. Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. **Soil Science Society of America Journal**, v. 46, n. 5, p. 970–976, 1982.

HERRERA-TÉLLEZ, V. I. et al. The protective effect of *Trichoderma asperellum* on tomato plants against *Fusarium oxysporum* and botrytis cinerea diseases involves inhibition of reactive oxygen species production. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 8, p. 1–13, 2019.

HOLDER, D. J. et al. Surface characteristics of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana*. **Microbiology**, v. 153, n. 10, p. 3448–3457, 2007.

HOYOS-LEYVA, J. D. et al. Microencapsulation using starch as wall material: A review. **Food Reviews International**, v. 34, n. 2, p. 148–161, 2018.

HUNTER, M. C. et al. Agriculture in 2050: Recalibrating targets for sustainable intensification. **BioScience**, v. 67, n. 4, p. 386–391, 2017.

HUSSAIN, S. et al. Impact of pesticides on soil microbial diversity, enzymes, and biochemical reactions. 1. ed. : **Elsevier Inc**, v. 102, 2009.

IFA. **International Fertilizer Association**. 2020. Disponível em: <https://www.fertilizer.org>. Acesso em: 6 jul. 2020.

JOHN, R. P. et al. Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 211–226, 2011.

JONES, D. L. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. **Plant and soil**, v. 205, n. 1, p. 25–44, 1998.

KAMINSKY, L. M. et al. The inherent conflicts in developing soil microbial inoculants.

Trends in Biotechnology, v. 37, n. 2, p. 140–151, 2019.

KARUPPIAH, V. et al. Co-cultivation of *Trichoderma asperellum* GDFS1009 and *Bacillus amyloliquefaciens* 1841 causes differential gene expression and improvement in the wheat growth and biocontrol activity. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–16, 2019.

KLAIC, R. et al. A novel combined mechanical-biological approach to improve rock phosphate solubilization. **International Journal of Mineral Processing**, v. 161, p. 50–58, 2017.

KLAIC, R. et al. Nanocomposite of starch-phosphate rock bioactivated for environmentally-friendly fertilization. **Minerals Engineering**, v. 128, p. 230–237, 2018a.

KLAIC, R. et al. Synergy of *Aspergillus niger* and components in biofertilizer composites increases the availability of nutrients to plants. **Current Microbiology**, v. 78, n. 4, p. 1529–1542, 2021.

KLAIC, R. et al. A fed-batch strategy integrated with mechanical activation improves the solubilization of phosphate rock by *Aspergillus niger*. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 6, n. 9, p. 11326–11334, 2018b.

KOBORI, N. N. et al. Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. **Fungal Biology**, v. 119, n. 4, p. 179–190, 2015.

KOUR, D. et al. Beneficial microbiomes for bioremediation of diverse contaminated environments for environmental sustainability: present status and future challenges. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 20, p. 24917–24939, 2021a

KOUR, D. et al. Biodiversity, current developments and potential biotechnological applications of phosphorus-solubilizing and -mobilizing microbes: A review. **Pedosphere**, v. 31, n. 1, p. 43–75, 2021b.

KPOMBLEKOU, K.; TABATABAI, M. A. Effect of organic acid on release of phosphorus from phosphate rocks. **Soil Science**, v. 158, n. 6, p. 441–453, 1994.

KRISHNARAJ, P. U.; DAHALE, S. Mineral phosphate solubilization: Concepts and

prospects in sustainable agriculture. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, v. 80, n. 2, p. 389–405, 2014.

LI, Y. T. et al. Effects of *Trichoderma asperellum* on nutrient uptake and *Fusarium* wilt of tomato. **Crop Protection**, v. 110, p. 275–282, 2018.

LIAN, B. et al. Microbial release of potassium from K-bearing minerals by thermophilic fungus *Aspergillus fumigatus*. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 72, n. 1, p. 87–98, 2008.

LODI, L. A. et al. Unveiling the solubilization of potassium mineral rocks in organic acids for application as K-fertilizer. **Research Square**, 2021.

LOMBARDI, N. et al. *Trichoderma* Applications on strawberry plants modulate the physiological processes positively affecting fruit production and quality. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1–17, 2020. COMPLETAR O NOME DOS AUTORES

LOTTERMOSER, B. Mine Wastes: Characterization, Treatment and Environmental Impacts. 3. ed.: **Springer**, 2010.

LUBNA; ASAF, S. et al. Salt tolerance of *Glycine max.*L induced by endophytic fungus *Aspergillus flavus* CSH1, via regulating its endogenous hormones and antioxidative system. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 128, p. 13–23, 2018.

MÄDER, P. et al. Soil fertility and biodiversity in organic farming. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1694–1697, 2002.

MAEHARA, L. et al. One-pot strategy for on-site enzyme production, biomass hydrolysis, and ethanol production using the whole solid-state fermentation medium of mixed filamentous fungi. **Biotechnology Progress**, v. 34, n. 3, p. 671–680, 2018..

MAPA. **Brasil deve ser destaque mundial no uso de bioinsumos nos próximos anos.** 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/brasil-deve-ser-destaque-mundial-no-uso-de-bioinsumos-nos-proximos-anos>. Acesso em: 13 jul. 2021.

MARKETS AND MARKETS. **Biopesticides Market by Type (Bioinsecticides, Biofungicides, Bionematicides, and Bioherbicides), Source (Microbials, Biochemicals, and Beneficial Insects), Mode of Application, Formulation, Crop Application, and Region - Global Forecast to 2025.** 2020. Disponível em:

- https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biopesticides-267.html?gclid=CjwKCAiA17P9BRB2EiwAMvwNyN1J3llag6ewvyHPSndQLQhV5r5r kpbhZIGCAR6Ju61h366uRJ0EhoCov0QAvD_BwE. Acesso em: 12 nov. 2020.
- MARTÍNEZ-MEDINA, A. et al. Deciphering the hormonal signaling network behind the systemic resistance induced by *Trichoderma harzianum* in tomato. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1–12, 2013.
- MARTÍNEZ-VIVEROS, O. et al. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by *Rhizobacteria*. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 10, n. 3, p. 293–319, 2010.
- MASCARIN, G. M.; JARONSKI, S. T. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 11, p. 1–26, 2016.
- MASCARIN, G. M. et al. Produção industrial de *Trichoderma*. In: MEYER, Maurício Conrado; MAZARO, Sérgio Miguel; SILVA, Juliano Cesar Da (org.). **Trichoderma: Uso na agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2019. p. 255–274.
- MATTEY, M. The production of organic acids. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 12, n. 1–2, p. 87–132, 1992.
- MENDES, G. de O. et al. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 239–249, 2014.
- MENDES, G. de O. et al. Oxalic acid is more efficient than sulfuric acid for rock phosphate solubilization. **Minerals Engineering**, v. 155, p. 106458, 2020.
- MENDES, I. C. et al. Bioanálise de solo: como acessar e interpretar a saúde do solo. **Circular Técnica**, 2018.
- MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. da. **Trichoderma uso na agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2019.
- MISHRA, J.; ARORA, N. K. Bioformulations for plant growth promotion and combating phytopathogens: a sustainable approach. In: ARORA, NAVEEN, K.; MEHNAZ, S.; BALESTRINI, R. (org.). **Bioformulations: for sustainable agriculture**. [s.l.] : Springer, p. 3–33, 2016.

MITTER, E. K. et al. Rethinking crop nutrition in times of modern microbiology: Innovative Biofertilizer Technologies. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 1–23, 2021.

MONTE, E.; BETTIOL, W.; HERMOSA, R. *Trichoderma* e seus mecanismos de ação para o controle de doenças de plantas. In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; DA SILVA, J.C. (org.). **Trichoderma uso na agricultura**. Brasília: Embrapa, 2019. p. 181–199.

MPANGA, I. K. et al. Soil type-dependent interactions of p-solubilizing microorganisms with organic and inorganic fertilizers mediate plant growth promotion in tomato. **Agronomy**, v. 8, n. 10, 2018.

MUÑIZ-PAREDES, F.; MIRANDA-HERNÁNDEZ, F.; LOERA, O. Production of conidia by entomopathogenic fungi: from inoculants to final quality tests. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 1–9, 2017.

MUÑOZ, G. A. et al. Comparison of aerial and submerged spore properties for *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 125, n. 1, p. 63–69, 1995.

MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 27, p. 31–36, 1962.

NAHAS, E. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 6, p. 567–572, 1996.

NASCIMENTO, J. M. et al. *Aspergillus niger* as a key to unlock fixed phosphorus in highly weathered soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 156, n. February, 2021.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, n. 436, p. 265–270, 1999.

NAYAK, A.; BHUSHAN, B. An overview of the recent trends on the waste valorization techniques for food wastes. **Journal of Environmental Management**, v. 233, , p. 352–370, 2019.

NETZKER, T. et al. Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–13, 2015.

OECD-FAO. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2015-2024**. 2015. Disponível em: <http://www.fao.org/3/i4738e/i4738e.pdf>. Acesso em: 25 maio. 2021.

ONU. **World Population Prospects 2019**, 2019. Disponível em: <https://population.un.org/wpp2019/>.

OWEN, D. et al. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorous acquisition. **Applied Soil Ecology**, v. 86, p. 41–54, 2015.

PAPAGIANNI, M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 244–263, 2007.

PATKOWSKA, E. et al. The influence of *Trichoderma harzianum* Rifai T-22 and other biostimulants on rhizosphere beneficial microorganisms of carrot. **Agronomy**, v. 10, n. 11, 2020.

PHILIPPOT, L. et al. Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 789–799, 2013.

PIKVOSKAYA, R. I. Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. **Microbiology**, v. 17, p. 362–370, 1948.

PINTO, Z. V.; LUCON, C. M. M.; BETTIOL, W. Controle de qualidade de produtos biológicos à base de *Trichoderma*. In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. da (org.). **Trichoderma: Uso na agricultura**. 1 ed ed. Brasília, DF: Embrapa, 2019. p. 275–295.

PLOTEGHER, F. **Estudo da cominuição na solubilidade da rocha fosfática Bayóvar**. 2014. Universidade Federal de São Carlos, [S. l.], 2014.

PRASHAR, P.; SHAH, S. Impact of fertilizers and pesticides on soil microflora in agriculture. In: Lichtfouse E. (eds) Sustainable Agriculture Reviews. **Sustainable Agriculture Reviews**, vol 19. Springer, Cham. 2016.

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, 2019a.

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, 2019b.

RABELLO, G. C. et al. Simultaneous biosynthesis of biomass-degrading enzymes using co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, n. 4, p. 236–243, 2014.

RAMÍREZ-CARIÑO, H. F. et al. Biocontrol of *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum* by *Trichoderma asperelloides* and *Bacillus paralicheniformis* in tomato plants. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 2, 2020.

RASHID, M. I. et al. Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. **Microbiological Research**, v. 183, p. 26–41, 2016.

RAVEN, J. A. Interactions between nitrogen and phosphorus metabolism. *In*: PLAXTON, W. C.; LAMBERS, H. (org.). **Annual Plants Review**. [s.l.] : John Wiley & Sons, Ltd, 2015. p. 187–214.

RAYMAEKERS, K. et al. Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management – A review. **Biological Control**, v. 144, p. 104-240, 2020.

REYES, I. et al. Solubilization of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV-induced mutants of *Penicillium rugulosum*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 12–13, p. 1741–1747, 2001.

RUTHERFORD, P. M.; DUDAS, M. J.; SAMEK, R. A. Environmental impacts of phosphogypsum. **The Science of the Total Environment**, v. 149, p. 1–38, 1994.

SABERI-RISEH, R. et al. Biopolymers for biological control of plant pathogens: Advances in microencapsulation of beneficial microorganisms. **Polymers**, v. 13, n. 12, p. 1–23, 2021.

SAHU, P. K.; BRAHMAPRAKASH, G. P. Formulations of Biofertilizers – Approaches and Advances. *In*: SINGH, Dhananjaya Pratap; SINGH, Harikesh Bahadur; PRABHA, Ratna (org.). **Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity**. [s.l.] : Springer India, 2016. p. 179–198.

SARMA, B. K. et al. Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: Readdressing for enhancing efficacy. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 87, p. 25–33, 2015.

SCHMOLL, M.; SCHUSTER, A. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 787–799, 2010.

SCHNEIDER, K. D. et al. Comparing phosphorus mobilization strategies using *Aspergillus niger* for the mineral dissolution of three phosphate rocks. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 1, p. 366–374, 2010.

SCHOEBITZ, M.; BELCHÍ, M. D. L. Encapsulation techniques for plant growth-promoting *Rhizobacteria*. In: ARORA, Naveen Kumar; MEHNAZ, Samina; BALESTRINI, Raffaella (org.). **Bioformulations: for Sustainable Agriculture**. [s.l.] : Springer, 2016. p. 251–265.

SCHOEBITZ, M.; LÓPEZ, M. D.; ROLDÁN, A. Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil-plant fertilization. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 33, n. 4, p. 751–765, 2013.

SHARMA, P. K.; GOTHALWAL, R. *Trichoderma*: A potent fungus as biological control agent. In: SINGH, J. S.; SENEVIRATNE, G. (org.). **Agro-Environmental Sustainability**. [s.l.] : Springer International Publishing, 2017. p. 113–125.

SHARMA, S. B. et al. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **Springer plus**, v. 2, n. 1, p. 1–14, 2013.

SHARPLEY, A. N. Soil phosphorus dynamics: agronomic and environmental impacts. **Ecological Engineering**, v. 5, n. 2–3, p. 261–279, 1995.

SHENOY, V. V.; KALAGUDI, G. M. Enhancing plant phosphorus use efficiency for sustainable cropping. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 7–8, p. 501–513, 2005.

SINGH, B. K. et al. Crop microbiome and sustainable agriculture. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 11, p. 601–602, 2020.

SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13–18, 2009.

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, p. 1–14, 2020.

STAMENKOVIĆ, S. et al. Microbial fertilizers: A comprehensive review of current findings and future perspectives. **Spanish Journal of Agricultural Research**, 2018.

STOCKWELL, V. O. et al. Mechanistically compatible mixtures of bacterial antagonists improve biological control of fire blight of pear. **Phytopathology**, v. 101, n. 1, p. 113–123, 2011.

STOJANOVIĆ, S. S. et al. *Bacillus* based microbial formulations: Optimization of the production process. **Hemijska Industrija**, v. 73, n. 3, p. 169–182, 2019.

STUMM, W. Coordinative interactions between soil solids and water - An aquatic chemist's point of view. **Geoderma**, v. 38, p. 19–30, 1986.

SYED AB RAHMAN, S. F. et al. Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. **Plant Science**, v. 267, 2017, p. 102–111, 2018.

TANDON, A. et al. Phosphate solubilization by *Trichoderma koningiopsis* (NBRI-PR5) under abiotic stress conditions. **Journal of King Saud University - Science**, v. 32, n. 1, p. 791–798, 2020.

TAYIBI, H. et al. Environmental impact and management of phosphogypsum. **Journal of Environmental Management**, v. 90, n. 8, p. 2377–2386, 2009.

THAMBUGALA, K. M. et al. Fungi vs. Fungi in Biocontrol: An overview of fungal antagonists applied against fungal plant pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 1–19, 2020.

TIAN, D. et al. A study of P release from Fe-P and Ca-P via the organic acids secreted by *Aspergillus niger*. **Journal of Microbiology**, v. 59, n. 9, p. 819–826, 2021.

TIECHER, T. et al. Forms of inorganic phosphorus in soil under different long term soil tillage systems and winter crops. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, n. 1, p. 271–282, 2012.

TILMAN, D. Global environmental impacts of agricultural expansion: The need for

sustainable and efficient practices. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 11, p. 5995–6000, 1999.

TOKURA, A. M. et al. Dinâmica das formas de fósforo em solos de textura e mineralogia contrastantes cultivados com arroz. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 33, n. 1, p. 171–179, 2011.

TOLEDO, M. C. M.; PEREIRA, V. P. A variabilidade de composição da apatita associada a carbonatitos. **Revista do Instituto Geológico**, v. 22, n. 112, p. 27–64, 2001.

UNEP. Phosphorus and Food Production. **UNEP YEAR BOOK 2011**, [S. l.], 2011.

VANDENKOORNHUYSE, P. et al. The importance of the microbiome of the plant holobiont. **New Phytologist**, v. 206, n. 4, p. 1196–1206, 2015.

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.

VASSILEV, N. et al. Formulation of microbial inoculants by encapsulation in natural polysaccharides: Focus on beneficial properties of carrier additives and derivatives. **Frontiers in Plant Science**, v. 11:270, p. 1–9, 2020.

VASSILEVA, M. et al. Multifunctional properties of phosphate-solubilizing microorganisms grown on agro-industrial wastes in fermentation and soil conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1287–1299, 2010.

VIMAL, S. R. et al. Soil-plant-microbe interactions in stressed agriculture management: A review. **Pedosphere**, v. 27, n. 2, p. 177–192, 2017.

WANG, S.Y. et al. Study of a high-yield cellulase system created by heavy-ion irradiation-induced mutagenesis of *Aspergillus niger* and mixed fermentation with *Trichoderma reesei*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–15, 2015.

WANJIKU KAMAU, J. et al. Soil fertility and biodiversity on organic and conventional smallholder farms in Kenya. **Applied Soil Ecology**, v. 134, p. 85–97, 2019.

WAQAS, M. et al. Endophytic fungi promote plant growth and mitigate the adverse effects of stem rot: An example of *Penicillium citrinum* and *Aspergillus terreus*.

Journal of Plant Interactions, v. 10, n. 1, p. 280–287, 2015.

WEI, Z.; JOUSSET, A. Plant breeding goes microbial. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 7, p. 555–558, 2017.

WHITELAW, M. A.; HARDEN, T. J.; HELYAR, K. R. Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, n. 655–665, 1999.

WIEDENHOEFT, A. C. **Plant nutrition**. [s.l.] : Chelsea House publishers, 2006.

WITHERS, P. J. A. et al. Transitions to sustainable management of phosphorus in Brazilian agriculture. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.

XAVIER, I. J.; HOLLOWAY, G.; LEGGETT, M.. Development of Rhizobial inoculant formulations. **Crop Management**, v. 3, n. 1, p. 1–6, 2004.

YANG, H. et al. Improving the imbalanced global supply chain of phosphorus fertilizers. **Earth's Future**, v. 7, n. 6, p. 638–651, 2019.

YANG, L.; LÜBECK, M.; LÜBECK, P. S. *Aspergillus* as a versatile cell factory for organic acid production. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, n. 1, p. 33–49, 2017.

YOO, S. J. et al. *Aspergillus terreus* JF27 promotes the growth of tomato plants and induces resistance against *Pseudomonas syringae* pv. tomato. **Mycobiology**, v. 46, n. 2, p. 147–153, 2018.

ZHU, J.; LI, M.; WHELAN, M. Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. **Science of the Total Environment**, v. 612, p. 522–537, 2018.