

LUSIENE BARBOSA SOUSA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFERTILIZANTE DE ROCHAS COM
MATERIAIS ORGÂNICOS E DE BIOPROTETOR COM QUITOSANA
FÚNGICA**

**RECIFE – PE
JULHO 2016**

LUSIENE BARBOSA SOUSA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFERTILIZANTE DE ROCHAS COM
MATERIAIS ORGÂNICOS E DE BIOPROTETOR COM QUITOSANA
FÚNGICA**

Tese apresentada ao programa da Pós-Graduação em Agronomia (Ciência do Solo) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Agronomia (Ciência do Solo).

Orientador: Newton P. Stamford, PhD.

**Co-orientadores: Carolina Etienne de
Rosália e Silva Santos, Dra.**

RECIFE – PE

JULHO 2016

Ficha Catalográfica

Soua, Lusiene Barbosa

Otimização de biofertilizante de rochas com materiais orgânicos e de bioprotetor com quitosana fúngica / Lusiene Barbosa Sousa. – Recife, 2016.

99 f. : il.

Orientador: Newton Pereira Stamford.

Tese (Doutorado em Ciências do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2016.

Inclui referências, anexo (s).

1. Húmus de minhoca 2. *Cunninghamella elegans* 3. Bactéria diazotrófica de vida livre 4. Gene rRNA 16S 5. *Fusarium solani* 6. Protetor contra fitopatogênicos
I. Stamford Newton Pereira, orientador II. Título

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFERTILIZANTE DE ROCHAS COM
MATERIAIS ORGÂNICOS E DE BIOPROTETOR COM QUITOSANA
FÚNGICA**

LUSIENE BARBOSA SOUSA

**Tese defendida e aprovada pela banca examinadora em 7 de julho de
2016.**

Orientador:

**Dr. Newton Pereira Stamford
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE**

Examinadores:

**Dra. Giselle Fracetto
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE**

**Dra. Luciana Oliveira Franco
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE**

**Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE**

**Dra. Lúcia Raquel Ramos Berger
Universidade Federal da Paraíba-UFPB**

A Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de realizar mais um sonho.

“Senhor, em ti se encontram todas as minhas fontes” (Sl 87:7)

A minha mãe Francisca B. Sousa, pelo seu amor e pela dedicação e carinho pôde me dar alegria e força para lutar em prol dos meus ideais.

Ao meu pai Antônio Fernandes Sousa e aos meus irmãos Antônio Fernandes Sousa filho; Rosangela Maria; Raquel, Raimunda Nonata; Josué e meus sobrinhos; João Pedro e Pedro Henrique. Que me acompanharam em cada momento, me dando força e coragem quando precisava.

DEDICO E OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo (PPGCS/UFRPE) pela qualidade que ele apresenta e pelo apoio durante a realização do curso.

À CAPES, pela concessão da bolsa durante o curso de doutorado.

À Usina Petribú, a Emlurb (Prefeitura de Recife), pela concessão de parte do material para estudo.

Ao meu orientador, prof. Newton Pereira Stamford, pela orientação, ensinamentos, dedicação e confiança.

A minha co-orientadora Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos, pela grande contribuição no início do trabalho e pelo exemplo de profissional.

À professora Ana Dolores pelo apoio e conselhos sempre bem muito dedicado.

Aos professores Emídio Cantídio Almeida de Oliveira, Brivaldo, Mateus Rosas Pai e Filho, Julia, pelos ensinamentos, os quais contribuíram na minha formação.

À Marta Cristina Freitas Silva pela contribuição no desenvolvimento do trabalho e pela sua dedicação ao grupo de microbiologia.

Ao aluno de iniciação científica Marllon Martins, pela contribuição no desenvolvimento do trabalho sempre disposto a ajudar.

Ao amigo Vinicius Gomes pela paciência em me ensinar, e ler meu trabalho e por ter fornecido parte do material, muito obrigada.

As verdadeiras amigas que fiz em Recife, pela força, companheiro e conselho, Emmanuella Vila Nova, Alexandra Andrade, Juliana Alves, Marta Cristina.

Aos meus amigos e amigas do Laboratório de Biotecnologia Ambiental: Cíntia, Marllon, Marta, Vinícius, Aleksandro; Juscélia; pelo convívio, carinho e todo apoio.

Aos colegas de curso: Danubia, Rhutana, André, Diego, Yuri, Stephany, Edivan e Suzana pela oportunidade de convívio e troca de experiências.

Aos funcionários, José Fernando (Zeca), Maria do Socorro e Josué pela atenção e profissionalismo.

MUITO OBRIGADA!

Deus é o nosso refúgio e a
nossa fortaleza, auxílio
sempre e presente na
adversidade.

Salmos 46:1

SUMÁRIO.....

Pág.

vii

LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO GERAL.....	xiii
GENERAL ABSTRACT.....	xv
1.INTRODUÇÃO GERAL.....	17
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1.Biofertilizante produzidos a partir de rochas fosfatadas e potássicas.....	18
2.2. Biofertilizante Misto e Bioprotetor.....	19
2.3. Materiais orgânicos para compor o biofertilizante misto.....	20
2.4.Importância dos fungos Mucorales para otimização do biofertilizante.....	23
2.5.Importância das bactérias diazotróficas de vida livre para otimização do biofertilizante.....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	27
CAPÍTULO I. SELEÇÃO DE DIFERENTES PROPORÇÕES DE MATERIAIS ORGÂNICOS PARA COMPOR O BIOFERTILIZANTE MISTO.....	35
RESUMO.....	36
ABSTRACT.....	38
INTRODUÇÃO.....	39
MATERIAL E MÉTODOS.....	40
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
CAPÍTULO II. BACTERIAS DIAZOTROFICAS DE VIDA LIVRE PARA USO NA PRODUÇÃO DE BIOFERTILIZANTE MISTO.....	53
RESUMO.....	54
ABSTRACT.....	56
INTRODUÇÃO.....	57
MATERIAL E MÉTODOS.....	58

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
CAPÍTULO III. OTIMIZAÇÃO DO BIOFERTILIZANTE MISTO ATRAVÉS DA INOCULAÇÃO COM FUNGOS DA ORDEM MUCORALES.....	81
RESUMO.....	82
ABSTRACT.....	83
INTRODUÇÃO.....	84
MATERIAL E MÉTODOS.....	85
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	87
CONCLUSÕES.....	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I. SELEÇÃO DE DIFERENTES PROPORÇÕES DE MATERIAIS ORGÂNICOS PARA COMPOR O BIOFERTILIZANTE MISTO	Pág
Tabela 1. Valores de pH nos tratamentos, em bandejas, durante diferentes períodos de incubação à temperatura ambiente.....	42
Tabela 2. Valores de Ca^{2+} nos substratos, incubado em bandejas, durante diferentes dias de incubação à temperatura ambiente.....	44
Tabela 3. Valores de Mg^{2+} nos substratos, incubado em bandejas, durante diferentes dias de incubação à temperatura ambiente.....	45

Tabela 4. Valores de P nos substratos, incubado em bandejas, durante diferentes dias de incubação à temperatura ambiente.....	46
Tabela 5. Valores de K ⁺ nos substratos, incubado em bandejas, durante diferentes dias de incubação à temperatura ambiente.....	47
CAPÍTULO II. BACTERIAS DIAZOTROFICAS DE VIDA LIVRE PARA USO NA PRODUÇÃO DE BIOFERTILIZANTE MISTO.	Pág
Tabela 1. Caracterização e localização das áreas onde foram coletadas as amostras de solo.....	59
Tabela 2. Caracterização química das amostras de solos utilizadas para a captura dos isolados bacterianos.....	60
Tabela 3. Identidade e cobertura das sequências de rRNA 16S comparadas com outras sequências depositadas no <i>GenBank</i> (NCBI).....	64
Tabela 4. Valores médios dos parâmetros avaliados nos materiais utilizados para compor as proporções (2:3:1 e 3:2:1)	65
CAPÍTULO III. OTIMIZAÇÃO DO BIOFERTILIZANTE MISTO ATRAVÉS DA INOCULAÇÃO COM FUNGOS DA ORDEM MUCORALES.	Pág
Tabela 1. Valores de fósforo nos bioprotetores, incubados em bandejas, durante diferentes dias de incubação à temperatura ambiente.....	89
Tabela 2. Valores de Potássio nos bioprotetores, incubados em bandejas, durante diferentes dias de incubação à temperatura ambiente.....	90

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I. SELEÇÃO DE DIFERENTES PROPORÇÕES DE MATERIAIS ORGÂNICOS PARA COMPOR O BIOFERTILIZANTE MISTO	Pág
Figura 1. Teor de N (g kg ⁻¹) e C (g kg ⁻¹) em diferentes tratamentos produzidos a partir de materiais orgânicos (torta de filtro; húmus de minhoca; composto orgânico) inoculados com bactérias diazotróficas de vida livre.....	48
CAPÍTULO II. BACTERIAS DIAZOTROFICAS DE VIDA LIVRE PARA USO NA PRODUÇÃO DE BIOFERTILIZANTE MISTO.	Pág
Figura 1. pH do biofertilizantes misto inoculado com diferentes bactérias diazotróficas de vida livre, e avaliado em diferentes períodos de incubação. ▲-NBF 6= bactérias diazotróficas de vida livre S6; ▲-NBF 2= bactérias diazotróficas de vida livre S2; ■-NBF 1= bactérias diazotróficas de vida livre 1001.....	65

Figura 2. Teor de nitrogênio-N g kg⁻¹ (a) e fosforo-P g kg⁻¹ (b) adicionados ao biofertilizantes misto inoculado com diferentes bactérias diazotróficas de vida livre, e avaliado em diferentes períodos de incubação. ▲-NFB3= bactérias diazotróficas de vida livre 1003; ◇-NFB2= bactérias diazotróficas de vida livre S2; ■-NFB4= bactérias diazotróficas de vida livre S4; □-NBF1= bactérias diazotróficas de vida livre 1001.....

67

Figura 3. Teor de potássio-K g kg⁻¹ adicionados ao biofertilizantes misto inoculado com diferentes bactérias diazotróficas de vida livre, e avaliado em diferentes períodos de incubação. ◆-NBF 3= bactérias diazotróficas de vida livre 1003; □-NBF 1= bactérias diazotróficas de vida livre 1001.....

68

Figura 4. Teor de carbono no biofertilizantes misto em função da inoculação de diferentes bactérias diazotróficas de vida livre neste substrato.....

69

Figura 5. pH do biofertilizantes misto inoculado com diferentes bactérias diazotróficas de vida livre, e avaliado em diferentes períodos de incubação. ◆-NBF6= bactérias diazotróficas de vida livre S6; ▲-NBF7= bactérias diazotróficas de vida livre S7; ■-NBF1= bactérias diazotróficas de vida livre 1001.....

70

Figura 6. Teor de nitrogênio-N g kg⁻³ (a) adicionados ao biofertilizantes misto inoculado com diferentes bactérias diazotróficas de vida livre, e avaliado em diferentes períodos de incubação. ■-NFB 3= bactérias diazotróficas de vida livre 2003; ◆-NBF 6=bactérias diazotróficas de vida livre S6; ▲-NFB 4= bactérias diazotróficas de vida livre S4.....

72

Figura 7. Teor de fosforo g kg⁻¹ e potássio-K g kg⁻¹ adicionados ao biofertilizantes misto inoculado com diferentes bactérias diazotróficas de vida livre. NFB1-estirpe 1001; NFB2- estirpe do solo 2; NFB3- estirpe 1003; NFB4-estirpe do solo 4; NFB6- estirpe do solo 6; NFB7- estirpe do solo 7.....

73

Figura 8. Teor de carbono no biofertilizante misto em função da inoculação com diferentes bactérias diazotróficas de vida livre. NFB1-estirpe 1001; NFB2-estirpe do solo 2; NFB3- estirpe 1003; NFB4- estirpe do solo 4; NFB6- estirpe do solo 6; NFB7- estirpe do solo 7.....

74

CAPÍTULO III. OTIMIZAÇÃO DO BIOFERTILIZANTE MISTO ATRAVÉS DA INOCULAÇÃO COM FUNGOS DA ORDEM MUCORALES

Pág

Figura 1. Valores de pH de experimento em bandejas contendo os diferentes tipos de bioprotetores.....

88

Figura 2. Valores médios de nitrogênio total g kg⁻¹ do experimento em bandejas contendo os diferentes tipos de bioprotetores.....

91

Figura 3. Crescimento radial (cm) do *Fusarium solani* nas doses 1g, 2g e 3g de Bioprotetor com diferentes fungos Mucorales, em vários tempos de incubação.....

93

OTIMIZAÇÃO DE BIOFERTILIZANTE DE ROCHAS COM MATERIAIS ORGÂNICOS E DE BIOPROTETOR COM QUITOSANA FÚNGICA

RESUMO GERAL

O uso de insumos alternativos com potencial para produção agrícola tem se destacado com o passar dos anos. Os biofertilizantes de rocha fosfatada (BP) e potássica (BK) são insumos que já demonstraram eficiência agrônômica em diferentes culturas, quando misturados com materiais orgânicos formando o biofertilizante misto (inoculado com bactérias de vida livre) e quando inoculado com fungos produtores de quitosana formando o bioprotetor. Objetivou-se avaliar o melhoramento do biofertilizante de rochas naturais (BPK), através da mistura de diferentes proporções de materiais orgânicos para 1 parte de rocha, da seleção da melhor bactéria diazotrófica para inoculação do substrato (biofertilizante misto-BNPK) e do fungo produtor de quitosana. Antes de realizar os experimentos foram isoladas bactérias de vida livre de solos de diferentes regiões do Nordeste. Estas bactérias foram avaliadas quanto ao potencial de

fixar N por meio da estimativa da atividade de redução de acetileno, e pelo sequenciamento completo do gene 16S. Para o estudo do biofertilizante misto foram realizados três experimentos com ensaios em bandejas. No primeiro experimento utilizou-se diferentes materiais orgânicos em distintas proporções (T:H:C) representando os tratamentos com 3 repetições cada. Materiais orgânicos utilizados foram: T= Torta; H=húmus de minhoca; C=Composto de poda de árvores, 1(5:0:0), 2(4:1:0), 3(3:1:1), 4(2:3:0), 5(1:4:0), 6(4:0:1), 7(3:2:0), 8(3:0:1), 9(2:2:1), 10(2:1:2), 11(1:3:1), 12(1:1:3), 13(1:2:2), 14(0:5:0), 15(0:4:1), 16(0:1:4), 17(0:3:2), 18(0:2:3), 19 (0:0:5), 20(2:0:3)) (v/v). As amostragens foram realizadas após a instalação do experimento nos tempos. 0; 1; 2; 3; e 4 dias, para determinação de pH (H₂O), C, N (total), P e K disponível, Ca, Mg trocável e Al⁺³ trocáveis. No segundo experimento utilizou-se as duas melhores proporções do experimento anterior (3:2:0; 2:3:0), e 1 parte de biofertilizante de rochas, as quais foram inoculadas com bactérias diazotróficas de vida livre. Esses materiais foram inoculados com 100 e 200 ml de inóculos de 4 isolados de bactérias de vida livre com 3 repetições, com amostragem desse material durante 40 dias e em 4 tempos (0: 10: 20: 30: 40), para análises de pH (H₂O), N, C (totais) e P e K disponível. No terceiro experimento utilizou-se a melhor proporção de material orgânico do primeiro experimento (2:3:0) e 1 parte de biofertilizante de rochas, inoculando com fungos da ordem Mucorales (*Cunninghamella elegans*, *Muco hiemalis*, *Rhizopus arrhizus*) com 4 repetições. Os ensaios foram realizados no delineamento inteiramente casualizado. Para todos os experimentos houve diferença significativa entre os tratamentos analisados, exceto para o carbono-C e o nitrogênio-N do primeiro experimento, P; K; C no segundo experimento, havendo apenas efeito individual. Para o primeiro experimento os tratamentos 4(2:3:0); 7(3:2:0); 11(2:2:1), contribuíram de forma significativa para o acréscimo de nutrientes, podendo ser recomendados como substratos orgânico-mineral em substituição a fertilização comercial. No segundo experimentos as estirpes NFB4 e NFB 1003 apresentaram os melhores resultados. Houve aumento no teor de N, K, C, P no biofertilizante misto no período aproximado de 25 a 30 dias. Já para o terceiro experimento os fungos *Rhizopus arrhizus* e *Cunninghamella elegans* foram mais efetivos na produção de acidez do que *Mucor hiemalis*. O biofertilizante misto inoculado com fungos da Ordem Mucorales, de uma maneira geral, não mostrou grande variação na disponibilização de P e K disponível. As proporções de materiais

orgânicos contribuíram para o acréscimo de nutrientes aos substratos. Os tratamentos 4-(2:3:0) 7-(3:2:0) 3-(3:1:1), apresentaram os melhores resultados. Pelo sequenciamento completo as estirpes diazotróficas utilizadas no segundo experimento foram identificadas como *Bacillus subtilis*, *Mesorhizobium*, *Paenibacillus* e *Beijerinckia indica*. A inoculação do biofertilizante misto com as diazotróficas de vida livre, de uma maneira geral, incrementou o teor de N. Não houve diferença entre as doses de bioprotetores aplicadas em relação ao crescimento radial do *Fusarium solani*.

Palavras-chave: bactérias diazotróficas de vida livre; matéria orgânica, fungo produtor de quitosana, protetor contra fitopatógenos.

ROCKS BIOFERTILIZER OPTIMIZATION WITH ORGANIC MATERIALS AND BIOPROTECTOR WITH FUNGI CHITOSAN

ABSTRACT

The use of alternative materials with potential for use in agriculture has been studied over many years. Economic material as phosphate and potassic rocks are frequently been used although, they not present nutrients in available forms for plant absorption. Rock biofertilizers produced from P and K rocks mixed with sulfur inoculated with *Acidithiobacillus thiooxidans* produces metabolic sulfuric acid and contributes decisively do release nutrients contained in rocks which constitutes alternative products for use in agriculture. The rock biofertilizers promoted acidity in soil and needs to be neutralized mixing organic matters to produce a mixed biofertilizer, and can be enriched in N by inoculation with free living diazotrophic bacteria and showed high agronomic efficiency. When the mixed biofertilizers are inoculates with fungi that contain chitosan produce a

bioprotector that may protect plants against diseases. The work aim to evaluate the optimization of rock biofertilizers (BPK) mixing different proportions of organic matters and selecting the best diazotrophic bacteria for inoculation of the mixed biofertilizer (BNPK) and furthermore to select the best fungi containing chitosan in their cellular walls. Were obtained free living diazotrophic bacteria from different soils of the Brazilian Northeast region and evaluated the potential to realize the biological nitrogen fixation (FBN) process, by chromatographic analyzes and by the complete sequencing of the 16S gen. To study the mixed biofertilizer were realized three laboratorial experiments using trays. In the first experiment were used organic materials (OM) with treatments using different proportions of the OM, with 3 replicates. Were used Sugarcane Mud Cake (S); Earthworm compost (E) and Compost of Trees (C) and the 22 proportions in the respective: 1(5:0:0), 2(4:1:0), 3(3:1:1), 4(2:3:0), 5(1:4:0), 6(4:0:1), 7(3:2:0), 8(3:0:1), 9(2:2:1), 10(2:1:2), 11(1:3:1), 12(1:1:3), 13(1:2:2) 14(0:5:0), 15(0:4:1), 16(0:1:4), 17(0:3:2), 18(0:2:3), 19(0:0:5), 20(2:0:3)) (v/v). Samples were collected in times: (0); 10; 20; 30 and 40 days to determine: pH (H₂O), Total C, N, available P and K, exchangeable Ca, Mg and Al⁺³. In the second experiment were used the best proportions screened in the first experiment (3:2:0 and 2:3:0), mixed with 1 volume of PK rock biofertilizer, inoculated with 100 and 200 mL (inocules from 4 isolates) with 3 replicates. The material were sampled during 40 days (0, 10, 20, 30 and 40 days) to determine: pH (H₂O), total N, available P and K. In the third experiment were used the best proportion of Organic Matter and PK rock biofertilizer in proportion (2:3:1), inoculated with the Mucorales fungi (*Cunninghamella elegans*, *Muco hiemalis*, *Rhizopus arrhizus*), with 4 replicates. The experiments were conducted in a completely experimental design. The first experiments showed significant difference between the treatments, except to carbon-C and nitrogen -N, and in the second experiment occurred individual effect for P; K and C. Treatments 4; 7 and 11, contributed to increase nutrients in the biofertilizer, and they may be alternative as organic mineral product in replacement of conventional fertilizer. The strains NFB 4 and NFB 1003 presented the best results and increase N, P, K and C in the mixed biofertilizer in the period correspondent to 25 - 30 days. The mixed biofertilizer inoculation in a general increase total N. The mixed biofertilizer inoculated with free living diazotrophic bacteria increase total N.

Key words : bacteria -free life diazotrophic; organic matter, fungi producer of chitosan, protection against plant pathogens.

1.INTRODUÇÃO GERAL

Os biofertilizantes produzidos a partir de rocha fosfatada e de rocha potássica podem ser utilizados como insumo alternativos para produção agrícola, reduzindo o uso de fertilizantes minerais e a contaminação ambiental. As rochas fosfatadas, em particular as apatitas, podem ser usadas como matérias-primas para a produção de fertilizantes fosfatados de alta solubilidade, como fontes de aplicação direta na agricultura, ou para fabricação de biofertilizantes de rochas, que apresentam melhor potencial devido a maior disponibilização de nutrientes (STAMFORD et al.2005).

Os nutrientes presentes nas rochas não estão prontamente disponíveis para as culturas, sendo necessária a aplicação de processos físicos e químicos para promover a liberação e o uso pelas plantas. A acidificação parcial é um método químico bastante utilizado para melhorar a eficiência dos fosfatos naturais. Outro método que pode contribuir para aumentar a eficiência da utilização dos nutrientes contidos nas rochas é a solubilização biológica produzida por alguns micro-organismos (WHITELAW, 2000). Stamford et al. (2004a; 2004b e 2005) utilizaram fosfatos naturais (apatitas de diferentes origens) com adição de enxofre elementar inoculado com a bactéria *Acidithiobacillus*, para produção de biofertilizantes fosfatados. Nestas pesquisas foram utilizadas leguminosas visando adicionar o N necessário para as plantas através da inoculação com estirpes de rizóbios efetivas, e foram obtidos excelentes resultados. Porém, em outras pesquisas devido a ocorrência de acidez em função do baixo pH dos biofertilizantes de rochas, foram adicionados materiais orgânicos com pH elevado junto ao biofertilizante para fornecimento de N no cultivo de plantas não leguminosas (STAMFORD et al.2007; 2008; 2011; 2014).

O potencial do biofertilizante de rocha fosfatas e potássicas em mistura com resíduos orgânicos (húmus de minhoca) inoculados com bactéria diazotrófica de vida livre (LIMA et al.2010) foi avaliado em experimentos de campo em cultura do pimentão (STAMFORD et al.2014), no melão (OLIVEIRA et al.2015), na uva de mesa (STAMFORD et al.2014) e na uva para suco (STAMFORD et al.2014). Alguns desses resíduos orgânicos apresentam baixa concentração de N justificando a inoculação desses materiais com bactérias diazotróficas de vida livre, selecionadas para incrementar a disponibilidade de

nitrogênio, através do aumento da fixação de N neste material (LIMA et al.2010).

A fixação biológica de N pode ser feita por micro-organismos em simbiose, associativos e de vida livre (MOREIRA et al.2006). A maioria das bactérias diazotróficas de vida livre são heterotróficas e, portanto, requer a adição de uma fonte de carbono de rápida utilização, necessária para incrementar o processo da fixação de N, tendo em vista que o processo depende da multiplicação bacteriana, e as bactérias de vida livre não realizam associação com plantas.

O biofertilizante misto inoculado com fungos (*Cunninghamella elegans*) da ordem Mucorales produtores de quitosana fúngica, constitui o bioprotetor, além da produção de quitina e quitosana estes fungos promovem a produção de polifosfato inorgânico (FRANCO et al.2011), que disponibiliza maior quantidade de fósforo para as plantas.

O trabalho tem como objetivo avaliar o melhoramento do biofertilizante misto (BNPK) através da avaliação de diferentes proporções de materiais orgânicos para uma parte de biofertilizantes de rochas, seleção da melhor bactéria diazotrófica de vida livre, e seleção do melhor fungo da ordem Mucorales que possuem quitina e quitosana na parede celular.

1.1 HIPÓTESE

O melhoramento do biofertilizante misto é fundamental para a efetiva aplicação como promotor de crescimento de plantas. O biofertilizante misto protetor representa importante estratégia na nutrição das plantas, devendo fornecer os diferentes nutrientes necessários para o crescimento e produtividade vegetal, e bem como no combate a fitopatógenos. A eficácia do bioprotetor (com quitosana) deverá depender da dose a ser utilizada para a produção efetiva de mudas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biofertilizante produzido a partir de rochas fosfatadas e potássicas

Os biofertilizantes de rochas são produzidos a partir de rochas moídas, com adição de enxofre elementar inoculado com a bactéria *Acidithiobacillus thiooxidans*, que realiza a oxidação do S produzindo ácido sulfúrico, solubilizando os elementos contidos nos minerais, especialmente fósforo e potássio (STAMFORD et al.2011). As rochas fosfatadas, em particular as apatitas, são usadas como matérias-primas para a produção de fertilizantes fosfatados de alta solubilidade, como fontes de aplicação direta na agricultura, ou podem ser utilizadas para fabricação de biofertilizantes de rochas (STAMFORD et al.2005). Os biofertilizantes de rochas são práticos, econômicos e podem ser produzidos por grandes, médios e pequenos agricultores, sem emprego de técnicas especiais, nem adição de produtos tóxicos e corrosivos, como ocorre na obtenção de fertilizantes convencionais (STAMFORD et al.2008a).

Outro fato a ser destacado é a importância do fósforo como um nutriente que as plantas requerem em menor quantidade. Apesar de seu pequeno requerimento pelos vegetais, é um dos nutrientes aplicados em maiores quantidades nos solos brasileiros, face a sua baixa disponibilidade natural e afinidade com a fração mineral (argila), o que torna um dos fatores mais limitantes da produção em solos tropicais (RAIJ, 1991). Assim a necessidade de uso de fontes alternativas e de baixo custo na produção agrícola, e que contenha este nutriente em sua composição.

O potássio é outro nutriente importante para nutrição das plantas. Estando presente nos biofertilizantes misto, este nutriente é responsável por desempenhar várias funções, como regulação da turgidez do tecido, ativação enzimática, abertura e fechamento de estômatos, transporte de carboidratos, transpiração, resistência a geadas, seca, doenças e ao acamamento. Demonstrando a importância de se produzir um composto que apresente considerável concentração desse nutriente.

As necessidades de K para o ótimo crescimento das plantas situam-se na faixa de 20-50 g kg⁻¹ da massa das partes vegetativas secas da planta, das frutas e dos tubérculos, entretanto as plantas têm a capacidade de absorver

quantidade de K superior à sua necessidade, o que comumente é denominado consumo de luxo de K (MEURER, 2006).

Desta forma a fertilização com NPK é um dos fatores mais importantes que afetam a produção, a nutrição e disponibilidade de nutrientes no solo, torna-se necessário intensificar o uso de novas técnicas visando incrementar a produtividade e melhorar ao máximo o sistema de produção agrícola (STAMFORD et al.2008a).

2.2. Biofertilizante Misto e Bioprotetor

Os biofertilizantes de rochas fosfatadas e potássicas não fornecem nitrogênio para as plantas (OLIVEIRA et al.2014), sendo necessária a adição de uma fonte rica neste elemento, visto que é um dos nutrientes minerais mais importantes para o crescimento e o desenvolvimento dos organismos, uma vez que faz parte de compostos químicos como proteínas, ácidos nucléicos, e outros componentes essenciais para toda forma de vida (OLIVEIRA et al.2014), além de ser exigido em maior quantidade pela maioria das plantas (BISSANI et al.2008).

Alguns resíduos orgânicos e outras fontes naturais apresentam potencial para fornecerem N às culturas, (OLIVEIRA et al.2014), tais como os vermicompostos, bagaço de cana, vinhaça, resíduos orgânicos domésticos, resíduos de plantas, e resíduos orgânicos industriais (por exemplo, resíduos da produção de bebidas), os quais geralmente mostram baixo risco de contaminação ambiental, e são aceitos para uso na agricultura ecológica (FEBRER, 2002). A incorporação desses resíduos aumenta a atividade microbiológica e melhora as condições físicas e químicas do solo.(REFERENCIA)

O enriquecimento em N nesses resíduos orgânicos pode ser obtido com o uso de bactérias diazotróficas de vida livre, tendo em vista que não necessitam de planta hospedeira e apresentam elevado potencial para serem utilizadas como alternativa para aumentar a produção de material orgânico de melhor qualidade (LIMA et al.2010).

A mistura de biofertilizante de rochas com resíduos orgânicos como, por exemplo, húmus de minhoca, inoculado com bactéria diazotrófica de vida livre

efetiva na fixação do N₂, pode complementar a fertilização do solo disponibilizando nitrogênio para o solo e para as plantas.

Além desses aspectos, o biofertilizante misto (BNPK), através da inoculação com fungo da Ordem Mucorales como *Cunninghamella elegans*, que contem na sua parede celular considerável quantidade de quitina e quitosana (FRANCO et al.2004; 2011), apresenta características que favorecem a disponibilidade de nutrientes para as plantas (HERNANDÉZ-LAUZARDO et al.2008; STAMFORD et al.2007), e também pode oferecer proteção contra ataques de patógenos, pois a quitina é um biopolímero que tem comprovada atuação bactericida e bacteriostática contra vários micro-organismos fitopatogênicos (BERGER et al.2016; BOONLERTNIRUN et al.2008).

2.3. Materiais orgânicos para compor o biofertilizante misto.

Existem diversos materiais orgânicos que podem ser utilizados em mistura com rochas fosfatadas e potássicas, como os de origem vegetal. Resíduos de agroindústria como tortas (mamona, linhaça e cana), bagaços (cana e laranja), cascas (arroz) e materiais como serragem de madeira, xaxim, coco e carvão. Além desses tem-se palha de arroz, bagana de carnaúba, compostos de poda de arvores, vinhaça, torta de filtro, os de origem industriais, dentre outros. Como componentes de origem animal os mais utilizados são: o esterco e o húmus de minhoca, por serem extremamente ricos em material orgânico, e ainda, utilizam-se os componentes sintéticos como espumas fenólicas, lã de rocha e isopor, normalmente empregados na composição de substratos comerciais (PARRON & CAUS, 2001).

Além desses materiais podem-se utilizar os compostos resultantes do processo de compostagem, como fornecedor de nutrientes e suporte para as plantas, como alternativa para diminuir o custo de produção das mudas e, ainda, possibilitar a utilização desses produtos em outra atividade além da aplicação no solo agrícola, o que pode gerar novos mercados para utilização deste tipo de adubo orgânico (COUTINHO et al.2006).

A junção de mais de um material para compor substrato é também citada por Negreiros et al.(2004), visto que a associação de materiais orgânicos ao solo, melhora a textura do substrato e favorece boas condições físicas,

fornecendo os nutrientes necessários ao desenvolvimento das raízes e da muda. Neste sentido, a produção do biofertilizante misto (composto por materiais orgânicos e rochas naturais), incrementa a disponibilidade de nutrientes no mesmo e aumenta o seu potencial de fornecer tais nutrientes, quando utilizado como suporte para o cultivo de plantas, melhorando as propriedades físicas, químicas e biológicas dos substratos.

Além desses aspectos, ainda apresenta como vantagens, permitir a elevada porcentagem de germinação das sementes, e fixar a raiz, possibilitando o desenvolvimento das plântulas até que essas estejam aptas para serem plantadas em local definitivo (PARRON & CAUS, 2001).

A composição química da torta de filtro é variável em função da variedade e da maturação da cana, tipo de solo, processo de clarificação do caldo e outros (ALMEIDA JÚNIOR, et al.2011). De acordo com Nunes Júnior (2008), sua composição química média apresenta altos teores de matéria orgânica e fósforo, possuindo também grande quantidade nitrogênio e cálcio, além de teores consideráveis de potássio, magnésio e micronutrientes. Sendo um componente muito importante para compor o biofertilizante misto.

Dentre as propriedades químicas geralmente utilizadas em nível mundial para a caracterização de um substrato, destacam-se: o pH, a capacidade de troca de cátions (CTC), concentração de N e o teor de matéria orgânica nele presente. No caso do biofertilizante, destaca-se também a porcentagem de fósforo e potássio presente neste, além dos demais fatores. O pH é definido pela atividade do íon hidrogênio, através dele pode-se dispor ou indispor nutrientes existentes no substrato as plantas (BAILEY; NELSON; FONTENO, 2000). De acordo com Daniel (2006), o pH do substrato deve estar entre 5,5 e 6,5, momento em que há maior disponibilidade de nutrientes e não há efeitos tóxicos causados pelo excesso de alumínio e manganês, estes valores de pHs são normalmente encontrados no biofertilizante misto.

Para melhorar a qualidade do biofertilizante de rochas com P e K e incrementar a porcentagem de N, foram incorporados materiais orgânicos, inoculados com bactérias diazotróficas de vida livre, visto que o nitrogênio representa o nutriente que mais limita a produção agrícola e não ocorre nas rochas. Além desses aspectos, apresenta alta solubilidade com facilidade de

lixiviação, bem como em função de suas inúmeras transformações (STAMFORD et al. 2007).

O nitrogênio normalmente encontra-se no solo em proporções abaixo dos níveis necessários para o desenvolvimento normal das plantas, havendo a necessidade de incorporar tais materiais orgânicos junto ao biofertilizante. Entretanto, estes materiais orgânicos são pobres em N, o que justifica a inoculação desses materiais com diazotróficas de vida livre, visando suprir essa deficiência em N. A incorporação de resíduos orgânicos tem mostrado que além de melhorar as condições físicas do solo, contribui para o aumento da atividade biológica do solo.

Lima et al. (2010) encontraram incremento superior a 100% de nitrogênio, após incubação de compostos orgânicos (húmus de minhoca) com bactérias diazotróficas de vida livre (NFB 1001), que promoveram aumento no teor de N total, provavelmente por efeito do processo de fixação biológica do N e também pelo aumento da mineralização.

Inferem-se desses resultados que o uso do composto orgânico, como meio de cultivo para produção de mudas pode proporcionar aumento da atividade microbiana, da retenção de água, da capacidade de troca catiônica, incrementando a disponibilidade de nutrientes, e diminuindo a densidade do substrato, tendo como consequência arejamento adequado, melhor drenagem e maior crescimento das plantas.

2.4. Importância dos fungos Mucorales para otimização do biofertilizante

Os fungos representam um grupo de elevado interesse prático e científico na área da biotecnologia, destacando-se o grupo pertencente à Ordem Mucorales, Classe Zygomycetes principalmente, pela presença de quitina e quitosana em suas paredes celulares (CAMPOS-TAKAKI, 2005).

Os fungos *Rhizopus arrhizus*, *Cunninghamella elegans*, *Muco Hiemalis*, (Ordem Mucorales, Classe Zygomycetes) apresentam quitina e quitosana em suas paredes celulares, sendo este uma característica fisiológica utilizada como caráter significativo na taxonomia e filogenia desses organismos (CAMPOS-TAKAKI, 2005). Devido apresentarem quitina e quitosana em suas paredes celulares estes fungos possuem ação antimicrobiana, sendo este um

fator de relevância para combater doenças em plantas, tais como doenças causadas por fungos patogênicos.

A quitosana é um polímero natural, podendo ser encontrado nos crustáceos, moluscos e na parede celular de alguns fungos, principalmente da Classe Zygomycetes (SILVA et al.2010; STAMFORD et al.2007b). Além disso, a quitosana possui propriedades específicas que mostram grande potencial para inúmeras aplicações em vários produtos comerciais, especialmente devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e reatividade do grupo amínico (FAI et al.2008; SYNOWIECKI & AL-KHATTEB 2003). Tais propriedades possibilitam que a quitosana possa ser utilizada em várias aplicações, como ação antimicrobiana (KONG et al 2010, FENG & XIA 2011). De acordo com Badawy & Rabea (2008), a quitosana pode promover efeito inibitório antifúngico, com ação mais acentuada sobre *B. cinerea* à medida que diminui o seu peso molecular.

O biopolímero tem comprovada ação na inibição do crescimento do fungo patogênico *Botrytis cinerea*, causador de doenças de uvas “mofo cinzento da videira”, fato revelado independente da concentração utilizada que variou de 0,5 a 2,0% de quitosana (CAMILI et al.2007).

Coqueiro & Piero (2011) observaram em trabalho *in vitro* o efeito fungistático da quitosana com diferentes pesos moleculares sobre o crescimento do fungo *Alternaria solani*, em inibição do crescimento e da germinação do micélio.

Trabalho realizado com biofertilizante de rochas com P e K, com adição da quitosana de crustáceo, contribuiu para melhorar a indução de plantas a resistência a patógenos (BERGER et al. 2016), além de incrementar a disponibilidade de nutrientes para as plantas. Devido essas propriedades fungistática e fungicida, este biofertilizante vem recebendo a denominação de bioprotetor (BERGER et al. 2013).

A aplicação do bioprotetor com a adição da quitosana fúngica (massa micelial de *Cunninghamella elegans* (UCP 542) tem promissora potencialidade no combate ao fungo patogênico de plantas. Com trabalho *in vitro* visando avaliar ação antifúngica do fungo patogênico *Pythium*, potente parasítico da cultura da alface (FELIX, 2012). Além disso, também atuar como fonte alternativa na liberação de nutrientes para o solo ajudando no incremento da produtividade da cultura.

Em estudos recentes, a quitosana tem demonstrado sua importância como produto que induz mecanismos de defesa da planta contra doenças, especialmente as causadas por fungos. Como principal hipótese, tem sido sugerido que o biopolímero altera a permeabilidade da membrana plasmática (BENHAMOU, 1996) e também promove estresse oxidativo no fungo patogênico (DI PIERO & GARDA 2008). Ensaio laboratoriais conduzidos em placas de Petri demonstraram a ação antibiótica da quitosana em diferentes micro-organismos tais como, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa* (YAVAD et al.2004), *Bacillus cereus*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Helminthosporium* sp. (COSTA SILVA et al.2006), *Fusarium oxysporum* f.sp. *chrysanthemi* (PINTO et al.2010).

A atividade antimicrobiana da quitosana é uma das inúmeras características que distinguem este polímero dos demais polissacarídeos. A inibição do crescimento de diversos micro-organismos, como por exemplo, *E. coli*, *Fusarium* spp., *Alternaria*, *Helminthus osporium* (RAVI KUMAR, 2000), *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *S. pyogenis*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. faecalis*, demonstrou ser efetiva em ensaios laboratoriais. Alguns pesquisadores explicam que a atividade antimicrobiana da quitosana ocorre através de seus grupos amínicos, que, em contato com os fluidos fisiológicos, tornam-se protonados e se ligam a grupos aniônicos desses micro-organismos, provocando aglutinação das células microbianas e, como consequência, levam à inibição do crescimento (RAVI KUMAR, 2000; OKAMOTO et al.2003). Em estudos realizados por Pochanavanich & Suntornsuk (2002), descrevem a significativa produção de quitosana por *R. arrhizus* evidenciando o potencial biotecnológico desse fungo, na produção desse biopolímero, ao comparar com os resultados obtidos por fungos das espécies *Aspergillus niger*, *Zygosacharomyces rouxii* e *Candida albicans*.

2.5. Importância das bactérias diazotróficas de vida livre para otimização do biofertilizante

O processo da fixação biológica de nitrogênio atmosférico é um dos mais importantes na natureza, sendo realizado por bactérias conhecidas como diazotróficas, que podem ser simbióticas, associativas e assimbióticas ou de vida livre (REIS et al.2006). As bactérias diazotróficas possuem um complexo

enzimático denominado de nitrogenase, que realiza biologicamente a quebra da tripla ligação existente na molécula de N_2 incrementando a formação de N orgânico (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). No entanto, o processo de fixação biológica de N é influenciado por diversos fatores que podem prejudicar o incremento de N no ecossistema. Neste sentido, a fixação biológica de N é um processo regulado pela necessidade do ambiente e das espécies fixadoras, pois, a enzima nitrogenase, responsável pela redução do N_2 é inativada, quando submetida a presença de amônio (RUDNIK et al.1997).

As interações existentes entre bactérias fixadoras de N e plantas se diferenciam em função dos tipos de associações. As bactérias diazotróficas simbióticas apresentam uma relação mais próxima com o seu hospedeiro, quando comparadas com as bactérias diazotróficas de vida livre e associativas. Isto se deve ao fato que, mesmo as bactérias associativas estando localizadas no interior das plantas, não há evidências de relação tão complexa e organizada quanto ao presente nas simbioses de bactérias que formam nódulos com leguminosas que é resultante de um processo muito mais evoluído que minimiza perdas do nitrogênio fixado por interferência de fatores químicos, físicos e biológicos que interagem na complexidade, heterogeneidade e dinâmica do sistema edáfico (MOREIRA et al.2010).

Esses micro-organismos podem ser encontrados em diferentes ecossistemas, e associados com as plantas em diferentes partes destas, tais como as bactérias diazotróficas associativas, que podem ser isoladas de raízes e partes aéreas de espécies de importância agrícola como gramíneas e palmeiras (MAGALHÃES & DÖBEREINE, 1984; DÖBEREINER, 1992; FERNANDES et al.2001), orquídeas (LANGE & MOREIRA, 2002), cafeeiros (SANTOS et al.2001), araucárias (NERONI & CARDOSO, 2007) e fruteiras (WEBER et al.2000). Há relatos também de ocorrência em solos contaminados com metais pesados (MOREIRA et al.2008), em solos tratados com resíduos siderúrgicos e bio-sólido industrial (MELLONI et al.2000), em áreas sob reabilitação de bauxita (MELLONI et al.2004; NÓBREGA et al.2004) e em diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia.

Entretanto as bactérias diazotróficas de vida livre, que não necessitam de plantas hospedeiras, são as que apresentam maior potencial para serem utilizadas como alternativa para o enriquecimento dos resíduos orgânicos em nitrogênio. Estas bactérias (assimbióticas) abrangem micro-organismos que

podem ser encontrados no solo e em ambientes aquáticos, e necessariamente não fazem parte de estruturas mutualísticas ou associativas (REIS et al.2006). Neste sentido, é importante ressaltar a sua contribuição para disponibilizar nutrientes e incrementar o N, quando inoculadas em materiais orgânicos para compor substratos, como os biofertilizantes de rochas fosfatas e potássicas.

Cálculos da contribuição de N fixado para gramíneas estão em torno de 25 a 50 kg N/ha/ano o que equivale ao suprimento médio de cerca de 17% das demandas das culturas. Considerando a importância que as espécies produtoras de grãos, como trigo, arroz e milho, entre outras, são a principal fonte de carboidrato da dieta humana e o alto potencial fotossintético das gramíneas C4 nos trópicos, esta taxa de FBN, mesmo baixa representa uma grande economia nos custos de produção o que justifica estudos visando seu manejo (MOREIRA et al.2010).

Lima et al. (2010) em pesquisa a nível de laboratório (bandejas) encontraram incremento em torno de 100% em N total da matéria orgânica (húmus de minhoca), após incubação por 45 dias, com bactérias diazotróficas de vida livre, o que representa um satisfatório incremento de N para uso como insumo na agricultura.

Apesar da grande contribuição das bactérias diazotróficas de vida livre para incremento de N e outros nutrientes nos substratos orgânicos e biofertilizantes de rocha fosfatada e potássica, a maior parte dos sistemas de produção agrícola utilizam insumos industrializados (fertilizantes nitrogenados), não explorando o potencial desses micro-organismos, tanto para o aumento de N quanto para outros mecanismos promotores do crescimento vegetal.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

ALMEIDA JÚNIOR, A. B. de.; NASCIMENTO, C. W. A. do; SOBRAL, M. F.; SILVA, F. B. V. da; GOMES, W. A. Fertilidade do solo e absorção de nutrientes em cana-de-açúcar fertilizada com torta de filtro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.15, n.10, p.103-104, 2011.

BADAWY, M.E.I.; RABEA, E.I. Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.51, n1, p.110-117, 2008.

BAILEY, D.A.; FONTENO W.C; NELSON, P.V. **Greenhouse substrates and fertilization**. Raleigh: North Carolina State University, 2000a. Disponível em <<http://www.ces.ncsu.edu/depts/hort/floriculture/plugs/ghsubfert.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2000.

BENHAMOU, N. Elicitor - induced plant defense pathways. **Trends in Plant Science**, v.1, p.233-240, 1996.

BERGER, L. R. R.; STAMFORD, N. P.; WILLADINO, L. G.; LARANJEIRA, D.; LIMA, M. A. B. de.; MALHEIROS, S. M. M.; OLIVEIRA, W. J. de.; STAMFORD, T. C. M. Cowpea resistance induced against *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* by crustaceous chitosan and by biomass and chitosan obtained from *Cunninghamella elegans*. **Biological Control**, v.92, p.45–54, 2016.

BERGER, L. R. R.; STAMFORD, T. C. M.; SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; FRANCO, L. O.; STAMFORD, T. C. M. Plant and soil characteristics affected by biofertilizers from rocks and organic matter inoculated with diazotrophic bacteria and fungi that produce chitosan. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v.13, n.3, p.592-603, 2013.

BISSANI, C. A.; GIANELLO, C.; CAMARGO, F. A. O.; TEDESCO, M. J. **Fertilidade dos solos e manejo da adubação das culturas**. 2ª Ed. Porto Alegre, Metrópole, 344 p, 2008.

BOONLERTNIRUN, S., BOONRAUNG, C., SUVANASARA, R. Application of chitosan in Rice production. **Journal of Metals Materials and Minerals**.v.18, p. 47-52. 2008.

CAMILI, E. C.; BENATO, E. A.; PASCHOLATI, S. F.; CIA, P. Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva 'Itália' contra *Botrytis cinerea*. **Summa Phytopathologica**, v.33, p.3, p.215-22, 2007.

CAMPOS-TAKAKI, G. M. The versatility on copolymers chitin and chitosan production. In: DUTTA, P. K. **Chitin and chitosan opportunities & challenges**. India. 2005.

COQUEIRO; D.S.O.; PIERO; R.M. DI. Atividade de quitosanas com diferentes pesos moleculares sobre *Alternaria solani*. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v.78, n.3, p.459-463, 2011.

COSTA SILVA, H.S.R.; SANTOS, K.S.C.R. DOS; FERREIRA, E.I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v.29, p.776-785, 2006.

COUTINHO, M.P.; CARNEIRO, J.G.A.; BARROSO, D.G.; RODRIGUES, L.A.; SIQUEIRA, J. Substrato de cavas de extração de argila enriquecido com subprodutos agroindustriais e urbanos para produção de mudas de *Sesbania virgata*. **Revista Árvore**, v.30, n.1, p.147-153, 2006.

DANIEL, O. **Silvicultura**, Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências Agrárias. Brasil, 2006. 196p.

DI PIERO, R.M.; GARDA, M.V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.43, p.1121-1128, 2008.

DÖBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. **Symbiosis**, v.13: p.1-13, 1992.

FAI, A.E.C.; STAMFORD T.C.M.; STAMFORD, T.L.M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Revista Iberoamer. Polímeros**, v.9, p.435-451, 2008.

FEBRER MCA. Dinâmica da decomposição mesófila de resíduos orgânicos misturados com águas residuárias da suinocultura. **Engenharia Agrícola**, v.10, p.18-30, 2002.

FENG Y, XIA W. Preparation, characterization and antibacterial activity of water-soluble O-fumaryl-chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v.83, p.1169-1173, 2011.

FELIX, F. F.; BERGER, L. R. R.; BORGES, T. K. S.; STAMFORD, N. P.; MALHEIROS, S. M. M.; OLIVEIRA, W. J.; OLIVEIRA, F. L. N. Nitrogênio em substrato orgânico mineral inoculado com bactérias diazotrófica de vida livre: <https://www.researchgate.net/publication/228462778>. Disponível em 28/2014.

FERNANDES, M.F., FERNANDES, R.M., RODRIGUES, L.S. Bactérias diazotróficas associadas a coqueiros na região de baixada litorânea em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, p.1509-1517, 2001.

FRANCO, L.O.; ALBUQUERQUE, C.D.C.; STAMFORD, N.P.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. de. Avaliação da atividade ácida e acúmulo de fosfato inorgânico em amostras de *Cunninghamella elegans*. **Revista Analytica**, v. 54, p.70-78, 2011.

FRANCO, L.O.; MAIA, R.C.C.; PORTO, A.L. F.; MESSIAS, A.S.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. de. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p.243-247, 2004.

HERNANDEZ-LAUZARDO, A.N.; BAUTISTA-BAÑOS, M.G.; VELÁZQUEZ-DEL, V.; MÉNDEZ-MONTEALVO, M. G.; SÁNCHEZRIVERA, M.M.; BELLO PÉREZ, L.A. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. **Carbohydrate Polymers**, v.73, p.541-547, 2008.

KONG M, GUANG CHEN X, XING K, JIN PARK H. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v.144, n.1, p.51-63, 2010.

LANGE, A., MOREIRA, F.M.A. Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de *Orchidaceae* e de outras famílias vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.26 p.535-543, 2002.

LIMA, F. S.; STAMFORD, N. P.; SOUSA, C. S.; LIRA JÚNIOR, M. A.; MALHEIROS, S. M. M.; VAN STRAATEN, P. Earthworm compound and rock biofertilizer enriched in Nitrogen by inoculation with free living diazotrophic bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.27, p.1-7, 2010.

MAGALHÃES, F.M.M., DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. **Revista de Microbiologia**, v.15 p.246-252, 1984.

MELLONI, R., ABRAHÃO, R.S., MOREIRA, F.M.S., Neto, A.E.F. Impacto de resíduo de siderurgia na microbiota do solo e no crescimento de eucalipto. **Revista Árvore**, v.24 p.309-315, 2000.

MELLONI, R., NÓBREGA, R.S.A., MOREIRA, F.M.S., SIQUEIRA, J.O. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endolíticas em solos de mineração de bauxita, em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28 p.85-93, 2004.

MEURER, E.J. Potássio. In: FERNANDES, M.S. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 2006. p.281-298.

MOREIRA, F.M.S., LANGE, A., KLAUBERG-FILHO, O., SIQUEIRA, J.O., NÓBREGA, R.S.A., LIMA, A.S. Associative diazotrophic bacteria in grass roots and soils from heavy metal contaminated sites. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.80, p.749-781, 2006.

MOREIRA, F.M.S., SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2a ed. UFLA, Lavras, Brasil. 729 p, 2008.

MOREIRA, F.M.S; SILVA, K. da.; NÓBREGA, R.S.A.; CARVALHO, F. da. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, n.2, p. 74-99, 2010.

NEGREIROS, J.R.S. Diferentes substratos na formação de mudas de maracujazeiro-amarelo. **Revista Ceres**, v. 51, n. 294, p. 243-343, 2004.

NERONI, R.F., CARDOSO, E.J.B.N. Occurrence of diazotrophic bacteria in *Araucária angustifolia*. **Scientia Agrícola**, v.64 p.303-304, 2007.

NÓBREGA R.S.A., MOREIRA F.M.S., SIQUEIRA J.O., LIMA A.S. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, p.269-279, 2004.

NUNES JÚNIOR, D. Torta de filtro: de resíduo a produto nobre. **Idea News**, Ribeirão Preto, v.8, n.92, p.22-30, 2008.

OKAMOTO, Y.; YANO, R.; MIYTAKE, K.; TOMOHIRO, I.; SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. **Carbohydrates Polymers**. v.53. n.3. p. 337-342. 2003.

OLIVEIRA, F. L. N.; STAMFORD, N. P.; NETO, D. S.; OLIVEIRA, E. C. A.; OLIVEIRA, W. S.; SILVA SANTOS, C. E. R. Effects of biofertilizers produced from rocks and organic matter, enriched by diazotrophic bacteria inoculation on growth and yield of sugarcane. **Australian journal of Crop Science**. v. 9, n.6, p. 504-508, 2015.

OLIVEIRA, W. S.; STAMFORD, N. P.; SILVA, E. V. N.; SILVA SANTOS, C. E. R.; FREITAS, A. D. S.; ARNAUD, T. M. S.; SARMENTO, B. F.; Biofertilizer produced by interactive microbial processes affects melon yield and nutrients availability in a Brazilian semiarid soil. **Australian Journal of, Crop Science**. v.8, n. 7, p.1124-1131, 2014.

PARRON, L.M.; CAUS, J.F. Produção de mudas de espécies arbóreas de matas de galeria: substrato e inoculação com fungos micorrízicos. In: RIBEIRO, J.F.; FONSECA, C.E.L.; SILVA, J.C.S. (Eds.). **Cerrado: Caracterização e recuperação de matas de galeria**. Planaltina: Embrapa cerrado, p. 733-776, 2001.

PINTO, Z.V.; BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. Efeito de casca de camarão, hidrolisado de peixe e quitosana no controle da murcha de *Fusarium oxysporum* f.sp. chrysanthemi em crisântemo. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 1, p.16-23, 2010.

POCHANAVANICH, P.; SUNTORNSUK, W. **Fungal chitosan production and its characterization**. Department of Microbiology. Bangkok: King Mongkut's University of Technology. Thailand. 235p, 2002.

RAIJ, B.V. **Fertilidade do solo e adubação**. Piracicaba: Potafos /Ceres, 285 p.,1991.

RAVI KUMAR, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**. v.46, n.1. p.1-27. 2000.

REIS, V.M.; OLIVEIRA, A.L.M.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: Fernandes, M.S., ed. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciências do solo. p.153-172, 2006.

RUDNIK, P., MELETZUS, D., GREEN, A., HE, L. KENNEDY, C. Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of proteobacteria. **Soil Biology Biochemistry**, v.29, p.831- 841, 1997.

SANTOS, D.H.; TIRITAN, C.S.; FOLONI, J.S.S.; FABRIS, L.B.; produtividade de cana-de-açúcar sob adubação com torta de filtro enriquecida com fosfato solúvel. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, p.454-461, 2010.

SANTOS, P.E.L., CRISTALES, R.B., MELLADO, J.C. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixer with wide environmental geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.2790-2798, 2001.

SILVA R.C, ANDRADE JR. M.A.S, CESTARI, A.R. **Química Nova**, v.33, n.4, p. 880, 2010.

STAMFORD, N.P.; JUNIOR, S. S.; SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; SANTOS, C. M. A.; ARNAUD, T. M.; S.; SOARES, H. R. Yield of grape (*Vitis labrusca* cv. Isabel) and soil nutrients availability affected by biofertilizer with diazotrophic bacteria and fungi chitosan. **Australian Journal of Crop Science**, v.8, n.2, p.301-306, 2014.

STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E.R. e S.; FELIX, F.F.; OLIVEIRA, F.L.N. de. Biofertilizers from Phosphate and Potash Rocks with *Acidithiobacillus* and Organic Matter Enriched by Free Living Diazotrophic Bacteria. In: ARAÚJO, A. S. F. de; FIGUEIREDO, M. do V. B. **Microbial Ecology of Tropical Soils**. Nova Science Publishers. p. 149-157, 2011.

STAMFORD, N.P.; IZQUIERDO, C.G.; FERNÁNDEZ, M.T.H.; MORENO, M. del C.M. Biofertilizante de rochas fosfatadas e potássicas com enxofre e *Acidithiobacillus*. In: FIGUEIREDO, M. do V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.

- P.; SANTOS, C.E. de R. e S. **Micro-organismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agro livros, p. 401-421, 2008a e b).
- STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, T.L.M.; STAMFORD, N.P.; BARROS NETO, B. de.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. de. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium, **Electronic Journal of Biotechnology**, v.10, n.01, p.61-68, 2007.
- STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E.R.S.; SANTOS, P.R.; SANTOS, K.S.R.; MONTENEGRO, A. Effects of rock phosphate, sulphur with and without *Acidithiobacillus* and organic byproducts on mimosa (*Mimosa caesalpiniiifolia*) grown in a Brazilian tableland soil. **Tropical Grasslands**, v.39, p.54-61, 2005.
- STAMFORD, N.P.; MOURA, A.M.M.F.; SANTOS, K.S.; SANTOS, P. R. Atuação de *Acidithiobacillus* na solubilização de fosfato natural em solo de tabuleiro cultivado com jacatupé (*Pachyrhizuserosus*). **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v.28, p.75-83, 2004a.
- STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E.R.S.; STAMFORD, W.P.J.; DIAS, S.H.L. Biofertilizante de rocha com *Acidithiobacillus* em solo de tabuleiro cultivado com caupi. **Revista Analytica**, São Paulo, v.3, p.48-53, 2004 b.
- SYNOWIECKI J., AL-KHATTEB, N.A.A. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** , v.43, n.2, p.144, 2003.
- WEBER, O.B., BALDANI, J.I., DÖBEREINER, J. Bactérias diazotróficas em mudas de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.2277-2285, 2000.
- WHITELAW, M.A. Growth promotion of plant inoculated with phosphate-solubilizing fungi. **Advances in Agronomy**, v. 69, p. 99-151, 2000.
- YADAV A.V.; BHISE, S.B. Chitosan: a potential biomaterial effective against typhoid. **Current Science**, v.87, p.1176, 2004.

CAPÍTULO 1

SELEÇÃO DE MATERIAIS ORGÂNICOS EM DIFERENTES PROPORÇÕES PARA PRODUÇÃO DO BIOFERTILIZANTE MISTO

SELEÇÃO DE MATERIAIS ORGÂNICOS EM DIFERENTES PROPORÇÕES PARA PRODUÇÃO DO BIOFERTILIZANTE MISTO

Resumo

O biofertilizante misto produzido a partir da mistura de rochas fosfatadas e potássicas com adição de enxofre elementar inoculado com a bactéria oxidante do enxofre *Acidithiobacillus*, e em mistura com materiais orgânicos, tem incrementado a disponibilidade de nutrientes para as culturas agrícolas, principalmente K, P, Ca, Mg. Além disso, este material deve fornecer N ao meio de cultivo. No entanto, este material é pobre em N havendo a necessidade de misturá-lo com materiais orgânicos, e realizar a inoculação com bactérias diazotróficas de vida livre. Objetivou-se avaliar a melhor ou as melhores proporções de compostos orgânicos para compor o biofertilizante misto. O experimento foi realizado em casa de vegetação, onde foram preparadas 22 bandejas com três repetições. Foram utilizados três tipos de materiais orgânicos para compor os tratamentos: T= Torta; H=húmus de minhoca; C=Composto de poda de árvores, respectivamente, em proporções equivalentes, 1(5:0:0), 2(4:1:0), 3(3:1:1), 4(2:3:0), 5(1:4:0), 6(4:0:1), 7(3:2:0), 8(3:0:1), 9(2:2:1), 10(2:1:2), 11(1:3:1), 12(1:1:3), 13(1:2:2), 14(0:5:0), 15(0:4:1), 16(0:1:4), 17(0:3:2), 18(0:2:3), 19(0:0:5), 20(2:0:3) (v/v). Para avaliação dos tratamentos foram realizadas amostragens em dias, aos 0; 10; 20; 30; 40, (dias), realizando-se as análises químicas: pH (H₂O), C, N (total), P e K disponível, Ca e Mg trocável, Al⁺³ trocável. O ensaio foi realizado no delineamento inteiramente casualizado. Houve diferença significativa entre os tratamentos analisados, dentro de cada período de incubação, exceto para o carbono-C e o nitrogênio-N, havendo apenas efeitos individuais dos tratamentos em relação ao parâmetro analisado. De maneira geral os tratamentos 4-(2:3:0), 7-(3:2:0); 9-(2:2:1), se destacaram na maioria dos períodos avaliados contribuindo de forma significativa para o acréscimo de nutrientes aos tratamentos. As proporções de materiais orgânicos contribuíram positivamente

para o acréscimo de nutrientes aos substratos. As proporções 4-(2:3:0), 7-(3:2:0), 3-(3:1:1), se destacaram apresentando os melhores resultados. As misturas desses materiais orgânicos podem ser realizadas com minerais de rochas para formar biofertilizantes mistos para uso alternativo em substituição a fertilizantes comerciais.

Palavras-chave: *Acidithiobacillus*, bactérias diazotróficas de vida livre; húmus de minhoca, matéria orgânica, torta de filtro.

SELECTION OF ORGANIC MATERIALS IN DIFFERENT PROPORTIONS TO PRODUCE THE MIXED BIOFERTILIZER

Abstract

The mixed biofertilizer produced from phosphate and potassic rocks plus Elemental sulfur inoculated with the oxidative bacteria *Acidithiobacillus*, and mixed with organic matters have been incremented the nutrients availability for crops, especially K, P, Ca, Mg, and SO_4^{-3} . Furthermore, the material may furnish N to the agricultural crop, however, in a general these organic matters have low N content, and is necessary to mix with organic matter inoculated with diazotrophic free living bacteria. The aim of the study was to evaluate the best diazotrophic bacteria and to observe the economically proportions of organic matters to produce the mixed biofertilizer. The experiment was carried out in the horticultural Research Center at the University Federal Rural of Pernambuco using 22 trays with three replicates. The treatments used as organic matter: T= Sugarcane filter mud cake; H= Earthworm compost and C= Tree compost, applied respectively, in equivalent proportions: 1(5:0:0),2(4:1:0),3(3:1:1),4(2:3:0),5(1:4:0),6(4:0:1),7(3:2:0),8(3:0:1),9(2:2:1),10(2:1:2),11(1:3:1),12(1:1:3),13(1:2:2),14(0:5:0),15(0:4:1),16(0:1:4),17(0:3:2),18(0:2:3), 19(0:0:5),20(2:0:3)) (v/v). For evaluate the effects of the treatments were collected samples in different times: 0; 1; 2; 3; 4 days, and processed the chemical analyzes: pH (H_2O), total C, total N, available P and K, exchangeable Ca^{2+} and Mg, Al^{+3} . The assay was realized in a complete block design. Significant difference were observed between the different treatments in each time period, except for carbon-C and Nitrogen – N, only with individual effects in relation with the analyzed parameters. In a general the treatments 4-(2:3:0), 7-(3:2:0), and 11-(2:2:1), promoted the best results and especially were important in most of the evaluated time period, and

have contributed significantly to increment the nutrients availability. The proportions of organic materials contributed positively to the addition of nutrients to the substrates. Treatments 4-(2:3:0), 7-(3:2:0), 3-(3:1:1), showed the best results. Mixture of these organic materials with minerals from rocks to produce mixed biofertilizers and may be as alternative for replacement of commercial fertilizers.

Key words: *Acidithiobacillus*, free living diazotrophic bacteria; earthworm compost, organic matter, sugarcane filter mud cake

INTRODUÇÃO

O biofertilizante misto produzido a partir da mistura de rochas fosfatadas e potássicas com adição de enxofre elementar inoculado com a bactéria oxidante do enxofre *Acidithiobacillus*, e em mistura com materiais orgânicos, tem incrementado a disponibilidade de nutrientes para as culturas agrícolas, principalmente P e Ca proveniente de fosfatos naturais, K e Mg da biotita, e sulfato solúvel do ácido sulfúrico produzido (LIMA et al.2007; LIMA, et al.2010; STAMFORD et al.2006; STAMFORD et al.2008a; STAMFORD et al.2008b; STAMFORD et al.2011).

O N também é fornecido quando este material é inoculado com bactérias diazotróficas de vida livre. Este biofertilizante natural pode ser utilizado como produto alternativo em substituição a fertilizantes solúveis, pois os fertilizantes industrializados acarretam aumentos nos custos de produções nos sistemas agrícolas e reduzem o uso destes pelos pequenos agricultores, reduzindo, assim, o fornecimento de nutrientes para os sistemas agrícolas de pequena escala.

Para produção desses adubos industriais é necessário, que estes sejam processados quimicamente, resultando em alta concentrações de nutrientes imediatamente disponíveis. Por outro lado, a produção desses fertilizantes, tais como superfosfatos e termo-fosfatos, requer altas temperaturas, acima do ponto de fusão, ou uso de ácidos fortes (ácido sulfúrico, ácido fosfórico ou ácido nítrico) para promover a solubilização de P a partir de rocha fosfatada, processos estes que exigem alto consumo de energia (VAN STRAATEN, 2002).

Neste sentido, o biofertilizante misto aparece como uma alternativa para uso na agricultura em pequena, média e grande escala, o que é justificável pelo seu custo de produção. A produção deste material é feita em condições naturais, sem uso de produtos corrosivos ou equipamentos de alta tecnologia, podendo ser realizada técnica mais simples (STAMFORD et al.2008a). Entretanto, este material é pobre em N, havendo a necessidade de misturá-lo com materiais orgânicos e realizar a inoculação com bactérias diazotróficas de vida livre. A incorporação de resíduos orgânicos tem mostrado que, além da melhoria nas condições físicas do solo, contribui para o aumento da atividade biológica e o fornecimento de nutrientes para a planta (CHEPOTE, 2003). Resíduos orgânicos, que não apresentam possibilidades de promover problemas ambientais, são utilizados para incremento de N.

Dentre os materiais utilizados para compor o biofertilizante misto, destacam-se o húmus de minhoca (OLIVEIRA et al.2015), compostos de poda de arvores (SOUSA et al.2015), torta de filtro (OLIVEIRA et al.2015), palha de carnaúba (SOUSA et al.2015), bagaço de cana, palha de arroz carbonizado (SAIDELES et al.2009) entre outros, e produtos industrializados (lodo de esgoto=biossólido) biossólido (NÓBREGA et al.2007), lodo de curtume (SILVA et al.2011). Vale ressaltar, que todos estes materiais quando tratados e em condições adequadas, podem ser usados para compor biofertilizante misto e assim, incrementar a disponibilidade de nutrientes e o seu uso na agricultura.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a melhor ou as melhores proporções de compostos orgânicos para compor o biofertilizante misto.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na casa de vegetação da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, onde foram preparadas 66 bandejas, em delineamento inteiramente casualizado, utilizando 3 materiais orgânicos (tabela 1) com 22 proporções desses materiais, com 3 repetições. Cada bandeja foi composta por 5 dm³ das diferentes proporções de materiais orgânicos. Foram utilizados três tipos de materiais, tais como 1) resíduos da torta de filtro-T (Usina Petribú); 2) húmus de minhoca-H (proveniente da empresa Febras); e 3) composto da Prefeitura do Recife-C (Proveniente de Podas de arvores). Os quais constituíram os seguintes tratamentos utilizados em diferentes

proporções = Torta; H=húmus de minhoca; C=Composto de poda de arvores, respectivamente, 1(5:0:0), 2(4:1:0), 3(3:1:1), 4(2:3:0), 5(1:4:0), 6(4:0:1), 7(3:2:0), 8(3:0:1), 9(2:2:1), 10(2:1:2), 11(1:3:1), 12(1:1:3), 13(1:2:2), 14(0:5:0), 15(0:4:1), 16(0:1:4), 17(0:3:2), 18(0:2:3), 19(0:0:5), 20(2:0:3) (v/v). Juntamente com a preparação das bandejas foram preparados os inoculo de bactérias de vida livre (NFB 1001), para inoculação das mesmas. Para produção do inoculo desta bactéria foram preparados pré-inóculos, repicando-se bactérias de vida livre para Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100mL de meio LG liquido. Em seguida foram incubados durante 7 dias sob agitação em mesa horizontal de 150 rpm. Após este período, os pré-inóculos produzidos foram repassados para Erlenmeyers de 2000mL contendo 1000mL de meio LG liquido para produção do inoculo, estes foram incubados durante 7 dias sob agitação em agitador horizontal de 150 rpm. Posterior a este período, 100 mL desse inoculo foi diluído em 400 mL de água de torneira passada em filtro de carvão ativado. Este processo foi realizado para inoculação das diferentes proporções de materiais orgânicos presentes em cada bandeja, ou seja, para cada bandeja foi adicionado 100mL do inoculo diluído em 400 mL de água. Posterior a esse processo, as bandejas foram homogeneizadas com auxílio de espátula esterilizada. Após a inoculação e homogeneização, as bandejas foram incubadas por 40 dias, à temperatura ambiente ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$). O controle da umidade foi feito através da adição diária de água de torneira passada em filtro de carvão ativado, até a capacidade de campo.

Durante a condução dos ensaios em bandejas, foram realizadas amostragens dos substratos, no momento da inoculação, com 10, 20, 30, 40 (dias), respectivamente, para realização de análises químicas: pH (H_2O), C, N (total), P e K disponível, Ca e Mg trocável, Al^{+3} trocável, e K (fotometria de chama); P (colorimetria); N (digestão sulfúrica-kjeldahl); C (oxidação via úmida-Walkley Black); Ca; Mg; Al^{+3} (Espectofotometria de absorção atômica) seguindo a metodologia da Embrapa (2009). Posterior a realizações de todas as amostragens e todas as análises químicas.

Tabela 1. Valores médios dos parâmetros avaliados nos materiais utilizados para compor as proporções (2:3:1 e 3:2:1).

Materiais utilizados	Parâmetros analisados
----------------------	-----------------------

	pH	N	C	P disponível	K disponível
	(H ₂ O)	(g kg ⁻¹)	(g kg ⁻¹)g kg ⁻¹	
Composto orgânico (CO)	7,1b	9,5a	96b	3,21a	0,45a
Húmus de Minhoca (HM)	7,8a	8,6a	110a	2,25b	0,32b
Torta de Filtro (TF)	7,9a	10,0a	216a	1,53b	0,21b
C.V (%)	2,14	15,4	15,1	14,2	16,7

Médias com letras diferentes na vertical não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. pH; N total; C total; P disponível; K disponível.

Foram utilizados dos 22 tratamentos descritos acima os 9 melhores

Fonte	Período de incubação (dias)				
	0	10	20	30	40
	pH (H ₂ O)				

trata
ment
os
sele
cion
ados
atrav
és
de
teste
de

média (Tukey a 5%), para serem utilizados na seleção das melhores proporções de materiais orgânicos que foram aplicadas nos estudos posteriores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 2 estão dispostos os resultados de pH de acordo com cada período de incubação, ocorrendo diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos avaliados.

Tabela 2. Valores de pH nos tratamentos, em bandejas, durante diferentes períodos de incubação à temperatura ambiente.

Tratamento 1(5-0-0)	6,37 ^b ± 0,12	7,06 ^b ± 0,09	7,05 ^b ± 0,01	7,16 ^a ± 0,06	7,15 ^a ± 0,00
Tratamento 4 (2-3-0)	6,61 ^a ± 0,01	7,25 ^a ± 0,12	7,19 ^a ± 0,06	7,21 ^a ± 0,09	7,25 ^a ± 0,12
Tratamento 7(3-2-0)	6,90 ^a ± 0,34	7,48 ^a ± 0,11	7,23 ^a ± 0,09	7,34 ^a ± 0,02	7,34 ^a ± 0,02
Tratamento 8 (3-1-1)	6,81 ^a ± 0,02	7,06 ^a ± 0,15	7,19 ^a ± 0,17	7,25 ^a ± 0,07	7,17 ^a ± 0,05
Tratamento10(2-3-0)	6,68 ^a ± 0,15	7,38 ^a ± 0,06	6,96 ^b ± 0,20	7,34 ^a ± 0,12	7,30 ^a ± 0,17
Tratamento11(2-2-1)	6,73 ^a ± 0,04	6,98 ^b ± 0,40	7,19 ^a ± 0,01	7,27 ^a ± 0,09	7,21 ^a ± 0,07
Tratamento14(1-1-3)	6,41 ^b ± 0,24	6,82 ^b ± 0,06	6,82 ^b ± 0,01	6,76 ^b ± 0,02	6,81 ^b ± 0,01
Tratamento15(1-2-2)	6,63 ^a ± 0,00	6,87 ^b ± 0,04	7,00 ^b ± 0,06	7,02 ^b ± 0,09	7,08 ^a ± 0,4
Tratamento17(0-4-1)	6,75 ^a ± 0,02	6,92 ^b ± 0,01	6,98 ^b ± 0,03	6,80 ^b ± 0,22	6,83 ^b ± 0,02

As proporções utilizadas dos materiais orgânicos correspondem a: Torta de filtro: húmus de minhoca: composto orgânico. Médias com letras minúsculas na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

Os melhores valores de pH foram verificados nos tratamentos 4-(2:3:0), 7-(3:2:0), 3-(3:1:1), 9-(2:2:1), 13-(1:2:2) e 15-(0:4:1) que não diferiram estatisticamente entre si, porém, obtiveram médias superiores em relação aos demais tratamentos, com 0 dias de incubação. Este acréscimo ocorreu devido a maior proporção de torta de filtro e húmus de minhoca presente na maioria desses tratamentos, visto que, estes materiais isoladamente apresentam valores de pH (pH) acima de 7,0 (STAMFOR et al.2006). De uma maneira geral, foram verificados resultados similares para os períodos 10; 20; 30; e 40 dias. Durante 10 dias de incubação os tratamentos 4-(2:3:0), 7-(3:2:0), 3-(3:1:1), favoreceram aumento no valor de pH, Nos 20 dias os melhores resultados foram verificados para os tratamentos 4-(2:3:0), 7-(3:2:0), 3-(3:1:1), 9-(2:2:1). Para os períodos de 30 e 40 dias os tratamentos que obtiveram melhores resultados foram 1-(5:0:0), 4-(2:3:0), 7-(3:2:0), 3-(3:1:1), 9-(2:2:1) em ambos, e 12, 15 em 40 dias.

Os maiores valores médios de pH foram obtidos nos tratamentos 4, 7, 3, com as diferentes proporções de materiais orgânicos influenciando os valores de pH em todos os períodos analisados. Resultados positivos de pH também foram constatados por Stamford et al. (2011), ao avaliarem diferentes níveis de biofertilizante misto (fertilizantes de rochas P e K misturado ao húmus de minhoca) nas propriedades do solo. Santana et al. (2014) observaram valores de pH do solo similares aos encontrados neste trabalho, ao analisar diferentes

doses de biofertilizante misto e bioprotetor no rendimento de pimenta verde (*Capsicum annuum*), e na disponibilidade de nutrientes no solo.

Pesquisas recentes tem relatado a importância do uso do biofertilizante misto (biofertilizante de rochas em mistura com materiais orgânicos) no incremento de pH de substratos orgânicos e no solo, pois o uso de biofertilizante de rochas potássicas e fosfórica sem adição de material orgânico pode reduzir o pH do meio, entretanto, quando este fertilizante é misturado ao material orgânico (resíduos urbanos, húmus de minhoca, composto de poda de arvores) tende elevar o pH do meio de cultivo, (STAMFORD et al.2007; 2009); (SANTANA et al.2014); (OLIVEIRA et al.2014); OLIVEIRA et al.2015).

Para o Ca disponível (g kg^{-3}) presente nas proporções houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos estudados (tabela 2). Os tratamentos 1-(5:0:0) e 9-(2:2:1) se destacaram em relação ao conteúdo de Ca disponível, em 0 dias de incubação, seguido dos tratamentos 3-(3:1:1) e 12-(1:1:3) porém estes apresentaram menor teor de Ca. Os demais tratamentos mostraram médias inferiores. O conteúdo de Ca foi modificado durante os 10 dias de incubação, devido a mistura de diferentes partes de matérias orgânicos que favoreceram aumento desse elemento.

O efeito da adição de diferentes proporções de materiais orgânicos no aumento de Ca nos substratos foi provavelmente devido a mineralização da matéria orgânica por micro-organismos nativos presente neste substrato (bactérias e fungos) ou devido a solubilização da rocha por bactérias solubilizadoras (*Acidithiobacillus*) que promoveu aumento no conteúdo de Ca no substrato, e também da grande quantidade de matéria orgânica (húmus de minhoca, torta de filtro, e composto orgânico) utilizada na composição desse produto. De acordo com resultados relatados por Santana et al. (2014), ao utilizar uma dose de biofertilizante misto de 150% da dose recomendada, obtém-se maior acúmulo de Ca trocável no solo (acima de $3,0 \text{ cmol}_c \cdot \text{dm}^{-3}$) em comparação com fertilizantes solúveis. Este resultado difere do encontrado por Stamford et al. (2011), ao analisar diferentes níveis e tipos de fertilização (fertilizante comercial solúvel; biofertilizante misto; biofertilizantes de rochas) no solo, relataram acúmulos de Ca^+ disponível de 0,43 a 0,58; 0,77 a 0,79; 0,70 a $0,75 \text{ cmol}_c \cdot \text{dm}^{-3}$, respectivamente, os quais não diferiram estatisticamente entre si.

Tabela 3. Valores de Ca nos substratos, incubado em bandejas, durante diferentes dias de incubação à temperatura ambiente.

Fonte	Período de incubação (dias)				
	0	10	20	30	40
	Cálcio (g kg ⁻³)				
Tratamento1(5-0-0)	0,68 ^a ±0,008	0,57 ^a ± 0,11	0,63 ^a ± 0,03	0,88 ^a ±0,03	0,57 ^a ± 0,01
Tratamento4 (2-3-0)	0,31 ^d ±0,03	0,45 ^a ± 0,08	0,38 ^c ± 0,06	0,45 ^c ± 0,02	0,29 ^c ± 0,04
Tratamento7(3-2-0)	0,42 ^c ±0,06	0,37 ^b ± 0,05	0,42 ^c ± 0,02	0,48 ^c ± 0,02	0,44 ^b ± 0,04
Tratamento 8 (3-1-1)	0,50 ^b ±0,08	0,53 ^a ± 0,02	0,57 ^a ± 0,04	0,71 ^b ± 0,08	0,54 ^a ± 0,05
Tratamento10(2-3-0)	0,38 ^c ±0,01	0,33 ^b ±0,003	0,48 ^b ± 0,03	0,36 ^d ± 0,05	0,50 ^a ± 0,02
Tratamento11(2-2-1)	0,61 ^a ±0,08	0,49 ^a ± 0,13	0,49 ^b ±0,006	0,82 ^a ±0,005	0,45 ^b ± 0,08
Tratamento14(1-1-3)	0,52 ^b ±0,05	0,45 ^a ± 0,07	0,54 ^b ± 0,01	0,47 ^c ±0,009	0,42 ^b ± 0,05
Tratamento15(1-2-2)	0,39 ^c ±0,07	0,40 ^b ± 0,02	0,36 ^c ± 0,04	0,48 ^c ±0,02	0,27 ^c ± 0,02
Tratamento17(0-4-1)	0,22 ^d ±0,03	0,32 ^b ± 0,02	0,31 ^c ± 0,01	0,37 ^d ±0,04	0,30 ^c ± 0,005

As proporções utilizadas dos materiais orgânicos correspondem a: Torta de filtro: húmus de minhoca: composto orgânico. Médias com letras minúsculas na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$). C.V.(%)=11,10.

Nos períodos de incubação 20 e 30 dias foram obtidos resultados similares para o Ca⁺, destacando-se os tratamentos 1-(5:0:0) e 3-(3:1:1); 1-(5:0:0);9-(2:2:1), respectivamente. O tratamento 1 é composto pela proporção de 5 partes de torta de filtro para 0 de húmus de minhoca e 0 de composto orgânico, provavelmente essa composição favoreceu o incremento de Ca nesse tratamento. Além disso, o uso da torta de filtro, para compor substrato orgânico, propicia a elevação da produtividade da cultura que será cultivada com este material, por fornecer matéria orgânica, fósforo e cálcio, entre outros nutrientes (ROSSETTO et al.2008).

Efeitos significativos também foram observados para o Ca durante os 40 dias de incubação. Corroborando Stamford et al. (2006), que relataram efeitos significativos no acréscimo de Ca⁺ ao solo fertilizado com biofertilizantes de rochas, ao cultivarem cana de açúcar em solos do tabuleiro costeiro no estado de Pernambuco - Brasil. Estes autores também observaram acréscimo de Ca⁺ de 100% em solo com biofertilizante misto e biofertilizante de rochas, quando comparado com fertilizante solúvel e o tratamento controle, avaliando o potencial do biofertilizante de rochas na produção de uvas (*Vitis vinífera*) cultivadas no Vale de São Francisco na região do semiárida do Brasil (STAMFORD et al.2011).

O efeito das proporções (tratamentos) no teor de Mg trocáveis (g kg⁻³) foram significativos e estão dispostos na (Tabela 3). O tratamento 1-(5:0:0)

contribui positivamente para o incremento desse nutriente, aos 0 dias e 30 dias, se sobressaindo em relação aos demais tratamentos. O acúmulo de Mg trocável aos 10 e 20 dias foram verificados nos tratamentos 9-(2:2:1) e 3-(3:1:1), respectivamente. Em relação aos 40 dias o tratamento 15-(0:4:1) se destacou. Santana et al. (2014) não constataram diferenças significativas entre os teores de Mg avaliados no solo, ao utilizarem diferentes tipos de fertilização no solo.

Acréscimos de magnésio trocável no solo e em substratos orgânicos, são constados na literatura (MOURA et al.2007; STAMFORD et al.2006b; STAMFORD et al.2009; STAMFORD et al.2014), pois este é solubilizado dos minerais por exemplo da biotita usada na produção do biofertilizante, por efeito da acidez promovida pela bactéria oxidante do enxofre elementar (*Acidithiobacillus*).

Tabela 4. Valores de Mg nos substratos, incubado em bandejas, durante diferentes dias de incubação à temperatura ambiente.

Fonte	Período de incubação (dias)				
	0	10	20	30	40
	Magnésio (g kg ⁻³)				
Tratamento1 (5-0-0)	0,093 ^a ±0,004	0,112 ^b ±0,01	0,070 ^c ± 0,002	0,187 ^a ±0,004	0,022 ^f ± 0,0007
Tratamento4 (2-3-0)	0,066 ^b ±0,009	0,066 ^c ±0,005	0,059 ^c ± 0,001	0,154 ^b ±0,007	0,060 ^d ± 0,003
Tratamento7 (3-2-0)	0,067 ^b ±0,010	0,057 ^d ±0,007	0,110 ^b ± 0,004	0,085 ^d ± 0,01	0,055 ^d ± 0,002
Tratamento8 (3-1-1)	0,048 ^c ±0,005	0,049 ^d ±0,001	0,136 ^a ± 0,006	0,067 ^e ±0,002	0,089 ^c ± 0,01
Tratamento10(2-3-0)	0,056 ^c ±0,004	0,066 ^c ±0,006	0,060 ^c ± 0,005	0,161 ^b ±0,009	0,112 ^b ± 0,04
Tratamento11(2-2-1)	0,062 ^b ±0,007	0,136 ^a ± 0,01	0,057 ^c ± 0,005	0,107 ^c ±0,007	0,116 ^b ±0,011
Tratamento14(1-1-3)	0,047 ^c ±0,008	0,047 ^d ±0,003	0,098 ^b ± 0,002	0,077 ^d ±0,001	0,100 ^c ±0,0004
Tratamento15(1-2-2)	0,062 ^b ±0,007	0,057 ^d ±0,0004	0,109 ^b ± 0,01	0,062 ^e ±0,003	0,039 ^e ± 0,003
Tratamento17(0-4-1)	0,068 ^b ± 0,01	0,063 ^c ± 0,007	0,109 ^b ± 0,005	0,116 ^c ±0,005	0,138 ^a ± 0,007

As proporções utilizadas dos materiais orgânicos correspondem a: Torta de filtro: húmus de minhoca: composto orgânico. Médias com letras minúsculas na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤ 0.05).

O P disponível presente nos tratamentos foi modificado pela mistura de diferentes proporções de materiais orgânicos, obtendo-se efeito significativo de acordo com cada período analisado (Tabela 4). Foram verificados incrementos de P nos tratamentos 7-(3:2:0) e 15-(0:4:1) que não diferiram entre si estatisticamente, durante o período de 0 dias. Aos 10 e 20 dias os tratamentos que influenciaram o conteúdo de P foram 3-(3:1:1) e 4-(2:3:0), respectivamente, e em 30 dias de incubação foi verificado acúmulo de P nos tratamentos 4-

(2:3:0) e 7-(3:2:0), e para os 40 dias o tratamento 15-(0:4:1) favoreceu significativamente o teor de P.

Tabela 5. Valores de P nos substratos, incubado em bandejas, durante diferentes dias de incubação à temperatura ambiente.

Fonte	Período de incubação (dias)				
	0	10	20	30	40
Fósforo (g kg ⁻³)					
Tratamento 1 (5-0-0)	1,5 ^d ±0,01	0,57 ^d ±0,0002	2,2 ^c ±0,30	1,8 ^c ±0,34	1,3 ^d ±0,01
Tratamento 4 (2-3-0)	1,5 ^d ±0,01	1,2 ^c ±0,16	1,5 ^d ±0,08	3,2 ^a ±0,09	0,98 ^d ±0,11
Tratamento 7(3-2-0)	2,9 ^a ±0,03	1,3 ^c ±0,09	2,7 ^b ±0,05	3,0 ^a ±0,04	1,4 ^c ±0,23
Tratamento 8 (3-1-1)	2,2 ^b ±0,14	2,3 ^a ±0,13	0,90 ^e ±0,04	1,9 ^b ±0,06	2,1 ^b ±0,16
Tratamento10(2-3-0)	1,9 ^c ±0,08	1,5 ^c ±0,11	3,3 ^a ±0,30	1,6 ^c ±0,05	1,7 ^c ±0,07
Tratamento11(2-2-1)	1,2 ^d ±0,05	1,06 ^c ±0,09	2,7 ^b ±0,39	2,2 ^b ±0,16	2,0 ^b ±0,002
Tratamento14(1-1-3)	0,69 ^e ±0,08	1,6 ^b ±0,20	0,57 ^e ±0,06	1,4 ^c ±0,12	2,1 ^b ±0,02
Tratamento15(1-2-2)	1,7 ^c ±0,31	1,2 ^c ±0,17	1,2 ^d ±0,04	2,2 ^b ±0,23	1,3 ^d ±0,14
Tratamento17(0-4-1)	3,1 ^a ±0,0009	1,4 ^c ±0,23	2,2 ^c ±0,37	1,7 ^c ±0,04	2,9 ^a ±0,48

As proporções utilizadas dos materiais orgânicos correspondem a: Torta de filtro: húmus de minhoca: composto orgânico. Médias com letras minúsculas na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤ 0.05). C.V.(%)=9,84.

Observa-se que houve uma tendência de aumento ou não com o passar do tempo no teor de P de acordo com o tratamento (proporções) em destaque. As proporções de materiais orgânicos que compõem o substrato, o tempo de incubação, as condições ambientais, além da existência de micro-organismos que fixam N e os que decompõem materiais orgânicos (ex: bactérias e fungos), contribuíram para o aumento da disponibilidade de P e de outros nutrientes nesses tratamentos. Além disso, a adição de materiais orgânicos para compor substrato aumenta a atividade microbiana promovendo a mineralização desse material, permitindo assim o aumento da disponibilidade de nutrientes nestes sistemas, solo ou substratos orgânicos.

Avaliando o uso de biofertilizante misto enriquecido N através da inoculação com bactérias diazotróficas de vida livre e fungos da ordem Mucorales (*Cunninghamella elegans*) Stamford et al. (2014), relataram incrementos no teor de P do solo. Resultados similares foram verificados por Silva et al. (2011), ao analisarem o desenvolvimento da cultura do melão, como também a disponibilidade de fósforo nos solos com o uso de biofertilizante fosfatado após três ciclos da cultura.

Para os teores de K^+ disponível ocorreu efeito significativo entre os tratamentos analisados (Tabela 5). Durante 0 dias de incubação o tratamento 4(2:3:0) influenciou o teor K^+ , com 10 dias houve acréscimos de K^+ , nos tratamentos 4, 7, 8, 9, 13, com resultados semelhantes entre si. O K^+ disponível aumentou durante 30 e 40 dias de incubação, nos tratamentos 12-(1:1:3), e 3-(3:1:1), 13-(1:2:2), respectivamente.

Tabela 6. Valores de K^+ nos substratos, incubado em bandejas, durante diferentes dias de incubação à temperatura ambiente.

Fonte	Período de incubação (dias)					As por ção s utili zad as dos mat eria is org ânic os corr esp
	0	10	20	30	40	
	Potássio ($g\ kg^{-3}$)					
Tratamento 1 (5-0-0)	0,10 ^d ±0,01	0,33 ^b ±0,06	0,20 ^d ±0,04	0,21 ^c ±0,03	0,13 ^d ±0,01	
Tratamento 4 (2-3-0)	0,71 ^a ±0,01	0,53 ^a ±0,06	0,60 ^b ±0,11	0,40 ^b ±0,01	0,38 ^c ±0,08	
Tratamento 7 (3-2-0)	0,51 ^b ±0,05	0,48 ^a ±0,03	0,49 ^b ±0,04	0,30 ^c ±0,07	0,53 ^b ±0,11	
Tratamento 8 (3-1-1)	0,32 ^c ±0,01	0,36 ^b ±0,07	0,35 ^c ±0,0	0,25 ^c ±0,02	0,84 ^a ±0,05	
Tratamento 10 (2-3-0)	0,43 ^b ±0,003	0,52 ^a ±0,00	0,53 ^b ±0,07	0,39 ^b ±0,08	0,33 ^c ±0,01	
Tratamento 11 (2-2-1)	0,44 ^b ±0,04	0,51 ^a ±0,02	0,37 ^c ±0,06	0,49 ^b ±0,08	0,35 ^c ±0,02	
Tratamento 14 (1-1-3)	0,44 ^b ±0,04	0,42 ^b ±0,005	0,35 ^c ±0,05	0,79 ^a ±0,20	0,21 ^d ±0,007	
Tratamento 15 (1-2-2)	0,46 ^b ±0,02	0,48 ^a ±0,05	0,43 ^c ±0,02	0,41 ^b ±0,06	0,72 ^a ±0,19	
Tratamento 17 (0-4-1)	0,50 ^b ±0,003	0,62 ^a ±0,006	0,72 ^a ±0,006	0,31 ^c ±0,03	0,44 ^c ±0,001	

onde a: Torta de filtro: húmus de minhoca: composto orgânico. Médias com letras minúsculas na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$). C.V.(%) – 14,77.

O acréscimo de K^+ , em todos os tratamentos está associado a composição química e física dos materiais orgânicos utilizados para produzir esses tratamentos. De acordo com Santos et al. (2010) a torta de filtro é um composto orgânico rico em potássio, variando sua composição de acordo com a variedade da cana e sua maturação. Acréscimo de K^+ , ao solo e em substratos orgânicos ocorre devido adição de biofertilizante misto e materiais orgânicos, que apresentam como vantagem efeito residual superior aos fertilizantes solúveis e proporcionam maior disponibilidade de nutrientes as culturas (STAMFORD et al.2014). Outra maneira de aumentar o acúmulo de K^+ , e P ao solo, é através da aplicação do bioprotetor, ou seja, biofertilizante misto inoculado com fungos da ordem Mucorales que produzem quitina e quitosana em suas paredes celulares. Efeitos positivos da aplicação de quitosana foram relatados por Stamford et al.(2006 , 2007, 2008), onde os tratamentos com quantidades mais elevadas de enxofre elementar inoculado

com *Acidithiobacillus* produziram ácidos que favoreceram o aumento da produção P e K disponíveis no solo.

Para o N e C não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos analisados dentro de cada período de incubação, ocorrendo apenas efeitos individuais dos tratamentos em relação a esses nutrientes (Figura 1). Houve aumento da concentração de N total com média 11,58 e 11,61 g kg^{-1} nos tratamentos 4-(2:3:0) e 15-(0:4:1), respectivamente, que não diferiram entre si estatisticamente (Figura 1a), e foram superiores aos outros tratamentos. Este resultado difere do encontrado por Stamford et al. (2014), que observaram acréscimo de N total de 100% no solo, com a adição de diferentes tipos de fertilização no solo (diferentes doses de biofertilizante misto e fertilizante solúvel), quando comparados com o controle. Os autores também relataram incremento de N total no solo ao utilizarem biofertilizante de rochas misturado com composto de minhoca enriquecido em N por inoculação com as bactérias diazotróficas de vida livre (NFB 1001).

Em relação ao C todos os tratamentos contribuíram para o incremento desse nutriente, apresentando resultados similares de acordo com a estatística, e com acréscimo máximo de C de 112 g kg^{-1} (Figura 1b). O uso de materiais orgânicos para compor substrato pode promover aumento na disponibilidade de nutrientes, principalmente de N e C, visto que estes materiais são ricos nesses elementos, que podem ser liberados através da decomposição e mineralização.

Efeitos positivos no aumento de C ao solo foram relatados por Stamford et al. (2011), usando diferentes tratamentos de fertilização no solo (biofertilizante misto; biofertilizante de rochas e fertilizante solúvel) no cultivo de uvas (*Vitis vinífera*).

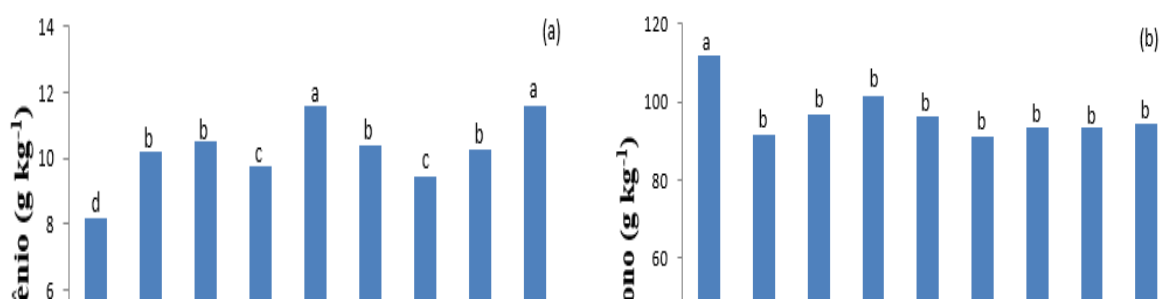


Figura 1. Teor de N (g kg^{-1}) e C (g kg^{-1}) em diferentes tratamentos com materiais orgânicos (torta de filtro; húmus de minhoca; composto orgânico) e inoculado com bactéria diazotrófica de vida livre. TRA1 (5:0:0); TRA4 (2:3:0); TRA7 (3:2:0); TRAT8 (3:1:1); TRAT10 (2:3:0); TRAT11 (2:2:1); TRAT14 (1:1:3); TRAT15 (1:2:2); TRAT17 (0:4:1).

CONCLUSÃO

As misturas dos materiais orgânicos contribuíram para o acréscimo de nutrientes nas mesmas. Os tratamentos 4-(2:3:0), 7-(3:2:0), 3-(3:1:1), com as proporções de torta de filtro; húmus de minhoca; composto orgânico, apresentaram os melhores resultados.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos recursos dispendidos para a realização dos trabalhos e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHEPOTE, R.E. Efeito do composto da casca do fruto de cacau no crescimento e produção do cacaueiro. **Agrotrópica**, n.15, v.1, p.1- 8, 2003.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2º ed, Brasília, 2009. p. 627.

LIMA, F. S.; STAMFORD, N. P. ; SOUSA, C. S. ; LIRA JÚNIOR, M. A.; MALHEIROS, S. M. M. ; VAN STRAATEN, P. Earthworm compound and rock biofertilizer enriched in Nitrogen by inoculation with free living diazotrophic bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.27, p.1-7, 2010.

LIMA, R. C. M.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S.; LIRA JÚNIOR, M. A.; DIAS, S. H. Eficiência e efeito residual de biofertilizantes de rochas com PK e enxofre com *Acidithiobacillus* em alface. **Horticultura Brasileira**. v.25, p.402-407, 2007.

MOURA, P.M.; STAMFORD, N.P.; DUENHAS, L.H.; SANTOS, C.E.R.S.; NUNES, G.H.S.; Eficiência de biofertilizantes de rochas com *Acidithiobacillus* em melão. **Braz. J. Agric. Sci.** v.2, p.1-7, 2007.

NÓBREGA, R. S. A.; VILAS BOAS, R. C. V.; NOBREGA, J. C. A.; PAULA, A. M. de.; MOREIRA, F. B. de S. Utilização de biossólido no crescimento inicial de mudas de aroeira (*Schinus terebynthifolius Raddi*). **Revista Árvore**, v.31, n.2, p.239-246, 2007.

OLIVEIRA, F. L. N.; STAMFORD, N. P.; NETO, D. S.; OLIVEIRA, E. C. A.; OLIVEIRA, W. S.; SILVA SANTOS, C. E. R. Effects of biofertilizers produced from rocks and organic matter, enriched by diazotrophic bacteria inoculation on growth and yield of sugarcane. **Australian Journal of Crop Science**. v. 9, n.6, p. 504-508, 2015.

OLIVEIRA, W. S.; STAMFORD, N. P.; SILVA, E. V. N.; SILVA SANTOS, C. E. R.; FREITAS, A. D. S.; ARNAUD, T. M. S.; SARMENTO, B. F.; Biofertilizer produced by interactive microbial processes affects melon yield and nutrients availability in a Brazilian semiarid soil. **Australian Journal of, Crop Science**. v.8, n. 7, p.1124-1131, 2014.

ROSSETTO, R.; DIAS, F. L. F.; VITTI, A. C. Problemas nutricionais dos solos nas novas fronteiras canavieiras. *Idea News, Ribeirão Preto*, v. 8, n. 94, p. 78-90, 2008.

SAIDELLES, F. L. F.; CALDEIRA, M. V. W.; SCHIRMER, W. N.; SPERANDIO, H. V. Casca de arroz carbonizada como substrato para produção de mudas de tamboril-da-mata e garapeira. **Ciências Agrárias**, v.30, n.1, p.1173-1186, 2009.

SANTOS, D.H.; TIRITAN, C.S.; FOLONI, J.S.S.; FABRIS, L.B.; produtividade de cana-de-açúcar sob adubação com torta de filtro enriquecida com fosfato solúvel. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, p.454-461, 2010.

SANTANA, R.S.; STAMFORD, N.P.; SILVA JUNIOR, S.; SANTOS C.E.R.S.; FREITAS A.D.S.; ARNAUD, T.M.S. Influence of Bioprotector with Microbial Inoculation on Green Pepper Yield and Improvement on Soil Nutrients Availability. **International Journal of Agriculture Innovations and Research**, v.2, n. 6, p.2319-1473, 2014.

SANTOS, D.H.; TIRITAN, C.S.; FOLONI, J.S.S.; FABRIS, L.B.; produtividade de cana-de-açúcar sob adubação com torta de filtro enriquecida com fosfato solúvel. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, p. 454-461, 2010.

SILVA, M. O. de .; STAMFORD, N. P.; AMORIM, L. B.; ALMEIDA JUNIOR, A. B.; SILVA, M. O. Diferentes fontes de P no desenvolvimento do meloeiro e disponibilidade de fósforo no solo. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, n.2, p. 268-277, 2011.

SOUSA, L. B.; NÓBREGA, R.S.A.; LUSTOSA, J.F.; AMORIM, S.P.N.; FERREIRA, L.V.M.; NÓBREGA, J.C.A. Cultivo de *Sesbania virgata* (Cav. Pers) em diferentes substratos. **Revista de Ciências Agrárias**, v.58, n.3, p. 240-247, 2015.

STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. e S.; FELIX, F. F.; OLIVEIRA, F. L. N. de. Biofertilizers from Phosphate and Potash Rocks with *Acidithiobacillus* and Organic Matter Enriched by Free Living Diazotrophic Bacteria. In: ARAÚJO, A. S. F. de; FIGUEIREDO, M. do V. B. **Microbial Ecology of Tropical Soils**. Nova Science Publishers. p. 149-157, 2011.

STAMFORD, N. P.; ANDRADE, I. P.; JUNIOR, S. S. da.; JUNIOR, M. L.; SANTOS, C. S.; FREITAS, A. S. de.; VAN-STRAATEN, P.; Soil properties and grape yield affected by rock biofertilisers with earthworm compound. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v.11, n.4, p.15-25, 2011.

STAMFORD N. P, MOURA P. M, LIRA JUNIOR M. A, SANTOS CERS, DUENHAS L. H, Gava CAT. Chemical attributes of an Argisol of the Vale do São Francisco after melon growth with phosphate and potash rocks biofertilizers. **Braz J Hortic**, v.27, p.447- 452, 2009.

STAMFORD, N. P.; IZQUIERDO, C. G.; FERNÁNDEZ, M. T. H.; MORENO, M. del C. M. Biofertilizante de rochas fosfatadas e potássicas com enxofre e *Acidithiobacillus*. In: FIGUEIREDO, M. do V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. de R. e S. **Micro-organismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, p.401-421, 2008a e b).

STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; BARROS NETO, B. de.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. de. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium, **Electronic Journal of Biotechnology**, v.10, n.01, p.61-68, 2007.

STAMFORD, N. P.; LIMA, R. A.; SANTOS, C. E. DE R. E S. ; DIAS, S.H.L. Rock biofertilizers with *Acidithiobacillus* on sugarcane yield and nutrient uptake in a Brazilian soil. **Geomicrobiology Journal**, Elsevier - United Kingdom, v. 23, n. 5, p. 261-265, 2006.

van STRAATEN P. Rocks for crops: **Agrominerals of Sub-Saharan Africa**. (ICRAF: International Center for Research in Agroforestry). Nairobi, Kenya. University of Guelph, Ontario, p.338, 2002.

CAPÍTULO 2

BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS DE VIDA LIVRE PARA USO NA PRODUÇÃO DE BIOFERTILIZANTE MISTO

BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS DE VIDA LIVRE PARA USO NA PRODUÇÃO DE BIOFERTILIZANTE MISTO

Resumo

O incremento de N em materiais orgânicos pode ser promovido pela inoculação com bactérias diazotróficas de vida livre. Estes materiais orgânicos misturados com biofertilizantes de rochas fosfatadas e potássicas produzem o biofertilizante misto que pode ser utilizado como produto alternativo na agricultura. Objetivou-se selecionar os melhores isolados de bactérias diazotróficas de vida livre para aperfeiçoar o biofertilizante misto produzido em bandejas, em comparação com os isolados atualmente utilizados. Para isolamento das diazotróficas de vida livre foram usados solos de diferentes regiões do Nordeste, utilizando-se placas de sílica-gel, seguido por incubação a 28 ± 2 °C, durante 7 dias. As colônias foram purificadas em placas com meio LG e avaliada a atividade da nitrogenase por cromatografia gasosa. A seguir realizou-se o sequenciamento completo do gene rRNA 16S. Foram selecionados os 2 melhores diazotróficas para comparar com os isolados utilizados na produção de biofertilizante. Para a produção do biofertilizante misto usou-se torta e húmus de minhoca nas proporções 3:2 e 2:3, em mistura com uma parte de biofertilizante de rochas, que foi inoculado com inóculo em duas quantidades (100 e 200 mL). O experimento foi conduzido no fatorial 4x2 (quatro isolados e duas quantidades de inóculos), com 3 repetições. Amostras foram retiradas no início e com 10, 20, 30 e 40 dias após a inoculação, sendo analisados: pH (H₂O), C e N total, P e K disponíveis. As estirpes no sequenciamento obtiveram 99% de similaridade com as sequências de gene rRNA 16S do banco de dados. Na proporção 3:2:1, verificou-se que houve interação significativa para todos os parâmetros analisados, exceto para o carbono (C), com destaque para os isolados NFB 1003, NFB 4, e NFB 6, que favoreceram acréscimos dos nutrientes. Na proporção 2:3:1, houve efeito significativo para P e K disponível e para C, que mostraram efeito individual. As estirpes fixadoras de N foram identificadas nos gêneros *Bacillus*, *Mesorhizobium*, *Paenibacillus* e *Beijerinckia*. As estirpes que incrementaram nutrientes ao meio foram NFB 4 e NFB 1003, no tempo de 25 a 30 dias, e a inoculação de uma maneira geral, enriqueceu o N no biofertilizante misto e podem ser recomendadas para uso na agricultura como substrato alternativo.

Palavras-chave: Fixação biológica de N; materiais orgânicos; minerais de rochas; rochas fosfatadas e potássicas; sequenciamento rRNA 16S.

**FREE LIFE BACTERIA DIAZOTROPHIC TO USE
PRODUCTION OF MIXED BIOFERTILIZER**

Abstract-

The enrichment of N in organic materials may be promoted by inoculation with free living diazotrophic bacteria. Organic materials mixed with phosphate and potassic rocks formed mixed biofertilizer that may be used as alternative substrate in sustainable agriculture. The aim of the study was to evaluate the best free living diazotrophic bacteria to optimization of the mixed biofertilizers produced in trays comparing with the actual isolates. The free living diazotrophic bacteria were isolated from different soils of the Northeast region, using silica-gel plaques, incubated at 28 ± 2 °C, by 7 days. Colonies were purified in plaques with LG medium and evaluated the N_2^{ase} Activity by gaseous chromatography. Following were realized the gene rRNA 16S sequence. The best diazotrophic bacteria were selected and compared with the actual isolates used to produce the mixed biofertilizers. To optimization of the mixed biofertilizers were used the best proportions of Sugarcane bud make and earthworm compound (3:2 e 2:3), mixed with one volume of PK rock biofertilizer inoculated with two volumes of inoculum (100 and 200 mL). The experiment used the factorial 6x2, with 3 replicates. Samples were collected at initial time (TO) and with 10, 20, 30 and 40 days after inoculation, analyzed: pH (H₂O), total C and N, available P and K. In the gene sequence the strains obtained similarity 99% with the sequences of rRNA 16S of the Bank dates. Proportion 3:2:1 showed significant interaction for all analyzed parameter, except to (C), with best results for isolates NFB 1003, NFB 4 and NFB 6, which increase of nutrients. Proportion 2:3:1 displayed significant effect in available P and K and for carbon that showed only individual effects. The strains that fixed N were identified as *Bacillus*, *Mesorhizobium*, *Paenibacillus* and *Beijerinckia*. The strains NFB 4 and NFB 1003 incremented nutrients when evaluated in time 25 to 30 days, and the inoculation, in a general, enriched the biofertilizer in N and may be recommended for application in sustainable agriculture as alternative for conventional fertilizers.

Keywords: Biological nitrogen fixation; phosphate and potassic rocks; organic materials; sequence rRNA 16S.

INTRODUÇÃO

O processo de fixação biológica de N apresenta uma dinâmica bastante complexa, podendo ser realizado por micro-organismos simbióticos, associativos, e de vida livre (REIS et al.2006), que contribuem para o incremento ou declínio de N nos sistemas agrícolas, dependendo das condições edáficas e climáticas onde esses micro-organismos estejam inseridos (RUDNIK et al.,1997). O aumento do teor desse nutriente nos ecossistemas ou em substratos orgânicos pela atuação de micro-organismos reflete um ganho de N superior aos encontrados em ambientes sem a sua presença.

O acúmulo desse nutriente nos materiais orgânicos é promovido pela inoculação com bactérias diazotróficas de vida livre. Além desse aspecto, essas bactérias melhoram as condições físicas e químicas desses materiais. Neste sentido, o uso de materiais orgânicos inoculados com bactérias diazotróficas de vida livre em mistura com biofertilizantes de rochas funcionam como uma alternativa viável e econômica nos sistemas agrícolas, pois, podem ser utilizados pelos agricultores para substituir a fertilização mineral solúvel (STAMFORD et al.2007, 2011). Produção de insumos alternativos podem ser feitos utilizando o biofertilizante, produzido a partir de rochas fosfatadas e potássicas, com adição de enxofre elementar inoculado com *Acidithiobacillus*, em mistura ao material orgânico, formando o biofertilizante misto.

O uso de biofertilizantes misto visa elevar os teores de nutrientes no solo, além de promover aumento de produtividade e na qualidade dos frutos (OLIVEIRA et al.2015). Entretanto, as rochas fosfatadas e potássicas não possuem nitrogênio em adequada quantidade e, portanto não adicionam ao solo o N necessário para o desenvolvimento das plantas não leguminosas. Portanto, a fertilização com NPK é um dos fatores mais importantes, por afetar a produção, a nutrição e a disponibilidade de nutrientes no solo. Assim, torna-se necessário intensificar o uso de novas técnicas visando incrementar a produtividade e melhorar ao máximo o sistema de produção agrícola (STAMFORD et al.2008a). Esses aspectos justificam a produção de um biofertilizante usando matéria orgânica enriquecida com N por bactérias diazotróficas, e diversos trabalhos evidenciam efeitos satisfatórios com cultivo em diferentes solos e plantas (ANDRADE et al.2009; LIMA et al.2007; STAMFORD et al.2008; STAMFORD et al.2011; SILVA et al.2011).

Os resultados mostraram que a aplicação do biofertilizante de rocha fosfatada, em comparação com os fertilizantes convencionais, entre outros benefícios, promove o crescimento das plantas com valores superiores na produção de matéria seca da parte aérea e aumento no fornecimento de P disponível no solo.

O trabalho foi realizado com o objetivo de selecionar as bactérias diazotróficas de vida livre mais efetivas no enriquecimento em N, através de avaliação em bandejas, comparando com os isolados atualmente utilizados no laboratório de biotecnologia-UFRPE, para serem utilizados na produção do biofertilizante misto.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção da bactéria diazotrófica

O experimento foi realizado em casa de vegetação do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE. Os solos utilizados para isolamento das bactérias diazotróficas de vida livre foram provenientes de diferentes regiões do Nordeste (Tabela 1). Os solos foram coletados com amostras na profundidade de 0 a 20 cm, colocados para secar, destorroados e em seguida passados em peneira (50 mesh). Os resultados da análise química encontram-se na Tabela 2.

O isolamento das bactérias de vida livre obtidas dos diferentes solos seguiu os procedimentos técnicos específicos descritos por Döbereiner (1989). Foram utilizadas placas de sílica-gel, acrescidas com 200-250 mg de solo por placa, e na incubação foram mantidas na temperatura de 28 ± 2 ° C, durante 7 dias, com observação diária das colônias. Após o crescimento dos isolados em placas com meio sílica-gel, foi feita a transferência para placas de Petri com meio LG sólido até formarem colônias puras, de acordo com a metodologia descrita por Döbereiner et al. (1995). O meio LG é constituído de: 20 g de sacarose ou açúcar cristal; 0,05 g K_2HPO_4 ; 0,15 g KH_2PO_4 ; 0,02 g $CaCl_2$; 0,20 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,002 g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 0,01 g $FeCl_3 \cdot 2H_2O$; 2 mL azul de bromotimol (sol. 0,5 % em etanol); 1 g $CaCO_3$, sendo todos os componentes dissolvidos em 1 L de água destilada, e a seguir feito o ajuste do pH para próximo de 6,8 com NaOH. A seguir adicionou-se de 15 g de Agar (P.A.), para manter o meio sólido, e posteriormente foi realizada a avaliação da atividade da nitrogenase por cromatografia gasosa (Boddey & Döbereiner, 1982).

Os isolados foram crescidos em tubos de vidro com capacidade de 15 mL, contendo 5 mL de meio sólido. Os tubos foram incubados a 30°C por 8 dias. Após o crescimento das colônias, estes foram fechados com rolhas de borracha perdurável (subseal), esterilizados, sendo retirados 2mL de ar de cada tubo e injetado 2mL de acetileno, sendo incubados por um período de uma hora, em seguida retirou-se 1mL de ar dos tubos de vidro, transferindo-o para tubos de vácuo, para serem analisados no Cromatógrafo a gás, com ionização de chama (Perkin Elmer, modelo F11), para determinar a concentração de etileno na amostra (Tabela 3). Posteriormente foram selecionados os quatros isolados que apresentaram melhores resultados de atividade da nitrogenase. Os melhores resultados foram obtidos com os seguintes isolados: Isolado 2, Isolado 4, Isolado 6, Isolado 7), que foram provenientes dos solos 2, 4, 6 e 7, respectivamente. Posteriormente, estes isolados selecionados, juntamente com os isolados atualmente utilizados na produção do biofertilizante misto (NFB 1001 e NFB 1003), foram repicados em meio de cultivo LG, e encaminhados para a Macrogen Inc. Company (South Korea), para realização do sequenciamento completo do gene 16S rRNA.

Tabela 1. Caracterização e localização das áreas onde foram coletadas as amostras de solo

Solos		Descrição da área						Município
S1		Área com sabiá						Itambé/PE
Solo	pH (H ₂ O)	P mg.dm ⁻³	Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	SB
S1	5,48	30	0,25	2,80	1,5	0,15	0,31	4,76
S2	5,75	53	0,05	3,45	2,3	0,37	0,38	6,5
S3	6,63	116	0,05	2,20	1,6	0,30	0,44	4,54
S4	5,87	95	0,10	2,05	1,2	0,15	0,38	3,78
S5	4,99	38	0,40	1,45	0,9	0,18	0,34	2,87
S6	4,98	31	0,48	0,75	0,7	0,26	0,46	2,17
S7	5,47	23	0,15	1,15	0,7	0,06	0,25	2,16
S8	6,72	192	0,05	2,65	1,8	0,73	0,48	5,66
S2		Área com gliricídia						Itambé/PE
S3		Área com cana-de-açúcar						Piauí/PI
S4		Área com cana-de-açúcar						São Miguel/AL
S5		Área com cana-de-açúcar						Ribeirão/PE
S6		Área de caatinga						Garanhuns/PE
S7		Área com cana-de-açúcar						Sirinhaém/PE
S8		Área com sabiá						Belo Jardim/PE

Tabela 2. Caracterização química das amostras de solos utilizadas para a obtenção dos isolados com bactéria diazotrófica de vida livre.

Teores médios de duas amostras compostas com análise química realizada de acordo com a metodologia da Embrapa (2009). S1: solo 1; S2: solo 2; S3: solo 3; S4: solo 4; S5: solo 5; S6: solo 6; S7: solo 7; S8: solo 8.

Tabela 3. Resultados da análise de redução do acetileno a etileno pela técnica (ARA), dos isolados de bactérias de vida livre isoladas de diferentes regiões do Nordeste.

Amostra de Solo	Repetição			Média
	I	II	III	
Etileno produzido (mg/kg) por hora				

S1	0,402	0,552	0,449	0,468
S2	0,770	0,863	0,679	0,771
S3	0,327	0,367	0,369	0,354
S4	0,704	0,639	0,610	0,651
S5	0,448	0,609	0,424	0,494
S6	0,570	0,490	0,541	0,534
S7	0,586	0,475	0,982	0,681
S8	0,511	0,572	0,567	0,550

S1: solo 1; S2: solo 2; S3: solo 3; S4: solo 4; S5: solo 5; S6: solo 6; S7: solo 7; S8: solo 8.

Produção do Biofertilizante misto

Os biofertilizantes de rochas (fosfatada e potássica), a serem utilizados na produção do biofertilizante misto (BNPK), foram produzidos na horta da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, em canteiros com 10 metros de comprimento, 1 m de largura e 0,50m de profundidade. O biofertilizante de rocha com fosforo (BP) utilizou apatita natural de Irecê (Bahia), com 24 % de P_2O_5 total; e o de rocha potássica (BK) utilizou a biotita xisto de Santa Luzia (Paraíba) com 10 % de K_2O total, em mistura com enxofre elementar (S) na proporção de 1:10 (S: rocha), sendo ambos inoculados com a bactéria oxidante do enxofre *Acidithiobacillus* (STAMFORD et al. 2007a).

Para a produção do biofertilizante misto (BNPK) foram utilizados os biofertilizantes com fosforo (BP) e o biofertilizante com potássio (BK) em mistura na proporção (1:1), os quais constituem o biofertilizante de rochas fosfatadas e potássicas (BPK). Após a produção utilizou-se $1dm^3$ desse biofertilizante de rochas BPK, para cada uma das melhores proporções de materiais orgânicos provenientes do primeiro experimento, (3:2:0; 2:3:0; T:H:C), T=torta de filtro, H=húmus de minhoca, C=composto orgânico, formando as seguintes proporções, (3:2:1; e 2:3:1) T:H:BPK, respectivamente, visando verificar o melhoramento da produção do biofertilizante misto (BNPK).

Para incrementar o enriquecimento do substrato em N, as bandejas com as melhores proporções de materiais orgânicas foram inoculadas com os quatros diazotróficas de vida livre selecionados pela atividade da nitrogenase, avaliadas por cromatografia gasosa, e também os dois isolados utilizados

atualmente na inoculação do biofertilizante misto (NFB1001 e NFB 1003), totalizando 6 isolados de bactérias diazotróficas de vida livre.

Para cada bandeja com os tratamentos com as melhores proporção de matéria orgânica (3:2:1; e 2:3:1) T:H: e BKP foram feitas as inoculações, usando-se diferentes quantidades de inóculo (100 e 200 mL), crescidos em meio LG em Erlenmeyers de 250 mL. O experimento foi conduzido no delineamento experimental inteiramente casualizado, usando o fatorial 4x2, com 2 isolados de bactérias diazotróficas (2 selecionadas nos testes de cromatografia, e os dois isolados atualmente utilizados), aplicados em duas diferentes quantidades de inoculantes (100mL e 200mL), com 3 repetições, totalizando 72 bandejas.

Após a inoculação as bandejas foram homogeneizadas com auxílio de espátula esterilizada, e em seguida incubadas por 40 dias, à temperatura ambiente ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$). O controle da umidade foi feito por adição diária de água de torneira passada em filtro de carvão ativado, até obter valor próximo da capacidade de campo.

Durante a condução dos ensaios em bandejas foram realizadas amostragens dos substratos no momento da inoculação (0), com 10, 20, 30, 40 (dias), formando outro fatorial (4x5) no mesmo experimento, com 4 isolados de bactérias diazotróficas e 5 tempos de amostragem. Nas amostras coletadas nos diferentes tempos de incubação foram feitas as seguintes análises químicas: pH (H_2O), C, N, (totais) e P e K trocável (Embrapa, 2009).

Através da análises estatística foi feita a seleção entre os 6 isolados (selecionando-se os três melhores isolados para construção dos gráficos de regressão), em função da contribuição nos parâmetros analisados, usando-se o Programa Estatístico (SISVAR). As médias foram comparadas usando-se o teste de Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sequenciamento completo do gene rRNA 16S dos isolados

Os 4 melhores isolados foram caracterizados quanto a sequência completa do gene rRNA 16S para confirmação de similaridade com sequências presentes nos bancos de dados *genbank* (NCBI). As sequências obtidas a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA, estão dispostas na Tabela 3.

Dentre as sequências analisadas, quatro apresentaram alta similaridades com sequências de bactérias diazotróficas. A estirpe NFB 1003 obteve sequência similar a *Bacillus subtilis* com identidade de 99% e cobertura de 55%, e portanto, provavelmente este isolado apresenta alta similaridade com essa bactéria.

Ao avaliar o efeito da co-inoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* em feijão caupi e em leucena, em referência a nodulação, a fixação de N₂ e o crescimento das plantas, Araújo et al. (2009), relataram acréscimos no acúmulo de nitrogênio no feijão caupi fornecido pelo N da fertilização mineral (tratamento com NPK) e pela fixação biológica do N₂ (inoculação). Observa-se que *Bacillus subtilis* (associativo de vida livre) pode ter influenciado positivamente na fixação de N₂ pelo *Bradyrhizobium*, promovendo aumento no crescimento das plantas e no acúmulo de N no feijão-caupi. Resultados similares foram constatados por Araújo et al. (1999), que verificaram a viabilidade da co-infecção de sementes de soja com *Bradyrhizobium* e *Bacillus subtilis*, utilizando duas estirpes de *Bacillus* (AP-3 e PRBS-1). De forma similar, os autores constataram que o tratamento de co-inoculação de *Bradyrhizobium* com os metabólitos formulados de *Bacillus* incrementou o teor de N de forma positiva e significativa.

Em relação ao material não inoculado estes autores verificaram que no conteúdo de N, houve um aumento de N em torno de 17% nos grãos de soja, e os resultados obtidos demonstram o potencial da co-inoculação, em sementes de soja, com células de *Bacillus subtilis*, o que pode incrementar o processo de fixação biológica do nitrogênio.

Ao realizar o sequenciamento do genoma de *Bacillus subtilis* UD1022 Bishno et al. (2015) relataram que essa bactéria poder ser *rhizobacteria*, com potencial para promover o crescimento de plantas e atuar como agente de biocontrole, inclusive promovendo proteção contra doenças de plantas nos sistemas agrícolas.

O resultado do sequenciamento completo do gene 16S rRNA (Tabela 3) confirmaram que a estirpe NFB4 obteve 99% de similaridade com a *Mesorhizobium plurifarium* e que NFB 1001 teve similaridade de 99% com

Beijerinckia indica subsp. *indica*. A estirpe NFB 6 obteve similaridade com a sequência de gene do isolado *Paenibacillus castaneae*, com 96% de identidade. Valverde et al. (2008) isolaram *Paenibacillus castaneae* sp. nov da filosfera de *Castanea sativa* Miller, baseada em análises filogenética no sequenciamento do gene rRNA 16S, e relataram que este microrganismo deve pertencer ao subgrupo da *Paenibacillus xinjiangensis* e *Paenibacillus glycanilyticus*, com similaridade de 96,3% e 96,8%, respectivamente. Da mesma forma foi observado comportamento similar da estirpe no presente estudo, em relação ao nível de similaridade. Resultados similares foram verificados por Costa et al. (2013), que relataram 99% de similaridade de três estirpes nodulíferas de *feijão caupi* (UFPI BR B3-7; UFPI BR B4-3; UFPI BR B7-6), tendo considerado que devem pertencer ao gênero *Paenibacillus*, ao compará-las com as sequencias presentes nos bancos de dados.

Essa bactéria é gram-variável e sua locomoção é realizada por flagelos polar e subpolar, tendo forma elipsoidal subterminal e seus esporos são formados em esporângios. Cresce a pH 5,7, mais o pH ótimo é 7, com temperatura de crescimento ótima de 30 °C, condições ambientais semelhantes a observada na presente pesquisa.(referencia)

Beijerinckia indica subsp. é uma estirpe do genero *Beijerinckia*, um membro da ordem de *Rhizobiales* de *Alfaproteobacteria*. *Beijerinckia* spp. são comumente encontrados como bactérias de vida livre em solos ácidos e também em rizosfera de plantas e ambientes de filosferas (KENNEDY, et al. 2005). Estas bactérias podem ser utilizadas para promover crescimento de plantas, e apresenta potencial para uso em biotecnologia por ser capaz de produzir exo heteropolissacarídeo (SCAMPARINI et al.1997). A estirpe NFB1001 obteve similaridade de 99% com *Beijerinckia indica*, nas sequencias depositadas no banco de dados, e cobertura de 73%. Tama et al. (2010) encontraram menor similaridade dessa bactéria com sequencias de genes depositadas no “*GenBank*” do que o presente estudo, (57% identidade de *Beijerinckia indica* subsp com sequencias de genes da *Methylocella Silvestris*), ao analisar a sequece completa do genoma de *Beijerinckia indica* subsp. *indica*.

Tabela 3. Identidade e cobertura das sequências de 16S rRNA comparadas com outras sequências depositadas no *GenBank* (NCBI).

Estirpes	Origem	Descrição	Sequências mais similares no banco de dados	Cobertura (%)	Identidade (%)	E-value	Score
rRNA 16S							
NFB 1003	Solo	CP 011534.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain UD1022, complete genome	55	99	0.0	27042
NFB 4	Solo	AJ 295079.1	<i>Mesorhizobium plurifarum</i> 16S rRNA gene, strain ORS1096 (LMG 15298) complete genome	92	99	0.0	2553
NFB 6	Solo	NR 044403.1	<i>Paenibacillus castaneae</i> strain Ch-32 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	96	96	0.0	2468
NFB 1001	Solo	CP 001016.1	<i>Beijerinckia indica</i> subsp. <i>indica</i> ATCC 9039, complete genome	73	99	0.0	7714

O sequenciamento do gene *nif* poderia dar melhores informações sobre as bactérias, uma vez que, este gene pode confirmar 100% o caráter desses isolados. Entretanto, existem algumas limitações com relação ao uso do gene *nif* para análise filogenética, dependendo do grupo de micro-organismos que se quer acessar (GABY; BUCKLEY, 2012). Os genes *nif*, codificam a formação da proteína FeMo, componente da enzima nitrogenase, responsável pelo processo de fixação de nitrogênio (ROSADO et al, 1999).

Resultados para proporção 3:2:1.

Estão dispostos na Tabela 4 os resultados das análises de todos os parâmetros analisados dos materiais utilizadas para compor os tratamentos com diferentes proporções.

Tabela 4. Valores médios dos parâmetros avaliados nos materiais utilizados para compor as proporções (2:3:1 e 3:2:1), de torta de filtro, húmus de minhoca, e biofertilizante de rochas.

Materiais utilizados	Parâmetros analisados				
	pH	N	C	P disponível	K disponível
	(H ₂ O)	(g kg ⁻¹)	(g kg ⁻¹)g kg ⁻¹	
Biofertilizante (BPK)	3,5b	-	-	14,84a	4,77a
Húmus de Minhoca (HM)	7,8a	8,6a	110a	2,25b	0,32b
Torta de Filtro (TF)	7,9a	10,0a	216a	1,53b	0,21b
C.V (%)	2,14	15,4	15,1	14,2	16,7

Médias com letras diferentes na vertical não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. pH; N total; C total; P disponível; K disponível.

Para o pH houve interação significativa entre os fatores analisados, porém, com comportamento quadrático para os isolados, NFB1001, NFB 2 e NFB 6, (Figura 1). Os isolados NFB 6 e NFB 2, no período de incubação de 20 dias, favoreceram o incremento de pH, com resultados semelhantes, com médias de 7,82 e 7,81 respectivamente. Felix et al. (2014), na cultura da alface, verificou o efeito de diferentes tratamentos de fertilização (Biofertilizante, Bioprotetor, e fertilizante comercial) no pH do solo, em dois ciclos consecutivos.

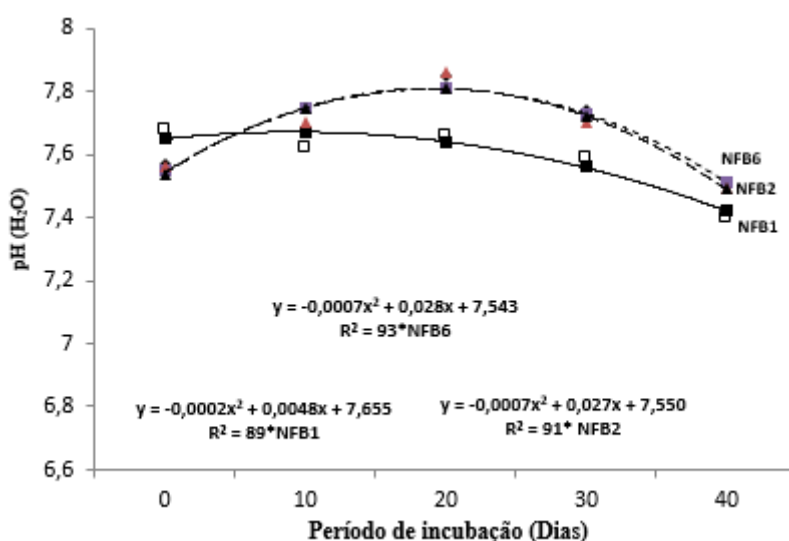


Figura 1. pH do biofertilizantes misto inoculado com diferentes bactérias diazotróficas de vida livre, e avaliado em diferentes períodos de incubação. ▲- NBF 6= bactérias diazotróficas de vida livre S6; ▲-NBF 2= bactérias diazotróficas de vida livre S2; ■-NBF 1= bactérias diazotróficas de vida livre 1001.

No teor de N total (Figura 2a) verificou-se interação significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes isolados avaliados e o período de incubação (dias). O isolado NFB 1003 influenciou positivamente o N total, com comportamento quadrático e promovendo incremento de $17,45 \text{ g kg}^{-1}$ de N no período de 30 dias. Os isolados NFB 2 e NFB 4 mostraram resultados semelhantes ao NFB 1003, porém, com teores inferiores de N total. Provavelmente o isolado NFB 1003 apresentou maior potencial para incrementar N total através da fixação biológica de N, visto que os diferentes materiais orgânicos que compõem o substrato, quando inoculados com bactérias de vida livre, podem afetar o potencial desses micro-organismos em fixar N.

Outros fatores que contribuem na fixação do N são: a forma de inoculação, o tempo de incubação, as condições ambientais, e a relação carbono nitrogênio (C/N) da matéria orgânica. O resultado dessa pesquisa difere do encontrado por Lima et al. (2010), que ao analisar o efeito de diferentes isolados de vida livre na inoculação de biofertilizante misto e húmus de minhoca, encontraram incremento de N de 107% em aproximadamente 34 dias de incubação, para a NFB1001.

Em relação ao teor de P (g kg^{-1}) foi observado que houve interação entre os isolados avaliados e o período de incubação, mostrando efeito quadrático decrescente em relação a este parâmetro, com médias de 2,45, 2,22 e 1,77 g kg^{-1} para os isolados NFB 4, NFB 2 e NFB 1001, respectivamente (Figura 2b), no período de incubação de 30 dias. Este resultado identifica uma diminuição no teor de P com o aumento do período de incubação. Por outro lado, o acúmulo de P neste período mesmo tendo sido decrescente foi superior ao encontrado por Felix et al. (2014), que constatou acúmulo de 1,27 g kg^{-1} de P em solos fertilizados com biofertilizantes misto e inoculados com bactérias diazotróficas de vida livre.

Provavelmente este decréscimo no teor de P pode estar relacionado a forma como P se encontra no substrato, ou associado com outros elementos, formando produtos de baixa disponibilidade com o passar do tempo, ou com as condições ambientais. Também pode estar relacionado com a presença de micro-organismos capazes de solubilizar os minerais como a bactéria *Acidithiobacillus*, ou fungos nativos solubilizadores de fosfatos como *Aspergillus* e *Penicillium* (SOUCHIE et al. 2007). Além desses aspectos, a presença de micro-organismos decompositores (bactérias e fungos) provavelmente podem influenciar o teor de P no substrato, tendo em vista que podem promover imobilização do N (P), que posteriormente poderá ser remineralizado, com efeito residual.

O decréscimo de P também pode estar relacionado com a presença de maior conteúdo de Ca em fosfatos naturais e na torta filtro, pois nessas condições e em pH alcalino o P se liga ao Ca formando composto de baixa solubilidade no substrato.

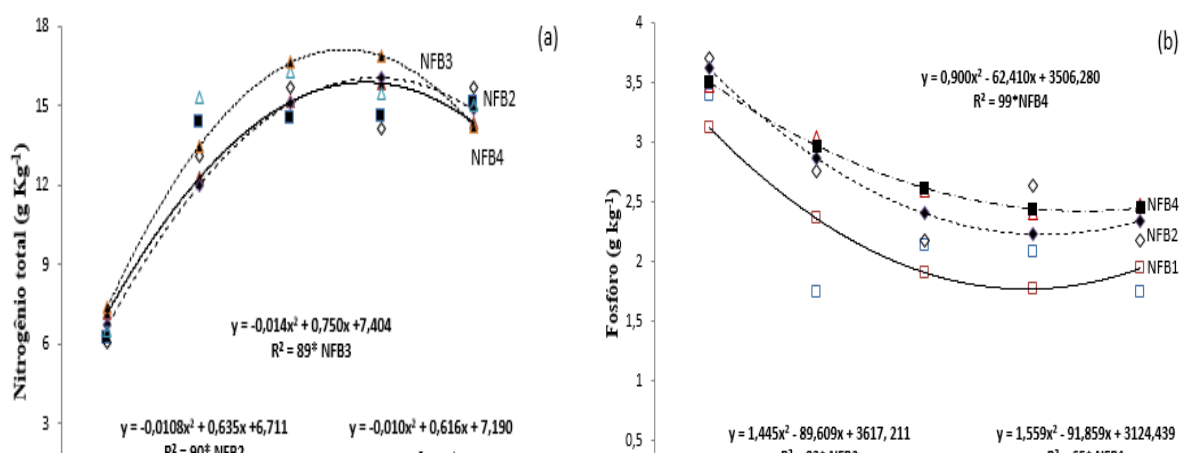


Figura 2. Teor de nitrogênio-N g kg⁻¹ (a) e fosforo-P g kg⁻¹ (b) adicionados ao biofertilizantes misto inoculado com diferentes bactérias diazotróficas de vida livre, e avaliado em diferentes períodos de incubação. Δ -NFB3= bactérias diazotróficas de vida livre 1003; \diamond -NFB2= bactérias diazotróficas de vida livre S2; \blacksquare -NFB4= bactérias diazotróficas de vida livre S4; \square -NBF1= bactérias diazotróficas de vida livre 1001.

Resultados mostrando eficiência no incremento de P em substratos orgânicos foram relatados por Oliveira et al. (2015), avaliando o uso de biofertilizantes em mistura com torta de filtro de usina na proporção 3:1 (MO: BPK), inoculados com bactérias diazotróficas de vida livre (NFB 1001). Estes autores verificaram que o ganho de P na planta e no solo foram superiores quando se aplicou o biofertilizante misto em comparação com o fertilizante comercial. Resultado similar foi verificado por Santana et al. (2014), verificando aumento no teor de P no solo com aplicação de biofertilizante misto, e este incremento variou proporcionalmente com as doses aplicadas.

Para o nutriente K foi verificado que houve interação significativa ($p < 0,05$) entre os isolados NFB 1003 e NFB 1001 e o período de incubação (Figura 3). O isolado NFB 1003 aumentou o teor de K no substrato, em relação ao isolado NFB 1001, com comportamento linear crescente, especialmente no período de incubação de 40 dias. Níveis satisfatórios de K em solos e na cultura da cana foram verificados com adição de torta de filtro, e biofertilizante misto na dose de 150% da recomendação, em comparação com o fertilizante comercial (OLIVEIRA et al. 2015).

Resultados em relação ao incremento de K pela adição de biofertilizantes mistos inoculados com bactérias diazotróficas de vida livre em diferentes culturas, solos, e materiais orgânicos tem sido verificado na literatura (OLIVEIRA et al. 2015; FELIX et al. 2014; OLIVEIRA et al. 2015; STAMFORD et al. 2011; 2008; 2006; LIMA et al. 2007; ALMEIDA JÚNIOR et al. 2011).

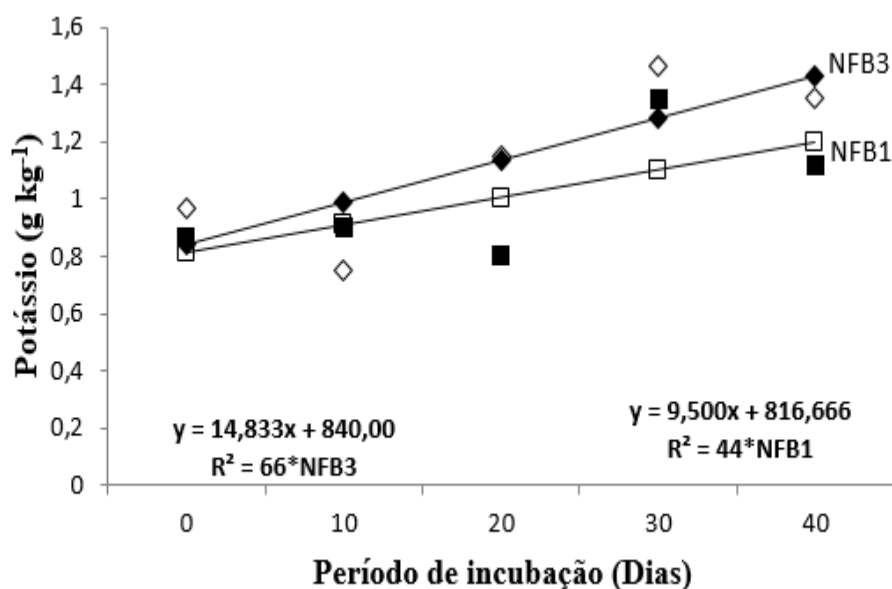


Figura 3. Teor de potássio-K g kg⁻¹ adicionados ao biofertilizantes misto inoculado com diferentes bactérias diazotróficas de vida livre, e avaliado em diferentes períodos de incubação. ◆-NFB 3= bactérias diazotróficas de vida livre 1003; □- NFB 1= bactérias diazotróficas de vida livre 1001.

Para o C não houve interação significativa ($p > 0,05$) entre os fatores analisados, ocorrendo apenas efeito individual dos isolados (Figura 4). O isolado NFB 1003 promoveu maior teor de carbono (média de 167,8 g kg⁻¹), em comparação com os demais isolados. Provavelmente, a inoculação com a bactéria NFB 1003 aumentou o teor de N, com aumento da imobilização, contribuído dessa maneira para redução de C no material. Entretanto, a maior proporção de torta filtro no composto pode ter contribuído para o incremento de C, pois, de acordo com Kaur et al. (2005), a utilização de torta de filtro em combinação com biofertilizantes têm resultado em aumento nos níveis de nitrogênio, fósforo, potássio e carbono orgânico do solo. Elsayed et al. (2008), também encontraram efeito positivo da torta de filtro no aumento do carbono orgânico, matéria orgânica, fósforo disponível e nitrogênio total do solo.

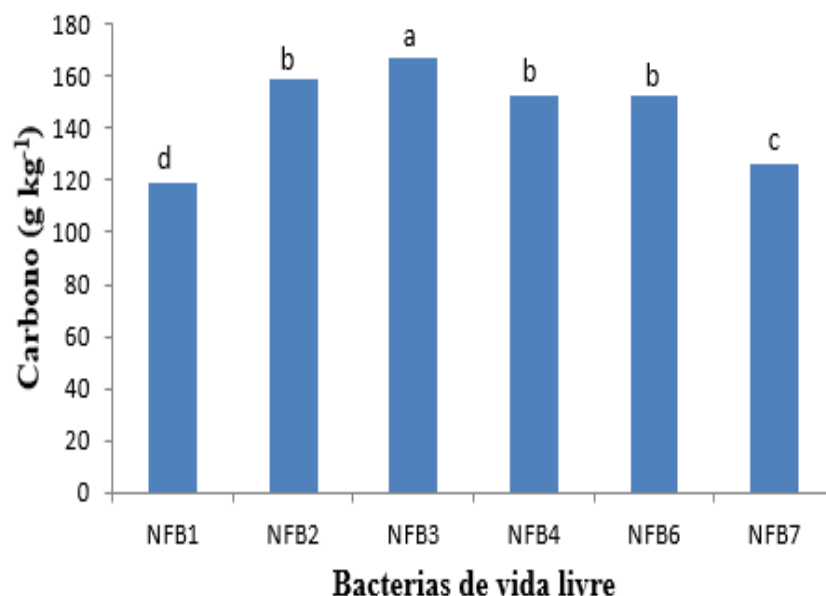


Figura 4. Teor de carbono no biofertilizantes misto em função da inoculação de diferentes bactérias diazotróficas de vida livre. NFB1-estirpe 1001; NFB2- estirpe do solo 2; NFB3- estirpe 1003; NFB4- estirpe do solo 4; NFB6- estirpe do solo 6; NFB7- estirpe do solo 7.

Resultados para proporção 2:3:1.

O pH do meio de cultivo é uma medida de grande relevância quando trata-se da disponibilidade de nutrientes, pois refere-se a reação de alcalinidade ou de acidez do meio, neste sentido, uma reação é enfatizada como ácida quando o teor de H^+ excede o de OH^+ , sendo básica quando ocorre ao contrário. Assim, o efeito desse parâmetro pode decrescer ou aumentar a disponibilidade de nutrientes no biofertilizante misto. Pode haver interação significativa entre os fatores analisados, isolados e período de incubação (dias), com efeito linear decrescente para todos os isolados. Por outro lado, o pH mesmo tendo decrescido ainda pode permanecer na faixa adequada e disponibilizar alguns nutrientes.

Como os biofertilizantes de rochas fosfatadas e potássicas produzidos com enxofre elementar e *Acidithiobacillus* apresentam pH que varia de 3,0 a 3,5, (STAMFORD et al. 2004), quando em mistura com materiais orgânicos tende a apresentar aumento no pH, dependendo do material orgânico. A adição de diferentes materiais orgânicos como húmus de minhoca (pH=8,0), torta de filtro (pH=7,6) favorece o produto apresentar valor de pH mais adequado para o desenvolvimento das plantas. Outro fator a ser considerado, é o período de

incubação, e neste sentido verificou-se que com maior tempo provavelmente ocorreu decomposição do substrato favorecendo maior disponibilidade de nutrientes e redução do pH, tendo em vista que com a decomposição da matéria orgânica ocorre aumento da acidez com redução no valor de pH.

Na literatura são apresentados resultados que mostram baixos rendimentos de algumas culturas, quando cultivadas em solos que receberam doses elevadas de biofertilizantes de rochas sem adição de materiais orgânicos (STAMFORD 2003; 2004; 2006; 2009; MOURA et al. 2007). Por outro lado, quando se aplicou diferentes doses de biofertilizante misto em solos cultivado com alface em Argissolo do Cariri cearense, não se observou redução do pH com as doses aplicadas, ou também que a variação do pH tenha comprometido o desenvolvimento das plantas (LIMA et al. 2007).

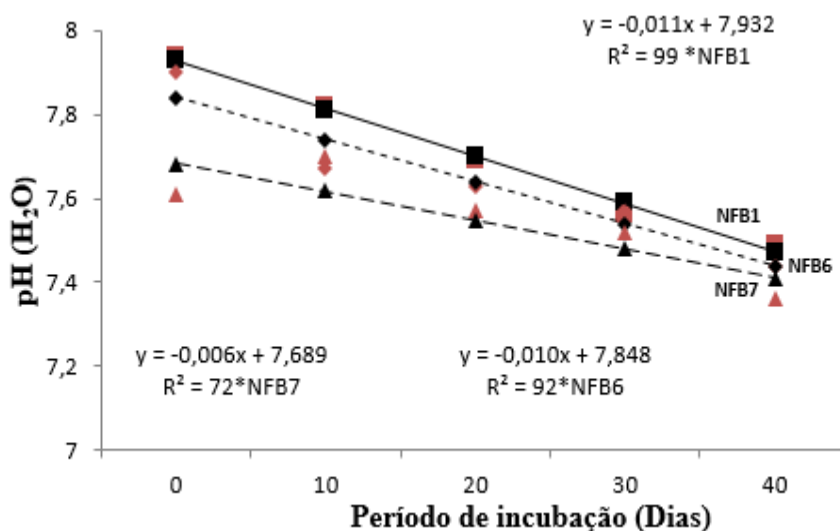


Figura 5. pH do biofertilizantes misto inoculado com diferentes bactérias diazotróficas de vida livre, e avaliado em diferentes períodos de incubação. ◆-NFB6= bactérias diazotróficas de vida livre S6; ▲-NFB7= bactérias diazotróficas de vida livre S7; ■-NFB1= bactérias diazotróficas de vida livre 1001.

A inoculação no biofertilizante misto com bactérias diazotróficas de vida livre incrementou o teor de N, obtendo-se interação significativa entre esses isolados nos períodos de incubação avaliados (Figura 6). O NFB4 apresentou comportamento quadrático crescente com teor de 16 g kg⁻³ de N no período de incubação de 25 dias. Comportamento quadrático crescente também foi verificado para os isolados NFB 1003 e NFB 6, porém, esses apresentaram médias

inferiores ao NFB 4. Observa-se um comportamento crescente para o acúmulo de N no período de incubação de 0 a 25 dias para todos os isolados. Este fato é justificado pela presença de bactérias diazotróficas de vida livre inoculadas no biofertilizante misto, tendo em vista que, durante este período de incubação provavelmente ocorreria maior imobilização de N total. É conhecido que, a adição de materiais orgânicos aumenta a atividade microbiana no meio e a incorporação de nutrientes na biomassa microbiana, pode promover imobilização.

Felix, (2012) observaram imobilização de N durante o período de incubação de 30 dias, ao quantificar o teor de N em diferentes proporções de biofertilizante misto inoculado com bactérias diazotróficas de vida livre. Foi observado que após 30 dias de incubação houve menor imobilização de N, devido à diminuição da atividade microbiana.

As bactérias diazotróficas de vida livre tem relevada importância nos sistemas agrícolas de produção, pois, têm sido demonstrados, por meio da inoculação de vários materiais orgânicos, resultados que conferem razoáveis taxas de fixação de nitrogênio.

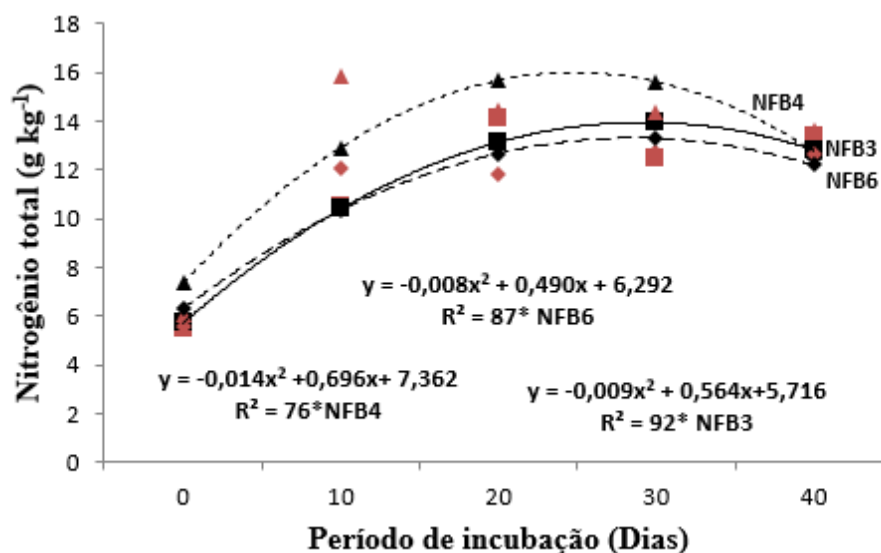


Figura 6. Teor de nitrogênio-N g kg⁻³ (a) adicionados ao biofertilizantes misto inoculado com diferentes bactérias diazotróficas de vida livre, e avaliado em diferentes períodos de incubação. ■-NFB 3= bactérias diazotróficas de vida livre 2003; ◆-NBF 6=bactérias diazotróficas de vida livre S6; ▲-NFB 4= bactérias diazotróficas de vida livre S4;

Para P disponível não se observou interação ($p > 0,05$) entre os isolados e os períodos de incubação, ocorrendo apenas efeito individual desses isolados em relação ao teor de P no biofertilizante misto (Figura 7a). Entre os isolados avaliados o NFB 1003 se destacou apresentando maior teor de P disponível ($3,0 \text{ g kg}^{-1}$) em relação aos demais isolados. Resultados similares foram verificados para o K, porém, com todos os isolados foram obtidos teores de K semelhantes, exceto para NFB 7, que apresentou a menor média (Figura 7b). Adição de P e K ao substrato está relacionada com a liberação do nutriente no biofertilizante misto e com a capacidade dos micro-organismos presentes em mineralizar e fixar estes nutrientes no substrato, e também com as condições ambientais. Além disso, as características dos materiais utilizados para compor substrato, (composição química, características físicas) podem afetar a disponibilidade desses nutrientes.

Os fosfatos naturais reativos, e possivelmente os biofertilizantes de rochas, reagem lentamente no solo para liberação de nutrientes, (CORRÊA et al. 2008), podendo fornecer efeito residual, o que pode ser favorável e até possibilitar resposta similar aos fertilizantes industriais (BUMB & HAMMOND, 2006), tendo em vista que estes apresentam perdas acentuadas através de processos fixação, adsorção, envelhecimento no solo ou precipitação com outros elementos (ferro ou alumínio) formando compostos de baixa disponibilidade.

Resultados satisfatórios para o P e K presentes em substratos são relatados na literatura. Lima et al. (2007), verificaram incremento no teor de P e K no solo, quando feita a adição de biofertilizantes misto em diferentes doses.

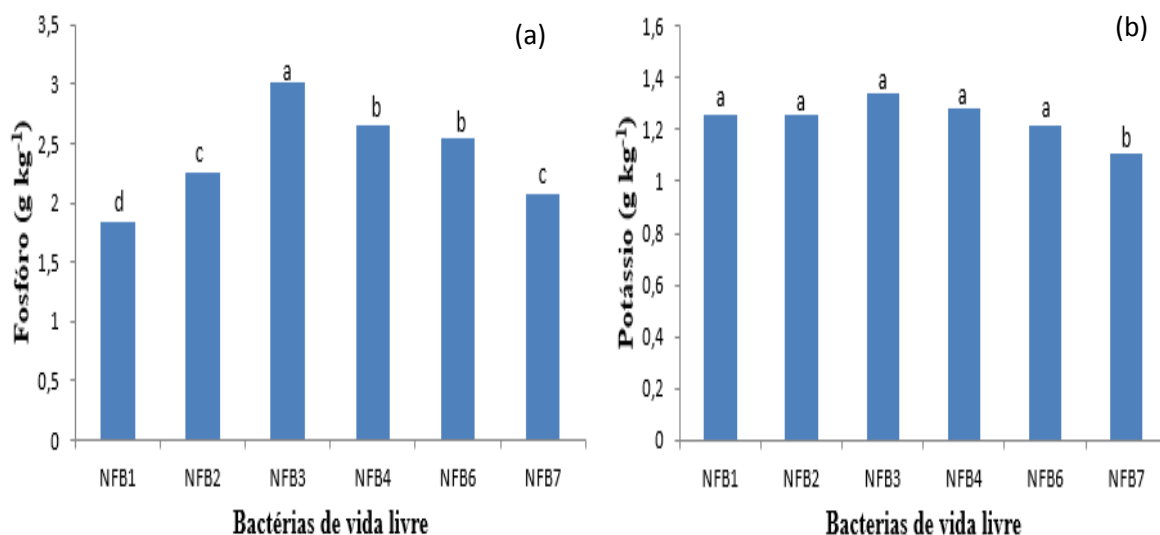


Figura 7. Teor de fósforo g kg^{-1} e potássio-K g kg^{-1} adicionados ao biofertilizante misto inoculado com diferentes bactérias diazotróficas de vida livre. NFB1-estirpe 1001; NFB2- estirpe do solo 2; NFB3- estirpe 1003; NFB4- estirpe do solo 4; NFB6- estirpe do solo 6; NFB7- estirpe do solo 7.

O biofertilizante misto inoculado com bactérias de vida livre mostrou efeito no teor de C no produto, porém, não houve interação significativa entre os parâmetros avaliados, ocorrendo efeito individual dos isolados. O isolado NFB 4 foi o que promoveu maior incremento no teor de C, com média de $144,9 \text{ g kg}^{-1}$. O isolado NFB 1003 e o NFB 6, apresentaram média similar ($122,9 \text{ g kg}^{-1}$), e foram superiores aos demais isolados utilizados. Este resultado difere do encontrado por Andrade (2007), que constatou interação significativa entre os parâmetros analisados e incremento no teor de carbono ($0,97$ e $1,19 \text{ g kg}^{-1}$), ao aplicar diferentes doses de biofertilizante misto no solo.

Na Figura 8 observa-se que, mesmo na ausência de interação significativa em relação ao C analisado, houve um acréscimo de C orgânico ao material, justificado pela presença de diferentes proporções de torta de filtro e húmus de minhoca, que são ricos em matéria orgânica e apresentam um pH adequado para disponibilidade de nutrientes, além da inoculação com bactérias diazotróficas de vida livre que contribuem para o acréscimo de nutrientes no biofertilizante misto. O aumento de C no biofertilizante misto é de grande importância, pois além de melhorar as características físicas e químicas do meio, atua como condicionador

do solo regulando a temperatura e a umidade do mesmo (SÁNCHEZ-SÁNCHEZ et al. 2007).

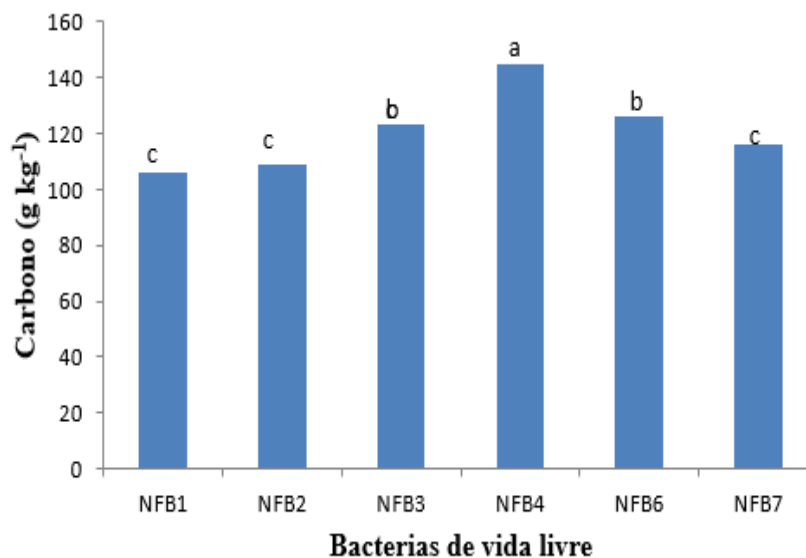


Figura 8. Teor de carbono no biofertilizante misto em função da inoculação com diferentes bactérias diazotróficas de vida livre. NFB1-estirpe 1001; NFB2- estirpe do solo 2; NFB3- estirpe 1003; NFB4- estirpe do solo 4; NFB6- estirpe do solo 6; NFB7- estirpe do solo 7.

Todos os isolados utilizados na inoculação dos substratos contribuíram de forma positiva para aumentar a disponibilidade de nutrientes ao substrato, melhorando suas características químicas, físicas e biológicas, confirmando o potencial do biofertilizante misto como produto alternativo para uso na agricultura.

CONCLUSÃO

Pelo sequenciamento completo as estirpes diazotróficas utilizadas foram identificadas como *Bacillus subtilis*, *Mesorhizobium plurifarum*, *Paenibacillus castaneae* e *Beijerinckia indica*.

A inoculação com as bactérias diazotróficas de vida livre incrementou o teor de N no biofertilizante misto.

As bactérias diazotróficas de vida livre *Bacillus subtilis* e *Mesorhizobium plurifarum*, de uma maneira geral, apresentaram os melhores resultados para o acréscimo de N, K, C, P no biofertilizante misto, no período de 25 a 30 dias.

O biofertilizante misto mostrou potencial para uso na agricultura orgânica como substrato em substituição aos fertilizantes solúveis convencionais.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos recursos dispendidos para a realização dos trabalhos e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA JÚNIOR, A. B. de; NASCIMENTO, C. W. A. do; SOBRAL, M. F.; SILVA, F. B. V. da ; GOMES, W. A. Fertilidade do solo e absorção de nutrientes em cana-de-açúcar fertilizada com torta de filtro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.15, n.10, p.1004–1013, 2011.

ANDRADE, I. P. **Biofertilizantes de rochas fosfatadas e potássicas com enxofre inoculado com *Acidithiobacillus* na adubação da uva (*Vitis vinífera* L) em Planossolo do vale do São Francisco**. Doctoral Thesis, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 97 p, 2007.

ANDRADE, M. M. M. ; STAMFORD, N. P. ; SOUZA, C. A. ; SILVEIRA, A. C. G. A.; FREITAS, A. D. S. ; SANTOS, C.E. R. S. ; STAMFORD, N. P. Fertilização mineral e biofertilizante de rochas com *Bradyrhizobium* e fungos micorrízicos arbusculares em caupi. **Agrária** (Recife. Online), v.4, p.289-292, 2009.

ARAÚJO, A. S. F.; CARNEIRO, R. F. V.; BEZERRA, A. A. C.; ARAÚJO, F. F. Coinoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* em feijão-caupi e leucena: efeito sobre a nodulação, a fixação de N₂ e o crescimento das plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, online, 2009.

ARAÚJO, F.F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* *Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1633-1643, 1999.

BISHNOI, U.; POLSON, S.W.; SHERRIER, D.J.; BAIS, H.P. Draft Genome Sequence of a Natural Root Isolate, *Bacillus subtilis* UD1022, a Potential Plant Growth-Promoting Biocontrol Agent. **Journal ASM.org genome**, v.3, n.4. p. 2015.

BODDEY, R.M.; DÖBEREINER, J. **The acetylene reduction technique**. Rio de Janeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Intensive Course on Biological Nitrogen Fixation. 1982.

BUMB, B. L.; HAMMOND, L. L. Fertilizers: Mineral. **Encyclopedia of soil Science**. 2th, v.1. n.1, p.816-825, 2006.

CORRÊA, R. M. et al. Disponibilidade e níveis críticos de fósforo em milho e solos fertilizados com fontes fosfatadas. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.3, p.218-224, 2008.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. V. M.; MOREIRA, F. M.S.; Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.9, p.1275-1284, 2013.

DOBEREINER J. Isolation and identification of root associated diazotrophs. In: SKINNER F. A, BODDEY R. M, FENDRIK I (eds) Nitrogen fixation with non-legumes. **Kluwer Academic**, Dordrecht, p.103-108, 1989.

DÖBEREINER, J., BALDANI, V.L.D., BALDANI, J.I. 1995. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília, EMBRAPASPI; Seropédica, EMBRAPA-CNPAB. 60 p.

ELSAYED, M.T.; BABIKER, M.H.; ABDELMALIK, M.E.; MUKHTAR, O.N.; MONTANGE, D. Impact of filter mud application on the germination of sugarcane and small seeded plants and on soil and sugarcane nitrogen contents. **Bioresource Technology**, v.99, p.181-186, 2008.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2° ed. Brasília, 2009. p. 627.

FELIX, F. F.; BERGER, L. R. R.; BORGES, T. K. S.; STAMFORD, N. P.; MALHEIROS, S. M. M.; OLIVEIRA, W. J.; OLIVEIRA, F. L. N. Nitrogênio em substrato orgânico mineral inoculado com bactérias diazotrófica de vida livre: <https://www.researchgate.net/publication/228462778>. Disponível em 28/2014.

GABY, J.C.; BUCKLEY, D.H. A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the *nifH* gene of nitrogenase. **Plos one**, v.7, n.7, p. 42-149, 2012.

KAUR, K.; KAPOOR, K.K; GUPTA, A.P. Impact of organic manures with and without mineral fertilizers on soil chemical and biological properties under tropical conditions. **Journal Plant Nutrition and Soil Science**, v.168, p. 117-122, 2005.

KENNEDY, C. Genus *Beijerinckia*, In D. J. BRENNER, N. R. KRIEG, J. R. STALEY (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, second edition, part C. Springer, **New York**, v. 2, p. 423-432, 2005.

LIMA, F. S.; STAMFORD, N. P. ; SOUSA, C. S. ; LIRA JÚNIOR, M. A.; MALHEIROS, S. M. M. ; VAN STRAATEN, P. Earthworm compound and rock biofertilizer enriched in Nitrogen by inoculation with free living diazotrophic bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.27, p.1-7, 2010.

LIMA, R. C. M.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S.; LIRA JÚNIOR, M. A.; DIAS, S. H. Eficiência e efeito residual de biofertilizantes de rochas com PK e enxofre com *Acidithiobacillus* em alface. **Horticultura Brasileira**. v.25, p.402-407, 2007.

MOURA, P. M.; STAMFORD, N. P.; DUENHAS, L. H.; SANTOS, C. E. R. S.; NUNES, G. H. de S. Eficiência de biofertilizantes de rochas com *Acidithiobacillus* em melão, no Vale do São Francisco. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias Recife**, v.2, n.1, p.1-7, 2007.

OLIVEIRA, F.L.N.; STAMFORD N. P.; NETO, D. S.; OLIVEIRA, E. C. A.; OLIVEIRA, W. S.; SANTOS, C. E, R, S. Effects of biofertilizers produced from rocks and organic matter, enriched by diazotrophic bacteria inoculation on

growth and yield of sugarcane. **Australian Journal of (Crop Science)**, v.9, n.6, p.504-508, 2015.

REIS, V.M.; OLIVEIRA, A.L.M.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I. (2006), Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M.S., ed. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciências do Solo. p.153-172.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; MENDONÇA-HAGLER, L.C. A moderna microbiologia do solo: **Aplicação de técnicas de biologia molecular**. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F.M.S; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FRUTINI-NETO, A.E.; CARVALHO, J.G. (Ed.). Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas. Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/DCS, p. 429-448, 1999.

RUDNIK, P., MELETZUS, D., GREEN, A., HE, L. KENNEDY, C. Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of proteobacteria. **Soil Biology Biochemistry**, v.29 p.831- 841, 1997.

SANTANA, R.S.; STAMFORD, N.P.; SILVA JUNIOR, S.; SANTOS C.E.R.S.; FREITAS A.D.S.; ARNAUD, T.M.S. Influence of Bioprotector with Microbial Inoculation on Green Pepper Yield and Improvement on Soil Nutrients Availability. **International Journal of Agriculture Innovations and Research**, v.2, n. 6, p.2319-1473, 2014.

SANTANA, R. S. de.; **Produção e eficiência de biofertilizante e de bioprotetor com quitosana no pimentão**. 2012. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2012.

SCAMPARINI, A.,D. MARIUZZO, H. FUJIHARA, R. JACOBUSI, C. VENDRUSCOLO. Structural studies of CV-70 polysaccharide. **Int. J. Biol. Macromol.** 21:115–121, 1997.

SILVA, M. O.; STAMFORD, N.P.; AMORIM, L.B. de; ALMEIDA JÚNIOR, A.B. de; SILVA, M. O. Diferentes fontes de P no desenvolvimento do meloeiro e disponibilidade de fósforo no solo. **Revista Ciências Agrônômicas**, v.42, n.2, p. 268-277, 2011.

SOUCHIE, E.L.; ABOUD, A.C.S. de.; Solubilização de fosfato por microorganismos rizosféricos de genótipos de Guandu cultivados em diferentes classes de solo. **Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 11-18, 2007.

STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. e S.; FELIX, F. F.; OLIVEIRA, F. L. N. de. Biofertilizers from Phosphate and Potash Rocks with *Acidithiobacillus* and Organic Matter Enriched by Free Living Diazotrophic Bacteria. In: ARAÚJO, A. S. F. de; FIGUEIREDO, M. do V. B. **Microbial Ecology of Tropical Soils**. Nova Science Publishers. p. 149-157, 2011.

STAMFORD N. P, MOURA P. M, LIRA JUNIOR M. A, SANTOS CERS, DUENHAS L. H, GAVA CAT. Chemical attributes of an Argisol of the Vale do São Francisco after melon growth with phosphate and potash rocks biofertilizers. **Braz J Horti**, v.27, p.447- 452, 2009.

STAMFORD, N. P.; IZQUIERDO, C. G.; FERNÁNDEZ, M. T. H.; MORENO, M. del C. M. Biofertilizante de rochas fosfatadas e potássicas com enxofre e *Acidithiobacillus*. In: FIGUEIREDO, M. do V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. de R. e S. **Micro-organismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, p. 401-421, 2008a.

STAMFORD NP; SANTOS PR; SANTOS CERS; FREITAS ADS; DIAS SHL LIRA JÚNIOR MA. Agronomic effectiveness of biofertilizers with phosphate rock, sulphur and *Acidithiobacillus* in a Brazilian tableland acidic soil grown with yam bean. **Bioresource Technology**, v.98 p.1311-1318, 2007a.

STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; BARROS NETO, B. de.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. de. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium, **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 01, p. 61-68, 2007b.

STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R.; FREITAS, A. D. S.; LIMA, R. Rock biofertilizer with *Acidithiobacillus* on sugarcane yield and nutrient uptake in a Brazilian soil. **Geomicrobiology jornal**. n. 23. n.5, p.261-265, 2006.

STAMFORD, N.P.; MOURA, A.M.M.F.; SANTOS, K.S.; SANTOS, P. R. Atuação de *Acidithiobacillus* na solubilização de fosfato natural em solo de tabuleiro cultivado com jacatupé (*Pachyrhizus erosus*). **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v.28, p.75-83, 2004.

STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R.; FREITAS, A. D. S.; MOURA, A. Effects of natural phosphate, sulfur and *Acidithiobacillus* in Brazilian acid soil grown with yam bean (*Pachyrhizus erosus*). **Scientia agrícola**. v.56. p. 54-61, 2003.

TAMAS, I.; DEDYSH, S. N.; LIESACK, W.; STOTT, M. B.; ALAM, M.; MURRELL, J. C.; DUNFIELD, P. F.; Complete Genome Sequence of *Beijerinckia indica* sub sp. indica. **Journal of Bacteriology**, v.192, n.17, p.4532-4533, 2010.

VALVERDE, A.; PEIX, A.; RIVAS, R.; VELA´ZQUEZ, E.; SALAZAR, S.; SANTA-REGINA, I.; BARRUECO, C. R.; IGUAL, J. M.; *Paenibacillus castaneae* sp. nov, isolated from the phyllosphere of *Castanea sativa* Miller. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p.2560-2564, 2008.

CAPÍTULO 3
OTIMIZAÇÃO DO BIOFERTILIZANTE MISTO ATRAVÉS DA INOCULAÇÃO
COM FUNGOS DA ORDEM MUCORALES

OTIMIZAÇÃO DO BIOFERTILIZANTE MISTO ATRAVÉS DA INOCULAÇÃO COM FUNGOS DA ORDEM MUCORALES

Resumo

O uso de substratos orgânicos com biofertilizantes de rochas (P e K) mais enxofre elementar inoculado com *Acidithiobacillus*, em mistura com materiais orgânicos incrementam a disponibilidade de nutrientes. O biofertilizante misto inoculado com fungos da Ordem Mucorales promovem resistência contra doenças de plantas, pela produção de quitosana. O objetivo do trabalho foi de avaliar o potencial do bioprotetor (biofertilizante de rochas inoculado com *C. elegans*, *M. hiemalis*, *R. arrhizus*) na disponibilidade de nutrientes (bandejas) e no controle do fungo *Fusarium solani* "in vitro". A proporção utilizada foi a selecionada no primeiro experimento com torta e húmus de minhoca (2:3), mais o BPK (2:3:1). Foi realizada a inoculação com 100 mL de massa micelial, com diluição em 400 mL, dos fungos *Cunninghamella elegans*, *Muco hiemalis*, *Rhizopus arrhizus*, crescidos em meio BDA. Usou-se o esquema fatorial (3x3) +1, com 3 fungos, com 3 concentrações, mais o tratamento controle com a mesma proporção mas sem inoculação, com 4 repetições. Foram realizadas amostragens nos tempos 0; 15, e 30 dias. Nas amostras foram determinados: pH; N total; P e K disponível). Posteriormente foram retiradas amostras do bioprotetor para avaliar o potencial "in vitro" contra o fungo *Fusarium solani*, usando o fatorial 3x3, com bioprotetor inoculado com *C. elegans*; com *M. hiemalis* e com *R. arrhizus*), em 3 doses de cada bioprotetor, mais o controle, com 4 repetições. O crescimento do fungo *Fusarium solani* foi feito pelo crescimento radial. Os melhores valores de pH foram com os tratamentos com *R. arrhizus* e com *C. elegans*. Para P disponível foi verificado que *C. elegans* promoveu maior aumento desse em todos os tempos, exceto para o período inicial (0 dias). Com relação ao K disponível não houve diferença entre os tratamentos, inclusive o controle. Para N total não

houve diferença significativa entre os tratamentos, e todos foram superiores ao controle. Os diferentes bioprotetores apresentaram potencial para inibição do crescimento do *Fusarium solani*, e não houve diferença entre as doses de aplicadas em relação ao crescimento radial do fungo patogênico.

Palavras-chaves: *Fusarium solani*; Bioprotetor; *Cunninghamella elegans*; Doenças fitopatogênicos;

OPTIMIZATION OF MIXED BIOFERTILIZER BY INOCULATION WITH MUCORALES FUNGI

Abstract

The mixed biofertilizer produced from phosphate and potassic rocks plus elemental sulfur inoculated with *Acidithiobacillus*, mixed with organic matters increment nutrients availability. The mixed biofertilizer inoculated with fungi Mucorales may promote resistance against plant diseases, by effect of chitosan. The study aim to evaluate the effects of the bioprotector produced with different Mucorales fungi (*C. elegans*, *M. hiemalis*, *R. arrhizus*) on nutrient availability (in trays) and in the control of *Fusarium solani* “*in vitro*”. The best proportion obtained in the first experiment using Sugarcane Mud cake and Earthworm Compost (2:3) was used with BPK (2:3:1). The inoculation was processed with 100 mL of the mycelia mass of the used fungi diluted in 400 mL. The experiment used the factorial scheme (3x3) +1, with 3 fungi producing the different bioprotector, in 3 concentrations, and the control treatment (biofertilizer without inoculation with Mucorales fungi), in 4 replicates. Samples were collected in times 0; 15, and 30 days, and determined: pH; Total N; available P and K). More after, were collected samples of the bioprotector to evaluate the potential against *Fusarium solani* fungi “*in vitro*” assays. The treatments were tested in a factorial (3x3), using the bioprotetor inoculated with *C. elegans*; *M. hiemalis* and *R. arrhizus*), applying the bioprotetor in 3 rates, and the control treatment without Mucorales fungi, with 4 replicates. The fungi growth of *Fusarium solani* pathogenic fungi was evaluated by the radial diameter. The best values of pH were observed with the Mucorales fungi *R. arrhizus* and *C. elegans*. Available P increased when used the bioprotetor with *C. elegans*, in all the used incubation times, except to the initial time (T0). Available K does not shows significant effect of the treatments, inclusive in relation with the control treatment without Mucorales fungi. N total does not show significant difference

to the Mucorales fungi and they are superior to the control treatments without inoculation with Mucorales fungi (biofertilizer). The different bioprotector showed potential to inhibit the growth of *Fusarium solani* and it was not observed significant difference between the applied rates in relation to the radial growth of the pathogenic fungi.

Keywords: *Cunninghamella elegans*; *Fusarium solani*; bioprotector; phytopathogenic diseases.

INTRODUÇÃO

Com o avanço da agricultura novas tecnologias foram introduzidas nos sistemas de produção, favorecendo o incremento de nutrientes para as plantas. Materiais como lodo de esgoto (NÓBREGA et al.2007; CALDEIRA et al.2013), resíduos industriais, palha de arroz, composto orgânico (SOUSA et al.2015) e casca de arroz carbonizada (SAIDELLES et al.2009; STEFFEN et al.2010) são normalmente utilizados na agricultura orgânica como alternativa para substituir a fertilização comercial. Uma alternativa viável e econômica pode ser a produção de biofertilizantes com rochas fosfatadas e potássicas (RP e RK) em mistura com materiais orgânicos (OLIVEIRA et al.2014; OLIVEIRA et al.2015).

Outro aspecto a ser considerado para a produtividade e qualidade da produção agrícola é o que diz respeito aos processos de resistência das plantas a doenças, em especial as promovidas por fungos radiculares, usando produtos que não provocam danos ao ambiente. O biopolímero quitosana pode ser utilizado para esta finalidade devido a sua capacidade antifúngica e antibacteriana, induzindo enzimas de defesa nas plantas (STAMFORD et al.2008), que também pode atuar na liberação de polifosfato inorgânico (FRANCO et al. 2005) e de outros minerais como potássio.

Dentre as diversas classes de fungos que produzem esse biopolímero podem-se destacar os da ordem Mucorales que podem apresentar outras funções, as quais são de grande importância na área da agricultura. Geralmente esses fungos pertencem a Classe Zygomycetes, como é o caso do *Cunninghamella elegans* que apresentam quitina e quitosana em sua parede celular (CAMPOS-TAKAKI, 2005). A massa micelial do *C. elegans*, vem sendo

utilizada para estabelecer métodos de otimização para processos de obtenção de quitosana.

A quitosana possui propriedades específicas que mostram grande potencial para inúmeras aplicações em vários produtos comerciais, especialmente devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e reatividade do grupo amínico (FAI et al. 2008). Tais propriedades possibilitam que a quitosana seja utilizada em várias aplicações, como ação antimicrobiana (FENG & XIA 2011). Neste sentido a extração de biopolímeros a partir da parede celular de fungos torna-se vantajosa por apresentar quitina e quitosana, que poderá ser produzida em larga escala e não depende de fatores sazonais (FAI et al.2008).

O uso da massa micelial dessa classe de fungos para produzir biofertilizante misto funciona como uma técnica promissora para incrementar os mecanismos de defesa das plantas e, assim, aumentar sua resistência contra doenças. O Biofertilizante de rochas inoculado com estes fungos torna-se o bioprotetor, pois apresenta em sua composição quitina e quitosana produzida por estes micro-organismos, o que justifica seu uso na agricultura como substrato fertilizante e bioprotetor. Algumas hipóteses sugerem que a quitosana pode alterar a permeabilidade da membrana plasmática e provocar estresse oxidativo em fungos patogênicos (DI PIERO E GARDA, 2008).

De acordo com Felix, (2011), houve inibição do fungo fitopatogênicos *Pythium*, a partir da dose 0,50 mg mL⁻¹ de quitosana, que paralisou o crescimento micelial na dose de 2,0 mg mL⁻¹. Para fungo *Botrytis cinerea* causadora da “podridão cinzenta” na uva a dose de quitosana recomendada foi de 1,9 a 3,8 mg mL⁻¹, com efeito antifúngico (SILVA JUNIOR, 2012).

O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial do bioprotetor com biofertilizante de rochas em mistura com enxofre inoculado com *C. elegans*, *M. hiemalis*, *R. arrhizus*) em estudos em bandejas e no controle do fungo *Fusarium solani* através de testes “*in vitro*”.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção de Bioprotetor com quitosana fúngica

O experimento foi realizado em casa de vegetação na Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE. A proporção de material orgânico

utilizada foi (2:3) torta: húmus, acrescida de 1dm^{-3} de biofertilizante de rochas com P e K, ou seja: (2:3:1), torta: húmus: biofertilizante de rochas com P e K, usada para produção do biofertilizante misto (BNPK). O bioprotetor (PNPK) é considerado o biofertilizante misto, (BNPK) inoculado com massa micelial de fungos da Ordem Mucorales (*C. elegans*, *M. hiemalis*, *R. arrhizus*), que possuem quitina e quitosana na parede celular. As três espécies de fungos utilizadas no experimento foram cedidas pela Universidade Católica de Pernambuco-UNICAP, mantidas em meio BDA e estocadas em refrigeração (5°C).

Para o preparo da massa micelial os fungos foram repicados para Erlenmeyers de 2000 mL contendo 1000 mL de meio BDA que, posteriormente, foram incubados durante 8 dias sob agitação a 150 rpm, em agitador horizontal. Após este período foram preparadas 16 bandejas com a proporção selecionada, inoculadas com 100 mL da cultura de fungos, com diluição em 400 mL de água de torneira, passada em filtro de carvão ativado. Os fungos inoculados foram *C. elegans*, *R. arrhizus*, *M. hiemalis*. O tratamento controle foi sem inoculação, formando um esquema com aplicação de 3 fungos (para produção de bioprotetor), cada um avaliado em 3 épocas de amostragem (0, 15 e 30 dias), mais o tratamento controle (com biofertilizante, sem inoculação com fungo Mucorales), com 4 repetições.

Após a inoculação as bandejas foram homogeneizadas, com o auxílio de espátulas esterilizadas, e em seguida as bandejas foram incubadas por 30 dias, à temperatura ambiente ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$). O controle da umidade foi realizado da mesma forma descrita para a produção do experimento para produção de biofertilizante misto, com adição de água passada em filtro de carvão ativado, até 80% para saturação.

Durante a condução dos ensaios foram realizadas amostragens dos substratos no tempo de inoculação, com 15, e 30 dias, respectivamente. O ensaio foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial 3×3 , utilizando 3 espécies de fungo produtor de quitosana fúngica e 3 tempos de amostragem, com 4 repetições. Nas amostragens foram processadas análises químicas de: pH (H_2O), N (totais) e P e K disponível, seguindo a metodologia da Embrapa (2009).

Ensaio *in vitro* com o bioprotetor

As amostras do bioprotetor foram maceradas e passadas em peneira de 50 mesh. Posteriormente, foi realizada a pesagem desse material, nas seguintes doses: 1g; 2g e 3 g por 40 mL de meio BDA sólido. As amostras foram colocadas em tubos Falcon, autoclavados por uma hora, sendo então as diferentes doses misturadas com o meio BDA, e em seguida os materiais foram distribuídos em placas de Petri, formando um esquema fatorial 3x3 (3 doses e 3 tipos de bioprotetor) mais o controle, com 4 repetições. Posteriormente, foram colocados discos de 0,5cm do fungo *Fusarium solani* no centro de cada placa, para avaliar o potencial do bioprotetor no controle do crescimento do fungo. As placas foram incubadas em estufa de crescimento a 28 °C, durante 7 dias. Esse período foi observado em relação ao tempo que o tratamento controle atingiu a borda da placa de Petri.

O crescimento do fungo *Fusarium solani* foi avaliado através do crescimento radial (diâmetro da colônia - cm), medido a partir do segundo dia da montagem do experimento. A medição do diâmetro da colônia foi realizada em dois sentidos perpendiculares, a cada 24 h de incubação. Os resultados foram submetidos a teste de médias (Tukey a 5%), e regressão quando pertinente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento em Bandejas

O resultado do pH dos estudos em bandejas contendo os diferentes bioprotetores estão apresentados na Figura 1. Foram observados efeitos significativos do pH nos bioprotetores e no tratamento controle (biofertilizante sem adição de fungos da ordem Mucorales). Os melhores valores de pH foram verificados para os tratamentos *R.A+BNPK* e *C.E+BNPK* que não diferiram entre si, com médias de 7,48 e 7,45 pH (H₂O), respectivamente. Estes resultados concordam com os obtidos por Santana et al. (2014), que constataram efeitos significativos para o pH do biofertilizante de rochas em mistura com húmus de minhoca (inoculado com bactérias de vida livre e fungo *C. elegans*) durante o período de incubação de 10 a 20 de dias. Silva Junior et al. (2012), não constatou efeito significativo para pH do solo com aplicação de diferentes fertilizantes, ao analisar o efeito do bioprotetor e do fertilizante

convencional solúvel nas características do solo. Os fungos *C. elegans*, e *R. arrhizus* presentes no biofertilizante misto formando o bioprotetor, atuam como fornecedores de nutrientes e protegem as plantas contra doenças fúngicas, por efeito da quitina e quitosana contida nas paredes celulares. Valores de pH mais baixos foram observados no tratamento controle em resposta a não aplicação de fungos produtores de quitosana, ou a menor eficiência do fungo *M. hiemalis* para elevar o pH no bioprotetor.

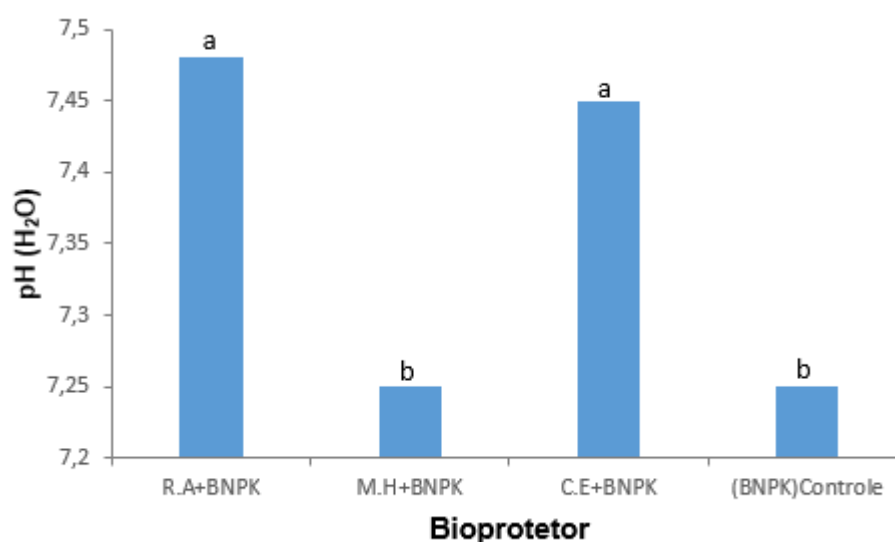


Figura 1. Valores de pH no experimento em bandejas com substratos contendo os bioprotetores produzidos com os diferentes fungos Mucorales. R.A+BNPK-*R. arrhizus* mais biofertilizante misto; M.H + BNPK-*M. hiemalis* mais biofertilizante misto; C.E + BNPK-*C. elegans* mais biofertilizante misto; BNPK- biofertilizante misto.

Para o P disponível nos bioprotetores ocorreu diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com os períodos de incubação (tabela 1). No período de incubação de 0 dias houve aumento na disponibilidade de P em todos os tratamentos, não havendo diferença significativa entre si. No entanto, para o período de 15 dias os bioprotetores com *C. elegans*, *M. hiemalis* e o controle apresentaram aumento na disponibilidade de P, que foi de aproximadamente 40%, comparando com o tratamento com adição de *R. arrhizus*. Acréscimos na disponibilidade de P também foram constatados no biofertilizante misto (BNPK) durante 30 dias de incubação, com aumento de 100% em comparação com o tempo inicial (Santana et al. 2014). Os fungos da classe zygomycetos tem a capacidade de produzir fosfatos inorgânicos aumentando desse modo a disponibilidade de P no meio de cultivo, entretanto, a maior ou a menor

contribuição desses fungos em aumentar os nutrientes nos substratos está relacionado com os valores de pH ácidos no meio de cultivo, sugerido que a quitosana produzida pelo fungo altere a permeabilidade da membrana plasmática (BENHAMOU, 1996) e também promove estresse oxidativo no fungo patogênico (DI PIERO & GARDA 2008).

Maior incremento na disponibilidade de P foi observado para o período de incubação de 30 dias nos bioprotetores. O bioprotetor com *C. elegans*, *R. arrhizus* e o controle aumentaram o teor de P, em 26% a mais em relação ao tratamento com adição de *M. hiemalis*. Este efeito provavelmente foi devido a maior liberação dos nutrientes contidos na apatita e no material orgânico que constituem o bioprotetor. O biofertilizante - bioprotetor pode liberar todos os macronutrientes necessários para o crescimento e produtividade das plantas.

A quitosana pode aumentar os níveis de N, P e K nos substratos devido à formação de grupos amino, devido a desacetilação da quitosana como relatado por Kowalski et al. (2006) and Goy et al. (2009). Além disso, *C. elegans* contém quitosana na parede celular e produz polifosfatos inorgânicos (FRANCO et al. 2011), que aumenta a solubilidade de P e de outros nutrientes. Os nutrientes podem ser liberados das rochas que constituem o bioprotetor por vários processos químicos, físicos e biológicos. A inoculação do biofertilizante de rochas com a bactéria *Acidithiobacillus*, que atua na oxidação do enxofre elementar produzindo ácido sulfúrico, atua nas rochas, aumentando a disponibilidade de P e K, como relatado por Stamford et al. (2006; 2007a; 2008a). Também deve ser observado que o $S-SO_4^{-2}$ liberado durante o processo pode ser utilizado pelas plantas pois o S elementar será convertido em sulfato (SANTANA et al. 2014). Também, o acréscimo na disponibilidade de P pode ser explicado por possível atuação de outras bactérias nativas do solo e por fungos que produzem polifosfatos inorgânicos, e que podem promover aumento na disponibilidade desse elemento no substrato. Silva et al. (2011), analisando diferentes doses de biofertilizante de rochas (BP) no crescimento do melão, verificou efeitos positivos com incrementos no conteúdo de P do solo.

Tabela 1. Valores de fosforo nos bioprotetores, incubado em bandejas, durante diferentes dias de incubação à temperatura ambiente.

Bioprotetores	Período de incubação (dias)		
	0	15	30

	Fósforo (g kg ⁻¹)		
<i>R. arrhizus</i>+BNPK	2,3 ^a ± 0,21	1,7 ^b ± 0,18	1,9 ^a ± 0,28
<i>M. hiemalis</i>+BNPK	2,5 ^a ± 0,10	2,4 ^a ± 0,30	1,4 ^b ± 0,47
<i>C. elegans</i>+BNPK	2,4 ^a ± 0,10	2,3 ^a ± 0,21	1,8 ^a ± 0,22
Controle-BNPK	2,4 ^a ± 0,43	2,3 ^a ± 0,29	1,9 ^a ± 0,31

BNPK-Biofertilizante misto. Médias minúscula na vertical não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. C.V(%). 13,28.

A efetividade do biofertilizante de rochas com enxofre elementar inoculados com *A. thiooxidans* foi relatada por Lima et al. (2010). Os autores concordam que o biofertilizante de rochas com P e K em mistura com composto de minhoca apresenta efeito residual maior em comparação com fertilizantes solúveis em um latossolo amarelo em dois cultivos consecutivos.

O efeito do bioprotetor no teor do K disponível foi significativo ($p < 0,05$), em cada período de incubação, e estão apresentados na Tabela 2. Os valores de K em todos os tratamentos, inclusive o controle, não apresentaram diferenças significativas entre si. No período de 0, 15, e 30 dias de incubação todos os bioprotetores obtiveram disponibilidades de K, com resultados semelhantes e não diferindo do controle.

O aumento de K disponível em substratos pode estar relacionado com o teor de K presente nas rochas naturais e com a inoculação do material com fungos da ordem Mucorales, que pode proporcionar incremento do nutriente. Além disso, processos interativos realizados por micro-organismos liberam macronutrientes contido nos compostos utilizados para produzir o biofertilizante misto e bioprotetor, como o húmus de minhoca. Efeitos significativos no acréscimo de K foram verificados por Santana et al. (2014), tendo sido observado que os maiores valores de K disponível foram obtidos após 30 dias de incubação. Estes autores também observaram que o bioprotetor com *C. elegans* aumentou o K disponível em até 20% a mais do que o obtido no biofertilizante BNPK.

Tabela 2. Valores de Potássio nos bioprotetores, incubado em bandejas, durante diferentes dias de incubação à temperatura ambiente.

Bioprotetor	Período de incubação (dias)		
	0	15	30

	Potássio (g kg ⁻¹)		
<i>R. arrhizus</i>+BNPK	0,55 ^a ± 0,04	0,52 ^a ± 0,01	0,67 ^a ± 0,13
<i>M. hiemalis</i>+BNPK	0,55 ^a ± 0,03	0,57 ^a ± 0,03	0,58 ^a ± 0,06
<i>C. elegans</i>+BNPK	0,60 ^a ± 0,03	0,54 ^a ± 0,04	0,59 ^a ± 0,04
Controle-BNPK	0,56 ^a ± 0,05	0,62 ^a ± 0,05	0,59 ^a ± 0,03

BNPK-Biofertilizante misto. Médias minúscula na vertical não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. C.V(%). 9,7.

O N total no biofertilizante misto foi afetado pela inoculação com fungos produtores de quitosana, e os resultados estão apresentados na Figura 2, com diferença significativa entre os tratamentos de fertilização e o controle. Os bioprotetores mostraram resultados semelhantes, com maior disponibilidade de N total, não diferindo entre si, mas sendo superior ao tratamento controle. O biofertilizante rochas (BPK) constituído com materiais orgânicos formam o biofertilizante misto (BNPK), inoculado com bactérias diazotróficas de vida livre, o que justifica o aumento no conteúdo de N total, através do processo de fixação biológica do nitrogênio - FBN (STAMFORD et al. 2014), aumentando também a disponibilidade de P devido a produção de polifosfato inorgânico pela presença do fungo *C. elegans* (FRANCO et al.2011). Efeitos significativos para o N total também foram observados por Stamford et al. (2014), avaliando diferentes produtos de fertilização (BNPK- biofertilizante; PNPk - bioprotetor; NPKF – fertilizante solúvel) na disponibilidade de nutrientes no solo. Stamford et al. (2009), encontraram incremento de N total no solo, com aplicação de BNPK inoculado com fungo produtor de quitosana (*C. elegans*), e também observaram maior eficiência agrônômica do biofertilizante de rochas em mistura com húmus de minhoca no crescimento do feijão de corda.

A inoculação do BNPK (biofertilizante misto) com massa micelial de *C. elegans*, com bactérias diazotróficas de vida livre, favoreceu aumento no teor de N total, na nodulação do feijão-caupi, na produção de biomassa e na absorção de nutrientes durante 30 dias de incubação (BERGER et al.2013).

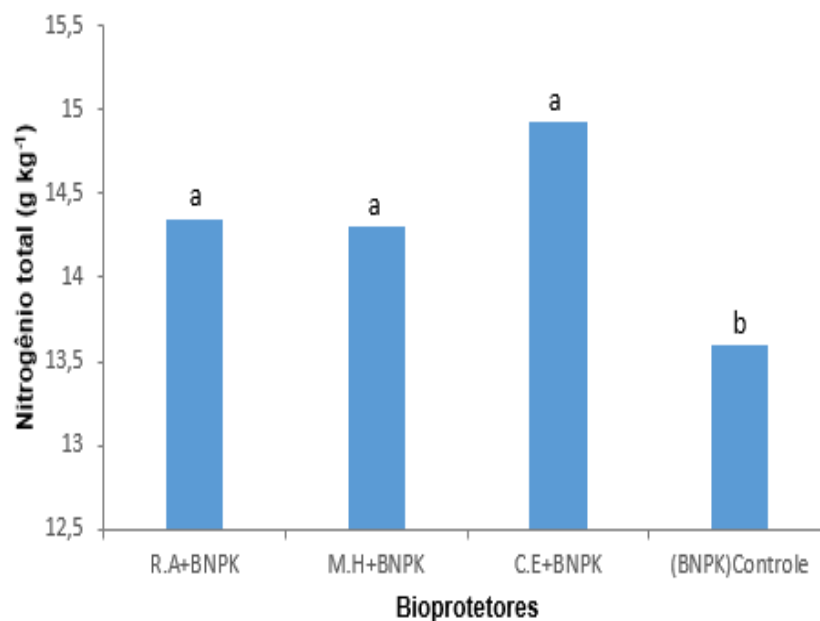


Figura 2. Incremento de N total no biofertilizante misto em função da inoculação com os diferentes fungos da Ordem Mucorales, no experimento em bandejas. R.A+BNPK-*R. arrhizus* mais biofertilizante misto; M.H + BNPK-*M. hiemalis* mais biofertilizante misto; C.E + BNPK-*C. elegans* mais biofertilizante misto; BNPK-biofertilizante misto.

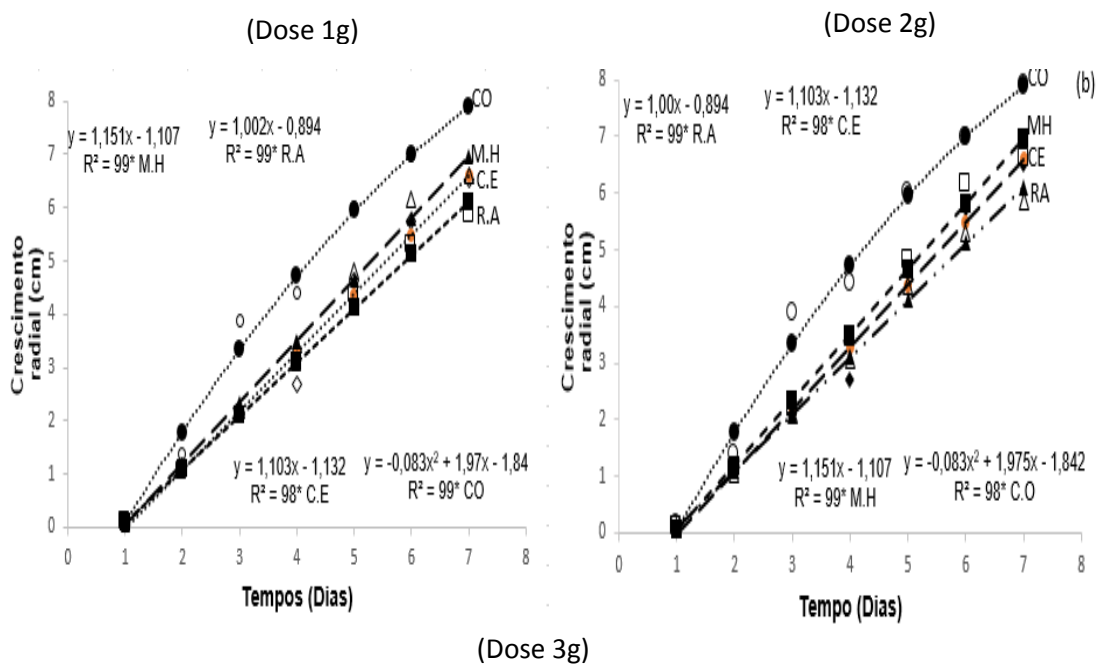
Experimento “*in vitro*”

O crescimento do fungo *Fusarium solani* foi afetado pela presença de diferentes fungos produtores de quitosana inoculados no biofertilizante misto, com redução no crescimento (Figura 3). Houve interação significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos e os períodos de incubação (dias), em relação ao crescimento radial do *Fusarium solani*. O crescimento do fungo foi significativamente inibido quando incubado em meio BDA contendo o biofertilizante misto inoculado com os fungos produtores de quitosana (*R. arrhizus*; *C. elegans*; *M. hiemalis*). Os tratamentos com os diferentes fungos Mucorales não diferiram entre si, porém, apresentaram diferença significativa em comparação ao tratamento controle, que apresentou maior crescimento, com média de 7,8 cm em 7 dias de incubação, na dose 1 e 2g de bioprotetor, e de 8,9 cm na dose 3g. Berger et al. (2016) observou que o crescimento radial do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. foi significativamente inibido quando incubado em meio BDA contendo as maiores

concentrações de quitosana (4, 5 e 6 mg mL⁻¹), durante 9 dias de incubação. Além da atividade antimicrobiana de quitosana, o ensaio *in situ* demonstrou a capacidade de diferentes fontes de quitosana (quitosana de crustáceos, e de *C. elegans*) que diminuiu o índice de severidade da fusariose em caupi inoculado com *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*.

Comportamento similar foi verificado para o crescimento radial do *Fusarium solani*, nas diferentes doses utilizadas, apresentando máximo crescimento linear em todos os tratamento, durante 7 dias de incubação. No tratamento controle o *Fusarium solani* apresentou crescimento máximo quadrático em todas as doses com 7 dias de incubação, com médias superiores aos demais tratamentos.

Alguns autores sugerem que a atividade antimicrobiana da quitosana é, devido ao grupo amino numa forma policatiónico na presença de um baixo pH, como geralmente ocorre em soluções de quitosana. Nestas condições, a estrutura catiónica pode interagir com as cargas negativas de grupos aniônicos da membrana celular dos micro-organismos, alterando a permeabilidade da membrana plasmática, promovendo a redução nos componentes intracelulares (YOUNES AND RINAUDO, 2015).



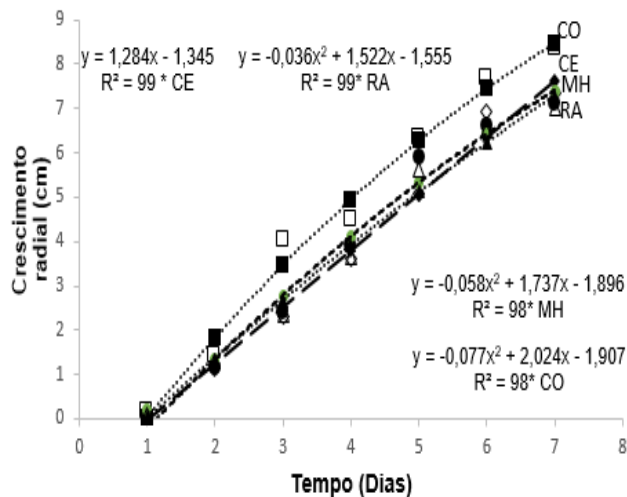


Figura 3. Crescimento radial (cm) do *Fusarium solani* nas doses 1g, 2g e 3g de Bioprotetor com diferentes fungos Mucorales, em vários tempos de incubação. R.A (*R. arrhizus*) adicionado o biofertilizante misto; M.H (*M. hiemalis*) mais o biofertilizante misto; C.E (*C. elegans*) mais o biofertilizante misto; C.O (biofertilizante misto, sem adição de fungo Mucorales).

Ensaio utilizando feijão-caupi mostraram que o uso de quitosana pode induzir mecanismos de defesas nas plantas contra a murcha causada por *Fusarium oxysporum* f. sp, evidenciando o potencial do biopolímero (quitosana), que atua na defesa contra doenças fitopatogênicas (BERGER et al.2016). Resultado similar foi encontrado por Rappussi et al. (2009), que relataram efeito fungicida de quitosana e como inibidor do crescimento micelial, na morfologia e na germinação de conídios. De acordo com Liu et al. (2004), a quitosana pode participar na produção de uma película (filme) protetor sobre a superfície celular, impedindo o transporte de nutriente pela membrana plasmática. Entretanto, através de análise microscópica Berger et al. (2016) verificou que é possível observar algumas alterações morfológicas, tais como depressões, na superfície de hifas de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* causada por quitosana.

Estudos realizados por Fitza et al. (2013) e Ma et al. (2013) também demonstraram a possibilidade do uso da quitosana como alternativa potencial para controlar doenças durante a pré-colheita de algumas culturas agrícolas, evitando o uso de pesticidas

CONCLUSÕES

Rhizopus arrhizus e *Cunninghamella elegans* foram mais efetivos na produção de acidez do que *Mucor hiemalis*.

O biofertilizante misto inoculado com fungos da Ordem Mucorales, de uma maneira geral, não mostrou grande variação na disponibilização de P e K disponível;

Para N total não houve efeito entre os diferentes fungos da Ordem Mucorales, entretanto todos promoveram incremento de N total quando comparado com o biofertilizante misto sem inoculação (tratamento controle).

Os diferentes bioprotetores apresentaram potencial para inibir o crescimento do *Fusarium solani*.

Não houve diferença entre as doses de bioprotetores aplicadas em relação ao crescimento radial do *Fusarium solani*.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos recursos dispendidos para a realização dos trabalhos e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERGER, L. R. R.; STAMFORD, T. C. M.; WILLADINO, L. G.; LARANJEIRA, D.; LIMA, M. A. B.; MALHEIROS, S. M. M.; OLIVEIRA, W. J.; STAMFORD, T. C. M. Cowpea resistance induced against *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* by crustaceous chitosan and by biomass and chitosan obtained from *Cunninghamella elegans*. **Biological Control**, v.92, p.45–54, 2016.

BERGER, L. R. R.; STAMFORD, T. C. M.; SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; FRANCO, L. O.; STAMFORD, T. C. M. Plant and soil characteristics affected by biofertilizers from rocks and organic matter inoculated with diazotrophic bacteria and fungi that produce chitosan. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v.13, n.3, p.592-603, 2013.

CALDEIRA, M. V.; DELARMELINA, W. M.; PERONI, L.; GONÇALVES, E. O.; SILVA, A. G. Lodo de esgoto e vermiculita na produção de mudas de eucalipto. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. v. 43, n. 2, p. 155-163, 2013.

CAMPOS-TAKAKI, G. M. The versatility on copolymers chitin and chitosan production. In: DUTTA, P. K. **Chitin and chitosan opportunities & challenges**. India. 2005.

DI PIERO, R.M.; GARDA, M.V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro comum. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.43, p.1121-1128, 2008.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2º ed. Brasília, 2009. p. 627.

FAI, A.E.C.; STAMFORD T.C.M.; STAMFORD, T.L.M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Revista Iberoamer. Polímeros**, v.9, n.435-451, 2008.

FELIX, F.; F. (2011) **Produção e efeitos de Biofertilizante Bioprotetor com quitosana na alface**. 68p. (Tese de Doutorado) -Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

FENG Y, XIA W. Preparation, characterization and antibacterial activity of water-soluble O-fumaryl-chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v.83, p.1169-1173, 2011.

FITZA, K.N.E., PAYN, K.G., STEENKAMP, E.T., MYBURG, A.A., NAIDOO, S., Chitosan application improves resistance to *Fusarium circinatum* in *Pinus patula*. **S. Afr. J. Bot.** v.85, 70-78, 2013.

FRANCO, L. O.; ALBUQUERQUE, C.D.C.; STAMFORD, N. P.; LIMA, M.A.B.; TAKAKI, G.M.C. Avaliação da atividade ácida e alcalina e acúmulo de fosfato inorgânico em amostras de *Cunninghamella elegans*. **Analytica**, v.54, p.70-78, 2011.

FRANCO, L. de O.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, N. P.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. de. *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. **Revista Analytica**, n. 14, 40-44, 2005.

LIMA F. S, STAMFORD N. P, SOUSA C. S, LIRA JUNIOR M. A, MALHEIROS S. M. M, van STRAATEN, P. Earthworm compound and rock biofertilizer enriched in nitrogen by inoculation with free living diazotrophic bacteria. **World J Microbiol Biotechnol.** v.26, p.1769-1777, 2010.

LIU, H., DU, Y., YANG, J., ZHU, H. Structural characterization and antimicrobial activity of chitosan betaine derivative complex. **Carbohydr. Polym.** v.55, p.291-297, 2004.

MA, Z., YANG, L., YAN, H., KENNEDY, J.F., MENG, X. Chitosan and oligochitosan enhance the resistance of peach fruit to brown rot. **Carbohydr. Polym.** v.94, p.272-277, 2013.

NÓBREGA, R. S. A.; VILAS BOAS, R. C. V.; NOBREGA, J. C. A.; PAULA, A. M. de.; MOREIRA, F. B. de S. Utilização de biossólido no crescimento inicial de mudas de aroeira (*Schinus terebynthifolius Raddi*). **Revista Árvore**, v.31, n.2, p.239-246, 2007.

OLIVEIRA, F.L.N.; STAMFORD N. P.; NETO, D. S.; OLIVEIRA, E. C. A.; OLIVEIRA, W. S.; SANTOS, C. E, R, S. Effects of biofertilizers produced from rocks and organic matter, enriched by diazotrophic bacteria inoculation on growth and yield of sugarcane. **Australian Journal of (Crop Science)**, v.9, n.6, p.504-508, 2015.

OLIVEIRA, W. S.; STAMFORD, N. P.; SILVA, E. V. N.; SILVA SANTOS, C. E. R.; FREITAS, A. D. S.; ARNAUD, T. M. S.; SARMENTO, B. F.; Biofertilizer produced by interactive microbial processes affects melon yield and nutrients availability in a Brazilian semiarid soil. **Australian Journal of, Crop Science.** v.8, n. 7, p.1124-1131, 2014.

RAPPUSSI, M.C.C., PASCHOLATI, S.F., BENATO, E.A., CIA, P., Chitosan reduces infection by *Guignardia citricarpa* in postharvest “Valencia” oranges. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v.52, p.513–521, 2009.

SAIDELLES, F. L. F.; CALDEIRA, M. V. W.; SCHIRMER, W. N.; SPERANDIO, H. V. Casca de arroz carbonizada como substrato para produção de mudas de tamboril-da-mata e garapeira. **Ciências Agrárias**, v.30, n.1, p.1173-1186, 2009.

SANTANA, R.S.; STAMFORD, N.P.; SILVA JUNIOR, S.; SANTOS C.E.R.S.; FREITAS A.D.S.; ARNAUD, T.M.S. Influence of Bioprotector with Microbial Inoculation on Green Pepper Yield and Improvement on Soil Nutrients Availability. **International Journal of Agriculture Innovations and Research**, v.2, n. 6, p.2319-1473, 2014.

SILVA JUNIOR, S. (2012) **Bioprotetor com bactéria Diazotrófica mais Quitosana fúngica em comparação com fertilizante mineral solúvel na uva Isabel**. 107p. (Tese de Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SILVA, M. O.; STAMFORD, N.P.; AMORIM, L.B. de; ALMEIDA JÚNIOR, A.B. de; SILVA, M. O. Diferentes fontes de P no desenvolvimento do meloeiro e disponibilidade de fósforo no solo. **Revista Ciências Agrônômicas**, v.42, n.2, p. 268-277, 2011.

SOUSA, L. B.; NÓBREGA, R.S.A.; LUSTOSA, J.F.; AMORIM, S.P.N.; FERREIRA, L.V.M.; NÓBREGA, J.C.A. Cultivo de *Sesbania virgata* (Cav. Pers) em diferentes substratos. **Revista de Ciências Agrárias**, v.58, p. 240-247, 2015.

STAMFORD, N.P.; JUNIOR, S. S.; SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; SANTOS, C. M. A.; ARNAUD, T. M.; S.; SOARES, H. R. Yield of grape (*Vitis labrusca* cv. Isabel) and soil nutrients availability affected by biofertilizer with diazotrophic bacteria and fungi chitosan. **Australian Journal of Crop Science**, v.8, n.2, p.301-306, 2014.

STAMFORD N. P, MOURA P. M, LIRA JUNIOR M. A, SANTOS CERS, DUENHAS L. H, Gava CAT. Chemical attributes of an Argisol of the Vale do São Francisco after melon growth with phosphate and potash rocks biofertilizers. **Braz J Hortic**, v.27, p.447- 452, 2009.

STAMFORD, N.P.; IZQUIERDO, C.G.; FERNÁNDEZ, M.T.H.; MORENO, M. del C.M. Biofertilizante de rochas fosfatadas e potássicas com enxofre e *Acidithiobacillus*. In: FIGUEIREDO, M. do V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.

P.; SANTOS, C.E. de R. e S. **Micro-organismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, p. 401-421, 2008a.

STAMFORD NP; SANTOS PR; SANTOS CERS; FREITAS ADS; DIAS SHL LIRA JÚNIOR MA. Agronomic effectiveness of biofertilizers with phosphate rock, sulphur and *Acidithiobacillus* in a Brazilian tableland acidic soil grown with yam bean. **Bioresource Technology**, v.98 p.1311-1318, 2007a.

STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R.; FREITAS, A. D. S.; LIMA, R. Rock biofertilizer with *Acidithiobacillus* on sugarcane yield and nutrient uptake in a Brazilian soil. **Geomycrobiology jornal**. n. 23. n.5, p.261-265, 2006.

STEFFEN, G. P. K.; ANTONIOLLI, Z. I.; STEFFEN, R. B.; MACHADO, R. G. Casca de arroz e esterco bovino como substratos para a multiplicação de minhocas e produção de mudas de tomate e alface. **Acta Zoológica Mexicana**, n.2, p. 333-343, 2010.

YOUNES, I., RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar. Drugs* v.13, p.1133-1174, 2015.