

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Desempenho de biofertilizante fosfatado na nutrição de plantas de milho**

**Thalita Cardoso Anastácio**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de  
Mestra em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

**Piracicaba  
2018**

**Thalita Cardoso Anastácio**  
**Engenheira Agrônoma**

**Desempenho de biofertilizante fosfatado na nutrição de plantas de milho**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador  
Prof. Dr. **DURVAL DOURADO NETO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestra em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

**Piracicaba**  
**2018**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**

**DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Anastacio, Thalita Cardoso

Desempenho de biofertilizante fosfatado na nutrição de plantas de milho / Thalita Cardoso Anastacio. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

47 p.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Aspergillus niger* 2. Fertilizante alternativo 3. Fertilizante fosfatado 4. Apatita I. Título

*Aos meus pais, Ana Dalva e Anastácio, e às minhas irmãs, Aline e Letícia,*  
por serem meu apoio, meu exemplo e minha vida.

*Dedico*

*Ao Cristiano,*  
Pelo companheirismo e apoio.

*Aos amigos,*  
Pela amizade.

*Ofereço*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu anjo da guarda que sempre rege pelo meu bem-estar.

Aos meus pais, Ana Dalva e Anastácio, por ter me criado no melhor que puderam e sempre serem meu apoio. Às minhas irmãs, Letícia, por fazer com que meus dias terem mais risadas, e Aline, por ser uma segunda mãe da qual sempre me apoiou e me direcionou.

Ao Cristiano, por ter feito meus dias em Piracicaba melhores e pela ajuda imensurável na dissertação. Ao Guilherme Furlan, pela amizade, confiança e ter ajudado durante a chegada na Esalq. Ao meu amigo Josimar, que vem ajudando a tantos anos, da caneta a enxada. As companheiras de apartamento Daiana, Thays, Jéssica e Líllian pelo ótimo convívio. Os amigos do departamento de solos, principalmente ao Aijanio e Arnaldo, pela ajuda no sol quente com o solo. Aos amigos do laboratório Multiusuário, Bruno, Walquiria, Renan, Aline, Ana, Felipe Brendler, Laís, Victor, André, Danyllo, em especial para a Jackellyne e Thais pelos cafezinhos da tarde. Aos muito trabalhadores e companheiros de sala, Guilherme, Felipe Sartori e Thaise, pela convivência inacreditavelmente descontraída e por serem tão solícitos. A todos estagiários do Gfasp.

Ao meu orientador Durval Dourado Neto, por sua bondade, prestatividade, por me mostrar que existe um outro nível de inteligência e conhecimento. Ao coorientador Gilberto, por ser uma inspiração na minha vida acadêmica e um exemplo de pesquisador. A professora Tsai, e seus alunos, por disponibilizarem a área experimental e equipamentos. Os professores que estiveram na minha banca de defesa. A todos funcionários da produção vegetal, principalmente ao Neto e Wilson, por dar uma mãozinha nos momentos de aperto e peso. As secretárias Luciane, Fabiana e Eveline.

À Esalq pela oportunidade, CNPq e Fapesp pelo apoio.

A todos meus professores que fizeram parte da minha formação acadêmica desde infância até chegar onde cheguei.

Enfim, a todos que em algum momento, direta ou indiretamente, contribuíram na minha caminhada e que estarão ainda por perto me ajudando a traçar o futuro.

Meu muito obrigada.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1. BIOFERTILIZANTE FOSFATADO .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BIOFERTILIZANTE.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2. EXPERIMENTO 1: EFICIÊNCIA DO BIOFERTILIZANTE FOSFATADO COMO SUBSTITUINTE PARCIAL NA NUTRIÇÃO DE MILHO .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.1. O SOLO UTILIZADO NO ESTUDO .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2.2. TRATAMENTOS E CONDUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2.3. DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.4. FOSFATASE ÁCIDA .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.1. ÍNDICE SPAD .....</b>	<b>24</b>
<b>3.3. EXPERIMENTO 2: ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DE RAÍZES COM USO DE BIOFERTILIZANTE FOSFATADO NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DO FUNGO ASPERGILLUS NIGER 24</b>	
<b>3.3.1. AREIA UTILIZADA.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3.1. TRATAMENTOS E CONDUÇÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>3.3.2. RAÍZES: ANÁLISE MORFOLÓGICA POR IMAGEM.....</b>	<b>25</b>
<b>3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>26</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>4.1. EXPERIMENTO 1: EFICIÊNCIA DO BIOFERTILIZANTE FOSFATADO COMO SUBSTITUINTE PARCIAL NA NUTRIÇÃO DE MILHO .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1.1. CONTEÚDO E BIOMASSA VEGETAL.....</b>	<b>27</b>
<b>4.1.2. ATIVIDADE DA FOSFATASE ÁCIDA .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1.3. ÍNDICE SPAD .....</b>	<b>32</b>

<b>4.2. EXPERIMENTO 2: ANÁLISE MORFOLÓGICA DE RAÍZES DE MILHO RECEBENDO BIOFERTILIZANTE FOSFATADO COM E SEM O FUNGO ASPERGILLUS NIGER.....</b>	<b>34</b>
<b>4.2.1. MATÉRIA SECA DA PARTE AÉREA E RAIZ.....</b>	<b>34</b>
<b>4.2.2. ÁREA PROJETADA, VOLUME E CLASSIFICAÇÃO DE DIÂMETRO DE RAÍZES .....</b>	<b>35</b>
<b>4.3. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>39</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>43</b>

## RESUMO

### Desempenho de biofertilizante fosfatado na nutrição de plantas de milho

Os solos brasileiros apresentam no geral alto grau de intemperismo e são caracterizados pelo baixo teor de fósforo (P) disponível às plantas, devido à forte ligação com os minerais do solo (oxi-hidróxidos de Fe e Al). Esse elemento muito importante no metabolismo vegetal necessita ser aplicado em grandes quantidades na forma de adubo fosfatado para obtenção de altas produtividades agrícolas. No entanto, a produção de fertilizante solúvel convencional, como é o caso do superfosfato triplo (SFT), envolve gastos elevados de energia e emprego de ácidos fortes, gerando resíduos com alto potencial de contaminação ao meio ambiente. A fim de eliminar a etapa de acidificação industrial, nosso objetivo foi avaliar um biofertilizante fosfatado (BF) produzido a partir da solubilização de fosfato de rocha de Araxá (pouco reativo), pelo fungo *Aspergillus niger*. Nesse trabalho, foi testada em plantas de milho: (i) a eficiência do BF como substituinte parcial de SFT; (ii) alterações morfológicas de raízes de milho causadas pelo fungo presente no BF. No primeiro teste, em esquema fatorial 6x2, foram aplicadas doses de BF a fim de substituir o SFT em 0, 25, 50, 75 e 100 %, mais controle sem aplicação de P. A aplicação ocorreu em dois métodos, localizado em linha e volume total do solo. Foram avaliados o peso de massa seca da parte aérea, teor e conteúdo de P no tecido vegetal, atividade da fosfatase ácida e índice Spad. Para a análise das alterações morfológicas de raízes, foram utilizados tubos rizotron preenchidos com areia, com a aplicação dos tratamentos em volume total. Os tratamentos foram: SFT; BF com fungo vivo; BF com fungo morto; controle sem P. As coletas da parte aérea e raízes correram a cada 7 dias, iniciando a contagem ao sétimo dia. Foram avaliadas a produção de matéria seca de raízes, da parte aérea, a área superficial de raízes, o volume radicular e as classes de diâmetro de raízes. As doses de substituição mais promissoras foram de 25 e 50%, representando 89,02 e 80,86% da produção vegetal do SFT e 88,67 e 81,81% do conteúdo de P no tecido vegetal, respectivamente, ambos em aplicação em volume total. A presença do fungo vivo no BF não proporcionou diferenças nos parâmetros analisados. Apesar de serem necessários mais estudos e adaptações no processo de produção, o BF se mostrou promissor na substituição parcial da adubação fosfatada com SFT. O uso de BF proporciona, através da sua composição, o aproveitamento de resíduos agrícolas de baixo custo e a utilização de jazidas nacionais de fosfato de rocha, as quais possuem baixa reatividade.

Palavras-chave: *Aspergillus niger*; Fertilizante alternativo; Fertilizante fosfatado; Apatita



## ABSTRACT

### Performance of phosphate biofertilizer in maize plant nutrition

Brazilian soils generally are highly weathered and characterized by low phosphate (P) content available to plants, due to high affinity of P to soil minerals, specially oxi-hydroxides of iron and aluminium. This important element in vegetal metabolism is needed to be applied in great quantities as phosphate fertilizer in order to attain high crop yields. However, the production of soluble conventional fertilizers, such as triple superphosphate (TSP), is costly and employs strong acids, generating residues potentially harmful to the environment. In order to avoid industrial acidification, our aim was to assess the performance of a phosphate biofertilizer (BF) obtained from the solubilization of Araxá phosphate rock (low reactivity) by the fungus *Aspergillus niger*, L. The suitability of BF to corn plants was investigated for: (i) efficiency of BF replacing TSP and (ii) morphological changes in plant roots caused by the fungus present in the BF. In the first experiment, designed in a 6 x 2 factorial scheme, rates of BF were applied in order to replace 0, 25, 50, 75 or 100% of TSP plus a control without P addition. The fertilizer was applied in bands or thoroughly mixed with soil. Plant shoot dry mass, total P content accumulated in the shoot, acid phosphatase activity and Spad index were measured. In the second experiment, morphological changes in plant roots were evaluated using rizothron tubes filled with sand where BF was mixed thoroughly. The treatments were TSP, BF with living fungus, BF with dead fungus and the control without P addition. Plant shoot and roots were collected every 7 days, starting from the 7<sup>th</sup> day after emergence. We measured dry mass of shoot and root, root surface area, volume and diameter. We found that when applied in total soil volume, fertilizer mixtures containing 25 and 50% of BF, a 89 and 80.9% of the dry matter and 88.7 and 81.8% of P content compared to the addition of 100% of TSP, respectively. For the variables measured, there was no difference in the results when applying BF with alive or dead fungus. We conclude that although further studies and improvement in the BF production are needed, the use of BF as partial replacer for TSP fertilizer is promising. Furthermore, BF use allows the recycling of low cost agricultural residues and the utilization of national deposits of rock phosphate, which are low reactive.

Keywords: *Aspergillus niger*; Alternative fertilizer; Phosphate fertilizer; Apatite

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação gráfica da CMAP do LVa, com ajustes da curva de adsorção pela equação da isoterma de Langmuir .....	21
<b>Figura 2.</b> Média da atividade da fosfatase ácida para o modo de aplicação. ....	30
<b>Figura 3.</b> Tratamentos dos métodos de aplicação da atividade da fosfatase ácida. ....	31
<b>Figura 4.</b> Média do índice Spad pelo modo de aplicação, ns= não significativo. ....	33
<b>Figura 5.</b> Média dos tratamentos do experimento 1 para o índice Spad. ....	34
<b>Figura 6.</b> Evolução da produção de matéria para as quatro semanas de coleta (a) parte aérea (b) .....	37
<b>Figura 7.</b> Evolução da produção para as quatro semanas do (a) volume de raízes e (b) área projetada. ....	38
<b>Figura 8.</b> Grupos de classificação de diâmetros de raízes, (a) dados originais (b) dados considerados no volume total de raízes produzidas por cada tratamento. ....	39

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Conteúdo de P (% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) do biofertilizante por diferentes métodos. ....	17
<b>Tabela 2.</b> Análise química e física do Latossolo Vermelho-amarelo utilizado. ....	19
<b>Tabela 3.</b> Teor de micronutrientes presentes no Latossolo Vermelho-amarelo utilizado. ....	19
<b>Tabela 4.</b> Tratamentos e doses de SFT e BF. ....	22
<b>Tabela 5.</b> Características químicas e físicas da areia utilizada no experimento. ....	24
<b>Tabela 6.</b> Micronutrientes, silício e sódio presentes na areia utilizada no experimento. ....	24
<b>Tabela 7.</b> Tratamentos e doses de superfosfato triplo (SFT) e Biofertilizante fosfatado (BF) no experimento 2. 25	
<b>Tabela 8.</b> Produção de biomassa seca (g) e conteúdo acumulado de P (mg/vaso) na parte aérea de plantas de milho para a interação da proporção misturada dos fertilizantes (totalizando a dose de P aplicada de 30 mg kg <sup>-1</sup> ) superfosfato triplo (SFT) e biofertilizante (BF) e o método de aplicação (localizada ou em volume total). ....	27
<b>Tabela 9.</b> Rendimento em relação ao SFT (%). ....	28

## 1. INTRODUÇÃO

Grande parte do Brasil apresenta solos com elevado grau de intemperismo, caracterizados pelo baixo teor de fósforo (P) disponível às plantas, pois esse elemento está fortemente ligado à fração mineral e argila do solo, tornando-o não-lábil em diferentes graus. Devido a isso, é mandatória a utilização de fertilizantes fosfatados para obtenção de alta produtividade, pois o P é imprescindível para a fotossíntese, respiração e atua como componente estrutural de biomoléculas vegetais.

O processo de obtenção de fertilizantes fosfatados solúveis demanda muita energia e compostos ambientalmente agressivos, que o torna dispendioso. As rochas utilizadas nesse processo são pouco reativas, como as apatitas, que apresentam também baixa solubilidade, ou seja, naturalmente no ambiente elas liberam o P muito lentamente (NOVAIS; SMITH, 1999). Quando aplicada em sem qualquer tratamento no solo, a quantidade de P liberada pela apatita é insuficiente para suprir a demanda agrícola nas atuais condições agrícolas, necessitando assim a acidificação das rochas fosfáticas com ácidos (e.g. sulfúrico, fosfórico).

Como alternativa ao processo industrial, o uso de biofertilizantes fosfatados (BF) que utilizam outros meios de acidificação das rochas, na obtenção de P solúvel, vem sendo estudado. Uma das alternativas a esse processo é a utilização de microrganismos solubilizadores de rocha fosfática (RF), especificamente nesse trabalho discorreremos sobre o fungo *Aspergillus niger*.

O fungo *A. niger* é capaz de solubilizar minerais de RF de baixa reatividade devido à produção e ação de ácidos orgânicos (MENDES et al., 2012). Devido a essa capacidade, foi vislumbrada a produção de um BF que se valesse dessa capacidade solubilizadora do fungo, como meio alternativo de obtenção de P solúvel a partir de RF de baixa reatividade (MENDES et al., 2015). Além desse benefício, o BF acrescenta o efeito aditivo da adição de material orgânico (MO) no solo proveniente de resíduos agrícolas, pois a sua mistura é incrementada o bagaço de cana-de-açúcar, a casca de café e biocarvão de palha de café, todos são resíduos agroindustriais.

Runge-metzger, 1995, acredita que por volta de 70 anos boa parte das jazidas fosfáticas estarão exauridas, portanto uma alternativa que minimize o uso de fertilizantes solúveis, que seja sustentável, economicamente viável a produtores com limitação de recursos, utilize resíduos agrícolas, jazidas de baixa solubilidade nacionais e promova a redução da adsorção de P no solo, é de valia. No entanto, teste do fertilizante é indispensável

no processo de desenvolvimento, uma vez que tem por fim averiguar sua eficácia e aprimorar métodos de produção, aplicação e uso.

A partir do exposto, hipotetizamos que: (i) o uso de fungo *A. niger* possibilita a geração de um biofertilizante que pode substituir parcialmente o fertilizante convencional solúvel; (ii) a presença do fungo *A. niger* tem efeito na nutrição fosfatada de plantas de milho através da solubilização de P da RF e proporciona alteração da morfologia de raízes de plantas de milho. Com essas hipóteses, o presente estudo teve por objetivo: (a) testar o desempenho de biofertilizante fosfatado alternativo na nutrição de plantas de milho, como substituinte parcial (experimento 1); e (b) avaliar as alterações da morfologia de raízes de milho inoculado com BF contendo *A. niger* (experimento 2).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

O milho (*Zea mays*) é uma amilacea pertencente à família Poaceae. Possuindo grande importância socioeconômica, e o Brasil é o terceiro maior produtor mundial, atingindo uma produção de 93,5 milhões de toneladas na safra 2017/2018 (CONAB, 2017). Essa cultura utiliza enorme volume de fertilizante durante o ciclo, principalmente quando produzidos em clima tropical, demandando assim bastante P para uma boa produtividade. Quando o cultivo do milho é para a produção para grãos, boa parte do P é exportado da área de cultivo, isso porque a translocação desse nutriente para os grãos é de 77 a 86 % (COELHO; RESENDE, 2006). Todo esse P exportado da área de cultivo, somado a todo P fixado no solo, tornando necessária a adubação constante do solo para suprir em quantidade adequada os teores nutricionais requeridos pelas culturas. Quando não há a adubação correta do milho, as plantas apresentam folhas arroxeadas, subcrescimento de colmo e espigas, além da baixa produtividade (Fancelli & Dourado Neto, 2004).

Com a disponibilidade limitada das jazidas fosfatadas, e com a população crescendo, principalmente na região dos trópicos, esse elemento vem sendo muito estudado, pois ele é um dos nutrientes mais limitantes para produção vegetal, imprescindível em processos fotossintéticos, respiração e transferência de energia, além de ser componente estrutural de importantes biomoléculas vegetais, tais como, coenzimas, fosfoproteínas e ácidos nucleicos (TAIZ; ZEIGER, 2009). Entretanto, a maior parte do P não está prontamente disponível às plantas, principalmente em solos de clima tropical, onde o processo de intemperismo levou à formação de minerais que apresentam elevado poder de adsorção de P (NOVAIS; SMYTH, 1999).

A idade dos solos influencia diretamente na capacidade de adsorção do P em seus minerais, pois, em solos jovens como o Neossolos e Vertissolos, esse elemento é encontrado nos minerais primários, além da forma mineral e orgânica. Inversamente, nos solos tropicais que apresentam elevado grau de intemperismo, como os Latossolos, o P inorgânico está predominantemente ligado na fração argila, como é o caso dos óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio. Esses minerais de argila possuem predominância de carga positiva na região do pH de cultivo, o que acentua os processos de adsorção e precipitação de P, causando baixa eficiência de fertilizantes fosfatados (54%) (CUNHA, et. al., 2011). De outro modo, em solos alcalinos, a precipitação ocorre principalmente com cálcio (Ca), também contribuindo a baixa disponibilidade de P as plantas.

De acordo com a estabilidade da ligação do P com esses elementos e compartimentos do solo, ele pode ser classificado como lábil e não-lábil. A fração lábil corresponde à fração de P disponível às plantas. Nesta fração, há rápida reposição de P para a solução do solo à medida que a o equilíbrio entre P em solução e P adsorvido é deslocado por absorção radicular. A absorção de P pelas plantas faz com que o P adsorvido retorne para a solução do solo, ficando novamente disponível, porém a quantidade de P que pode ser reposta na solução depende da reserva de P no solo (fator capacidade) (TISDALE, S.L.; NELSON, W.L.; BEATON, J.D, 1993). Diferentemente dessa, a fração não-lábil apresenta uma forte energia de ligação, onde uma simples mudança de equilíbrio na solução do solo não é suficiente para a quebra dessas ligações e reposição do P. Nessa fração são formadas ligações binucleadas entre o P com os minerais do solo (dois oxigênios do fosfato são ligados a dois átomos do metal adsorvente) ou mesmo quando ocorre a penetração do fosfato nas imperfeições dos minerais cristalizados (PARFITT, 1989), disponibilizando as plantas.

Uma das principais técnicas para reduzir a adsorção do P no solo é a adição de matéria orgânica (MO). Sua decomposição produz compostos de baixo peso molecular, como alguns ácidos orgânicos, que competem pelos sítios de adsorção do P do solo e quelatizam óxidos de ferro e alumínio. Essa ação competitiva eleva a disponibilidade de P às plantas devido ao seu aumento na solução do solo.

Os ácidos orgânicos mais ativos na competição desses sítios são os cítricos, oxálicos, glucônico, láctico e málico (GUPPY, et al., 2005), no entanto a baixa constante de dissociação desses ácidos não é capaz de limitar a adsorção de P, por inibição competitiva, quando existe a redução do pH do solo.

O fósforo é um recurso não-renovável e sua fonte é denominada fosfato de rocha. As jazidas de fosfato de rocha largamente mineradas são de duas origens, sedimentar e ígnea. O de origem sedimentar é considerado fosfato reativo e representa 85% de toda a exploração mundial de rocha fosfatada para fertilizantes (SOUZA; FONSECA, 2009). O Brasil apresenta grandes depósitos de fosfato de rocha, porém cerca de 80 % destes são de origem ígnea (pouco reativa), a qual é composta de minerais com baixo teor de  $P_2O_5$  (17%) e de rochas alcalino-carbonatíticas (SOUZA; FONSECA, 2009). Boa parte dessas jazidas estão localizadas nos estados de Minas Gerais, Goiás e São Paulo. Uma jazida no município de Tapira-MG, localizada na microrregião de Araxá, possui um fosfato natural que vem sendo estudado quanto ao uso como fertilizante.

O fosfato de rocha de Araxá tem como característica sua origem ígnea, a qual determina baixa reatividade do mineral fonte de P (hidroxiapatita) devido ao baixo grau de

substituição isomórfica, inverso do ocorrido em rochas sedimentares, que possuem maior substituição isomórfica e e por consequência maior reatividade. Mesmo com essa grande fonte de fósforo nacional, quase todo o fertilizante fosfatado utilizado na agricultura é importado, isso porque o processo de fabricação exige rochas com elevado teor de  $P_2O_5$ , já que até 40 % deste é perdido nos processos de extração e concentração industrial do mineral (LOBO; SILVA, 1986; RIEDER, 1986).

Os fertilizantes fosfatados solúveis atualmente usados na agricultura, apresentam elevada eficiência agrônômica em um curto período de tempo após aplicação, no entanto, a rápida fixação de P pelos minerais do solo e seu alto custo, estimulou o uso de fosfatos naturais reativos pelos agricultores. Essa fonte de origem sedimentar é uma alternativa aos fertilizantes solúveis, sendo mais indicada para solos ácidos já que o baixo pH favorece a solubilização e liberação do P desse fertilizante. Em contrapartida, estudos para otimizar o uso do fosfato nacional de baixa reatividade, como é o caso do fosfato de Araxá, vem ganhando atenção (MATIAS, 2010).

Pesquisas com microrganismos solubilizadores de fosfato capazes de liberar ao solo ácidos orgânicos que influenciam na adsorção e solubilização de P vem crescendo como alternativa ao processo industrial de solubilização. Em estudos conduzidos por Mendes et al. (2014), foi observado que isolados fúngicos de *Aspergillus niger* (isolado fúngico FS1) produziam ácido glucônico, cítrico e oxálico e testes *in vitro* da capacidade de solubilização do fungo resultou na disponibilização de P do fosfato de alumínio em 71 %, do fosfato de ferro em 36 % e do fosfato de cálcio de 100 %. No entanto, são os ácidos cítrico e oxálico os responsáveis por quase toda essa solubilização.

A partir do exposto, foi efetuada por Mendes et al. (2015) a produção de um biofertilizante fosfatado que utilizasse fosfato de rocha ígnea como fonte de P, e o fungo *Aspergillus niger* como agente solubilizador. Para isso, os autores realizaram fermentação em estado sólido de uma mistura contendo fosfato de rocha de Araxá, fungo e resíduos agroindustriais, tais como bagaço de cana-de-açúcar e casca de café. Testes preliminares mostraram potencial do biofertilizante, entretanto estudos adicionais seriam necessários para averiguar o desempenho do material e aperfeiçoamento do processo.





### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Biofertilizante fosfatado

O biofertilizante fosfatado foi produzido por meio de fermentação em estado sólido (FES) utilizando como substrato base a mistura de bagaço de cana-de-açúcar e casca de café na proporção de 1:1, (48 %), biocarvão de palha de café (40 %), rocha fosfática 31,8 % de  $P_2O_5$  (12 %), açúcar cristal (11 %) (não considero na proporção por ser consumido pelos microrganismos no processo), água ( $2,8 \text{ mL g}^{-1}$ ) e 1 mL de inóculo fúngico ( $10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ). A mistura foi acondicionada em sacos de polietileno e esterilizada em autoclave.

O isolado fúngico *Aspergillus niger* FS1 usado para a fabricação do biofertilizante fosfatado foi obtido da coleção de fungos solubilizadores de fosfato do Laboratório de Associações Micorrízicas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agricultura (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Para a inoculação do material, o fungo foi mantido em câmara de crescimento tipo BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , em placas de *petri* contendo meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) por 5-10 dias. Após esse período, os conídios do fungo foram coletados em solução *Tween* 20 (0,1%) (v/v), com concentração final de  $\sim 10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ . Cada saco com o meio de fermentação foi inoculado com 1 mL dessa solução de conídios e incubado à temperatura ambiente por 15 dias.

#### 3.1.1. Caracterização química do biofertilizante

O conteúdo de P do biofertilizante obtido é mostrado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Conteúdo de P (%  $P_2O_5$ ) do biofertilizante por diferentes métodos.

Tratamento	P
Água <sup>a</sup>	0,25
CA <sup>b</sup>	1,18
NCA <sup>c</sup>	1,55
P total <sup>d</sup>	1,76

<sup>a</sup> Solubilidade em  $H_2O$  (1:200).

<sup>b</sup> Solubilidade em 2% ácido cítrico (1:100).

<sup>c</sup> Solubilidade em citrato de amônio neutro.

<sup>d</sup> Digestão em HCl.

As análises de pH, condutividade elétrica (CE) e capacidade de troca de cátions (CTC), foram realizadas em triplicata de acordo com o Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizante e corretivos do Brasil (BRASIL, 2007). Para a caracterização do pH e CE, foram adicionados 1 g de BF preparado (seco a 65°C e pulverizado em moinho de bola) e 20 mL de água deionizada em Erlenmeyers de 125 mL. A mistura foi agitada em mesa agitadora por 1,5 hora a 60 rpm. Após esse período, o pH foi determinado com um medidor de pH de bancada (*Bel Engineering W3B*). As amostras foram deixadas em repouso por 12 horas para a leitura da CE com uso de condutivímetro (*Digimed DM-22*) previamente calibrado com solução padrão de CE de 1200  $\mu\text{S cm}^{-1}$ . A análise da CTC do BF consistiu em adicionar em Erlenmeyers de 250 mL 0,5 g de biofertilizante preparado, 1 g de carvão ativado e 1 mL de HCl 0,5 M. A mistura foi agitada a 60 rpm por 30 min, filtrada com papel Whatman® número 42 e lavada com 400 mL de água deionizada. O material retido no filtro foi colocado em um novo Erlenmeyers e 100 mL de acetato de cálcio 0,5 mol L<sup>-1</sup> foi adicionado em porções de 10 mL. Na sequência, o material foi novamente lavado com água deionizada até o volume final de 300 mL. Essa solução foi então titulada com solução padronizada de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> e indicador (fenolftaleína). Foram feitas amostras em branco (sem o BF). O cálculo da CTC foi realizado conforme equação 1.

$$CTC_{(mmolc\ kg^{-1})} = \frac{1000M (Va - Vb)}{G}$$

Equação 1 - Va se refere ao volume (mL) de NaOH (0,1 mol L<sup>-1</sup>) gasto na titulação, Vb ao volume (mL) de NaOH (0,1 mol L<sup>-1</sup>) gasto na titulação do branco, G à massa (g) da amostra e M à concentração (mol L<sup>-1</sup>) da solução de NaOH padronizada

Foram obtidos 9,50 para pH, 1.876  $\mu\text{S cm}^{-1}$  para CE e 0,503 mmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup> para a CTC.

### **3.2. Experimento 1: Eficiência do biofertilizante fosfatado como substituinte parcial na nutrição de milho**

O experimento 1 foi planejado para testar a melhor proporção de substituição do superfosfato triplo em plantas de milho cultivadas em solo com reduzido teor de P, e os efeitos adicionais da matéria orgânica proveniente do BF.

### 3.2.1. O solo utilizado no estudo

O solo utilizado no experimento 1 foi coletado da camada de 0 a 20 cm de profundidade, no campus da Escola Superior de Agricultura, no município de Piracicaba, São Paulo. De acordo com Embrapa (2013), o solo é classificado como Latossolo Vermelho-amarelo distrófico (LVa).

Após a coleta, o solo foi peneirado em malha de 0,4 mm e seco ao sol. Uma amostra homogênea do LVa foi analisada quanto à textura e características químicas (Tabelas 2 e 3) (VAN RAIJ et al., 2001). O P remanescente foi analisado segundo Alvarez et al. (2000).

O solo não foi autoclavado para simular condições reais de cultivo.

**Tabela 2.** Análise química e física do Latossolo Vermelho-amarelo utilizado.

pH	MO	S	K	Ca	Mg	H+Al	Al	SB	CTC
CaCl <sub>2</sub>	g dm <sup>-3</sup>	mg dm <sup>-3</sup>	-----			mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	-----		
4,7	25	4	1,5	24	13	47	2	39	86
V	m	P res	P rem	P Mehlich-1	Areia	Silte	Argila	CMRA	
---- %	----	mg dm <sup>-3</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg dm <sup>-3</sup>	-----	g kg <sup>-1</sup>	-----	g g <sup>-1</sup>	
45	5	16	42,8	6,1	730	19	251	0,41	

CTC: capacidade de troca catiônica; V: saturação por bases; m: saturação por Al; P res: P extraído por resina; P rem: P remanescente; P Mehlich-1: P extraído por Mehlich-1; CMRA: capacidade máxima de retenção de água.

**Tabela 3.** Teor de micronutrientes presentes no Latossolo Vermelho-amarelo utilizado.

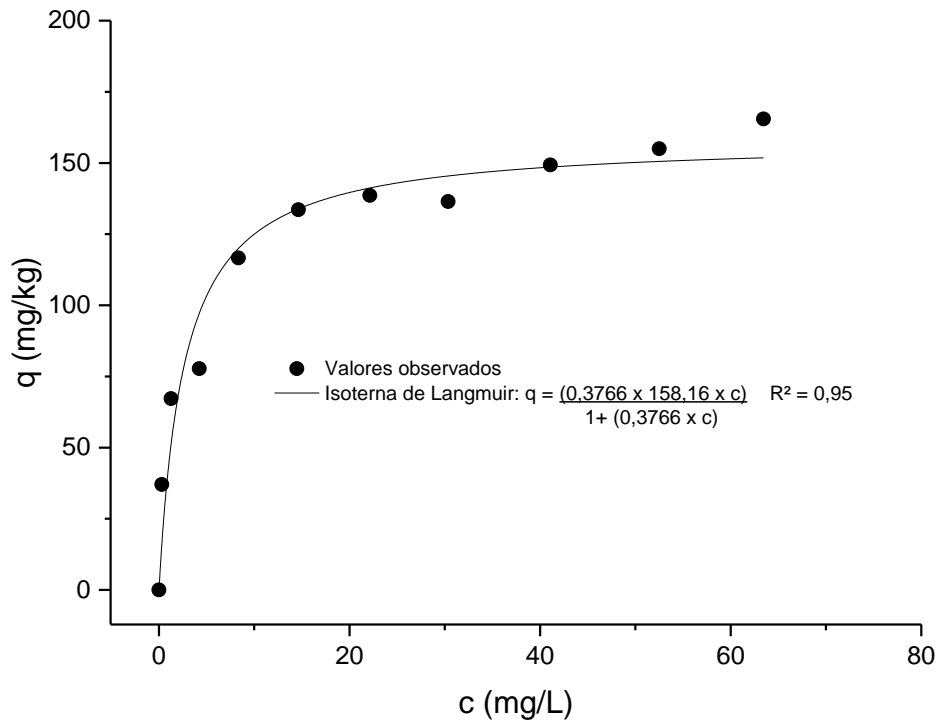
Cu	Fe	Zn	Mn	B
----- mg dm <sup>-3</sup> -----				
0,6	62	2,9	4,0	0,65

Nessa análise de solo, foram utilizados diferentes métodos de extração de P, a Resina, o Mehlich-1 e o do P-remanescente. Esses diferentes extratores podem superestimar ou subestimar o teor de P no solo de acordo com sua classe ou tipo de cultivo. Em solos com cultivo estabelecido utilizando fosfatos naturais o Mehlich-1 pode superestimar o P do solo devido a intensa reação com os ácidos fortes utilizados nas análises e em solos com elevado teor de argila ele pode subestimar o resultado devido a readsorção do P durante a análise. No entanto, o P resina extrai ainda mais fosforo do solo, conforme podemos ver na análise, onde ele resultou 16 mg dm<sup>-3</sup> e o Mehlich-1 6,1 mg dm<sup>-3</sup>. No Estado de Minas Gerais, o P remanescente é o mais utilizado, pois relaciona o teor de P com o de argila.

Para analisar a capacidade máxima de retenção de água no solo (CMRA), foi utilizada a “técnica do funil”, que oferece um valor aproximado da CMRA e é indicada quando não se mantém a estrutura original do solo, ou seja, quando ele é destorroado e peneirado. Essa técnica consiste em mensurar a quantidade de água que fica retida no solo quando saturado. Para isso, foi colocado em um funil contendo um filtro Whatman® número 42 saturado com água, 125 g de solo seco em estufa de ar forçado a 105°C, até peso constante. Esse conjunto foi apoiado em uma proveta e então foi adicionado 200 mL de água no funil, até saturação do solo, que ocorre quando inicia o gotejamento de água na proveta. Todo o sistema foi coberto com plástico filme, a fim de evitar evaporação, após 12 horas foi mensurado o volume de água na proveta. O valor de CMRA foi obtido pela diferença da água adicionada com a coletada, isto é, a água retida no solo dividido pelo peso do solo.

A correção da acidez do solo foi realizada de acordo com boletim técnico do estado de São Paulo, Boletim Técnico 100 (VAN RAIJ, 1997). Utilizando o cálculo de saturação por bases, foi necessário a aplicação de 2,15 t ha<sup>-1</sup> de calcário. A saturação por bases foi elevada de 45 a 70%, com o uso de carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>) P.A. e carbonato de magnésio (MgCO<sub>3</sub>) P.A., na relação 3:1 (cálcio:magnésio) (VAN RAIJ, 1997). Para garantir homogeneidade na mistura, foi utilizada uma betoneira. Após a mistura, porções de 3 kg foram acondicionadas em sacos plástico e incubadas por 70 dias, mantendo a unidade do solo em 60% da CMRA. Após esse período, o solo foi novamente peneirado em malha de 2 mm e colocados em vasos plásticos Leonard, mantendo o plástico, com o intuito de evitar a perda de nutrientes por lixiviação.

A análise da capacidade máxima de adsorção de P (CMAP) foi realizada de acordo com Novais e Smyth (1999) (Figura 1). Para a construção da isoterma de adsorção de P, foram adicionadas soluções de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> nas doses de 0, 4, 8, 12, 20, 28, 36, 44, 56, 68, 80 mg L<sup>-1</sup> P, em tubos tipo falcon contendo 2,5 g de solo, previamente seco e peneirado em malha de 2 mm, e completado até o volume de 25 mL com CaCl<sub>2</sub>. Após agitação contínua de 24 horas na temperatura de 25 °C, as soluções foram filtradas com filtro Whatman® número 42. A determinação de P foi realizada por calorimetria em espectrofotômetro de absorção molecular, pelo método do azul de molibdato em meio reduzido por ácido ascórbico (vitamina C) (BRAGA; DEFELIPO, 1974). Essa metodologia consiste em estimar o P adsorvido através do cálculo da diferença das concentrações adicionadas no início da agitação e na solução final (após filtragem). Foi obtido o valor máximo de adsorção de 158,16 mg kg<sup>-1</sup> e K=0,3766 (energia de ligação).



**Figura 1.** Representação gráfica da CMAP do LVA, com ajustes da curva de adsorção pela equação da isoterma de Langmuir.

A correção química do solo foi realizada por meio da aplicação de solução nutritiva, garantindo que o único nutriente limitante ao desenvolvimento das plantas fosse o P (NOVAIS; NEVES; BARROS, 1991). Os micronutrientes foram adicionados no solo junto com a sementeira e os macronutrientes em três parcelas, a primeira no 4º dia após a germinação, e as demais em intervalos de 7 dias após a primeira. As doses dos nutrientes foram: 125 mg kg<sup>-1</sup> de N [(NH<sub>4</sub>)(NO<sub>3</sub>)]; 150 mg kg<sup>-1</sup> de K (KCl); 40 mg kg<sup>-1</sup> de S [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]; 1,10 mg kg<sup>-1</sup> de Zn (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O); 0,73 mg kg<sup>-1</sup> de Cu (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O).

### 3.2.2. Tratamentos e condução

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo, no período de fevereiro a março de 2016. O plantio foi feito em vasos de 3 kg, com o solo devidamente corrigido de acordo com a análise de solo.

A aplicação das fontes fosfatadas foi realizada em volume total e localizado. O método localizado foi realizado similar a aplicação em campo, a fim de constatar o melhor

método de aplicação do BF, e a reação dele em mistura com o solo. O fertilizante superfosfato triplo (SFT) apresentava 19,9% de P.

Todas unidades experimentais receberam a mesma dose de P de 30 mg kg<sup>-1</sup> (exceto controle negativo, sem adição de P), variando somente a proporção das fontes, SFT e BF de 0 a 100 % de cada, ou seja, uma parte da fonte de P provinha do BF e o restante da fonte solúvel (Tabela 4), totalizando 90 mg vaso<sup>-1</sup>. A escolha da dose total se baseou na CMAP e não na dose recomendada para campo, conforme boletim 100, pois em testes com fertilizantes, dosagens baixas são necessárias para que exista diferenças visuais entre os tratamentos, o que uma dose alta não proporcionaria, pois todos eles estariam supridos de P se igualando na produção de matéria seca e P absorvido.

**Tabela 4.** Tratamentos e doses de SFT e BF.

Tratamento	SFT (%)	BF (%)
T <sub>1</sub>	0	100
T <sub>2</sub>	25	75
T <sub>3</sub>	50	50
T <sub>4</sub>	75	25
T <sub>5</sub>	100	0
T <sub>6</sub>	0	0

A aplicação dos tratamentos em volume localizado foi realizada a cinco centímetros de profundidade e dois centímetros de distância horizontal da semente. Foram semeadas a três centímetros de profundidade 6 sementes de milho híbrido 30F53 da Pioneer. O desbaste foi realizado no sexto e décimo dia após a germinação, com o critério de manter duas plantas com características de altura e número de folhas mediano dentre todas de cada vaso.

Os vasos eram irrigados com água deionizada de 1 a 3 vezes ao dia, variando com a evaporação, mantendo a umidade de 70 % de CMRA. No dia anterior à colheita, toda a parte aérea das plantas foram molhadas para retirada de resíduos e poeira, que poderiam interferir nas análises. A colheita foi realizada no 50º dia após plantio (46 dias após a germinação). O corte da parte aérea foi feito a 2 cm do solo, com o auxílio de tesoura de poda. O material vegetal foi seco em estufa de circulação forçada a 65 °C até peso constante (por 80 horas), depois a parte aérea foi moída em moinho de faca Willey.

### 3.2.3. Determinação de fósforo

Após a moagem do material, amostras homogêneas de 200 mg foram submetidas a digestão ácida com ácido nítrico e perclórico na relação 3:1 (MILLER, 1998). Após, o produto da digestão foi diluído para volume final de 50 mL com água deionizada. O teor de P total no tecido vegetal foi determinado pelo método azul de molibdato em meio reduzido por ácido ascórbico (vitamina C) (BRAGA; DEFELIPO, 1974). Foi utilizado o espectrofotômetro de absorção molecular de microplacas (96 poços) para as leituras, conforme metodologia citada.

### 3.2.4. Fosfatase ácida

Discos de 6 mm de diâmetro foram coletadas das folhas do terço médio das plantas de milho, evitando as nervuras. O material foi colocado em saco plástico vedado, e acondicionados em caixa de isopor com gelo, para manutenção das características do material.

Em laboratório, foram pesadas amostras de 0,1 g e incubadas por 30 min em banho-maria a 30°C com 8 mL de para-nitrofenilfosfato (p-Npp) 250  $\mu\text{mol L}^{-1}$  com tampão de acetado de sódio 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  (pH 4,0). Ao fim do tempo, a reação foi interrompida com a adição de 2 mL de hidróxido de sódio 2  $\text{mol L}^{-1}$ . Foi utilizado o espectrofotômetro de absorção molecular de comprimento de onda de 410 nm para as leituras de absorbância. A atividade da fosfatase ácida foi calculada pela equação 2, e é expressa em  $\mu\text{mol}$  de p-Npp por hora por grama de material fresco (SILVA; BASSO, 1993).

$$Atividade_{(\mu\text{mol P-Npp h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{MF})} = \frac{[leitura \times 8 \text{ ml de p-Npp} \times 10 \times 2]}{1000}$$

Equação 2 - Atividade da fosfatase ácida ( $\mu\text{mol}$  de p-Npp por hora e grama de material fresco)

A determinação dessa atividade enzimática foi usada como ferramenta de diagnose nutricional, prevendo a deficiência de P nas plantas antes do aparecimento dos sintomas visuais, como o arroxamento das folhas mais velhas (BESFORD, 1979).



### 3.2.1. Índice Spad

Determinou-se o índice Spad (*Soil Plant Analysis Development*) na segunda folha mais nova completamente expandida. As medidas foram realizadas no dia anterior à colheita, utilizando o medidor de clorofila portátil Spad (modelo 502), no terço médio com duas medidas espaçadas em 3 cm uma da outra, evitando a nervura.

### 3.3. Experimento 2: Alterações morfológicas de raízes com uso de biofertilizante fosfatado na presença e ausência do fungo *Aspergillus niger*

O experimento 2 foi planejado para verificar a interação do BF contendo o fungo *A. niger* com a planta de milho, e a possível alteração da morfologia de raízes. Seu cultivo ocorreu em tubos tipo rizothrons, preenchidos com areia.

#### 3.3.1. Areia utilizada

A areia utilizada foi adquirida no município de Piracicaba, sendo classificada como areia média. Amostras homogêneas do material foram submetidos a análise química e física (Tabelas 5 e 6). Para a correção química da areia, foi adicionado solução nutritiva isenta de P (NOVAIS; NEVES; BARROS 1991).

**Tabela 5.** Características químicas e físicas da areia utilizada no experimento.

pH	MO	S	K	Ca	Mg	H+Al	Al	SB	CTC
5,1	3	7	<0,9	8	3	13	<2	11,8	24,8
	g dm <sup>-3</sup>	mg dm <sup>-3</sup>				mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>			
V	m	P res	Areia total	Areia grossa	Areia fina	Silte	Argila		
----	%	mg dm <sup>-3</sup>	-----	-----	g kg <sup>-1</sup>	-----	-----		
48	0	17	937	516	421	26	38		

CTC: capacidade de troca catiônica; V: saturação por bases; m: saturação por Al; P res: P extraído por resina; P rem: P remanescente; P Melich-1: P extraído por Melich-1; CMRA: capacidade máxima de retenção de água.

**Tabela 6.** Micronutrientes, silício e sódio presentes na areia utilizada no experimento.

Si	Na	Cu	Fe	Zn	Mn	B
mg kg <sup>-1</sup>				mg dm <sup>-3</sup>		
3	5	0,3	34	0,3	6,4	<0,15

### 3.3.1. Tratamentos e condução

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do departamento de fitotecnia da Esalq/USP, entre março e abril de 2017. Foi utilizado tubos de crescimento tipo rizotron (35 dm<sup>3</sup>), preenchidos com areia para proporcionar o amplo crescimento das raízes e facilitar sua retirada, causando poucos danos. A areia foi corrigida de acordo com a análise de solo. Os tratamentos foram aplicados na dose de 30 mg/kg de P, e eles foram: BF com fungo vivo, BF com fungo morto, superfosfato triplo (19,9% de P) e controle sem P. A mistura foi feita manualmente com enxada em volume total. As coletas das raízes e parte aérea foram divididas em quatro semanas, 7, 14, 21 e 28 dias, iniciando a contagem 7 dias após a germinação. As três primeiras com 3 repetições e a quarta coleta com 5 repetições (Tabela 7).

**Tabela 7.** Tratamentos e doses de superfosfato triplo (SFT) e Biofertilizante fosfatado (BF) no experimento 2.

Tratamento	SFT (%)	BF (%)
1	0	0
2	100	0
3	0	100 com fungo morto
4	0	100 com fungo vivo

A semeadura também foi feita com o milho P30F53 da Pioneer e o plantio realizado a 2 cm de profundidade. O desbaste foi feito no sétimo dia após a germinação, com o critério de deixar apenas uma planta de médio porte. Os tubos foram irrigados com água deionizada mantendo a CMRA de 70%.

A primeira coleta se iniciou 14 dias após germinação. A parte aérea foi cortada a 2 cm do solo, com auxílio da tesoura de poda, já as raízes foram retiradas por lavagem cuidadosa em água corrente, a fim de evitar perdas e danos. Após retirada e limpeza, as raízes foram mantidas em potes de vidro com água até o momento da digitalização. Após as leituras, a parte aérea e as raízes foram secas a 65°C em estufa de circulação forçada até peso constante, para posterior pesagem do material.

### 3.3.2. Raízes: análise morfológica por imagem

As imagens das raízes foram realizadas com uso do *scanner* XL 10000, com resolução de 600 dpi, e a morfologia acessada através do *software* WinRhizo versão 4.1c. No processo de escaneamento as raízes foram dispostas na cubeta (placa acrílica) do equipamento com 600

mL de água (suficiente para cobrir todo o volume de raízes). Não foi necessário nenhum procedimento de coloração para aumento do contraste.

A análise dessas imagens forneceu o volume radicular total, superfície radicular e a classificação do diâmetro de raízes para as mesmas. Foram utilizados os critérios de Bhom (1979) para realização da análise do diâmetro de raízes, onde raízes muito finas apresentam diâmetro inferior a 0,5 mm, raízes finas entre 0,5 e 2 mm, raízes pequenas entre 2 e 5 mm, raízes médias entre 5 e 10 mm, raízes grossas entre 10 e 20 mm e raízes muito grossas apresentam diâmetro superior a 20 mm. A densidade das raízes foi obtida seguindo os critérios de Ryser (1996), em que se faz a divisão da massa de matéria seca total das raízes pelo volume total da mesma.

### **3.4. Análise estatística**

Todos os dados foram submetidos a análise de variância e as médias de tratamentos foram comparadas com o teste Fisher LSD, ao nível de 5 % de significância. Foi utilizado o programa estatístico SAS® “Statistical Analysis System” (SAS INSTITUTE, 1996).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Experimento 1: Eficiência do biofertilizante fosfatado como substituinte parcial na nutrição de milho

#### 4.1.1. Conteúdo e Biomassa vegetal

A análise de variância (ANOVA) mostrou dependência entre as variáveis. Portanto, foi realizado o desdobramento das interações para avaliação de cada tratamento aplicado de forma localizada e em volume total de solo (Tabela 8).

**Tabela 8.** Produção de biomassa seca (g) e conteúdo acumulado de P (mg/vaso) na parte aérea de plantas de milho para a interação da proporção misturada dos fertilizantes (totalizando a dose de P aplicada de 30 mg kg<sup>-1</sup>) superfosfato triplo (SFT) e biofertilizante (BF) e o método de aplicação (localizada ou em volume total).

Proporção dos fertilizantes (%)		Biomassa (g/vaso)		Conteúdo de P (mg/vaso)	
SFT	BF	Localizada	Volume Total	Localizada	Volume Total
0	100	8,4 B d	14,4 A d	81,6 B d	146,2 A d
25	75	23,9 B c	29,2 A c	222,6 A c	273,7 A c
50	50	36,6 A b	35,7 A b	327,3 A b	328,1 A b
75	25	39,0 A b	39,3 A b	342,6 A b	355,6 A b
100	0	48,2 A a	44,2 A a	444,1 A a	401,0 B a
0	0	4,7 A e	4,7 A e	43,3 A e	44,4 A e

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas na horizontal (linhas) e médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical (colunas) não diferem significativamente pelo teste LSD, ao nível de 5%.

A forma de aplicação dos tratamentos foi indiferente para a produção da biomassa vegetal, exceto para o biofertilizante quando aplicado isoladamente (100%) ou quando representa 75% do total de P aplicado (75% BF + 25% SFT). Já para o conteúdo de P no tecido vegetal, somente o tratamento com aplicação total da dose de fósforo advindo do BF apresentou valores menores para a aplicação localizada. Já o SFT aplicado na dose de 100% proporcionou valor menor para a aplicação em volume total. Essa característica observada no tratamento com o SFT já era esperada, pois sua elevada e rápida dissolução satura a solução do solo, proporcionando aumento da adsorção nas partículas do solo.

Quanto à proporção de substituição do SFT pelo BF, independentemente do método de aplicação, foi observado igual comportamento das misturas de fertilizantes para produção de biomassa e conteúdo de P na parte aérea das plantas de milho. O SFT foi superior ao BF para

ambas variáveis analisadas nas duas formas de aplicação dos fertilizantes e suas misturas. No entanto, as plantas que receberam a substituição parcial do SFT por 25 e 50% de BF tiveram sua biomassa igual a 81 e 76% do rendimento do SFT em aplicação localizada e 89 e 81% em aplicação em volume total, respectivamente (Tabela 9). Isso implica que o produtor poderia substituir parte do SFT por BF em situações em que não é possível aplicar o total de P na forma de SFT, ou que o incremento de MO seja necessário.

Em cultivo de milho com alta tecnologia, a adubação fosfatada representa uma parte considerável dos gastos com correção e adubação do solo, que são em média 41% das despesas com insumos para o centro-sul do Brasil (IMEA, 2015). Apesar que a exigência de milho a fósforo seja menor que para nitrogênio e potássio, as doses recomendadas são normalmente altas, devido ao aproveitamento do nutriente pela cultura. Levando em consideração que o milho transloca de 77 a 86 % do conteúdo de fósforo acumulado para os grãos (COELHO; 2006), quase todo P extraído pela planta é retirado da área de plantio. Portanto, a substituição parcial do SFT é interessante para reduzir os custos da produção, já que o seu rendimento é apenas 10,98 % e 11,33 % menor que o SFT na produção de biomassa e o conteúdo de P com aplicação em volume total, respectivamente (tabela 9). Ainda, é provável que haja solubilização do fosfato de rocha nos cultivos subsequentes, algo menos provável com o P proveniente do superfosfato triplo, o qual ficaria mais fortemente fixado com o passar do tempo, como observado na tabela 8, em que a aplicação de P em volume total apresentou menor conteúdo, provavelmente devido fixação.

**Tabela 9.** Rendimento em relação ao SFT (%).

Proporção dos fertilizantes (%)		Biomassa		Conteúdo de P	
SFT	BF	Localizada	Volume Total	Localizada	Volume Total
0	100	17,45	32,47	18,37	36,46
25	75	49,52	66,08	50,12	68,24
50	50	76,00	80,86	73,69	81,81
75	25	80,87	89,02	77,14	88,67
100	0	100,00	100,00	100,00	100,00
0	0	9,69	10,64	9,76	11,08

A pesar da baixa solubilidade de fosfatos de rocha, Resende et al. (2006) observaram a tendência de nivelamento das respostas acumuladas após três anos de safra de milho com a aplicação de fosfato de rocha de Araxá (FRA) comparado ao SFT, termofosfato (TF) e fosfato de rocha reativo (FRR), para aplicação a lanço e sulco de plantio. Isso confirma que apesar do

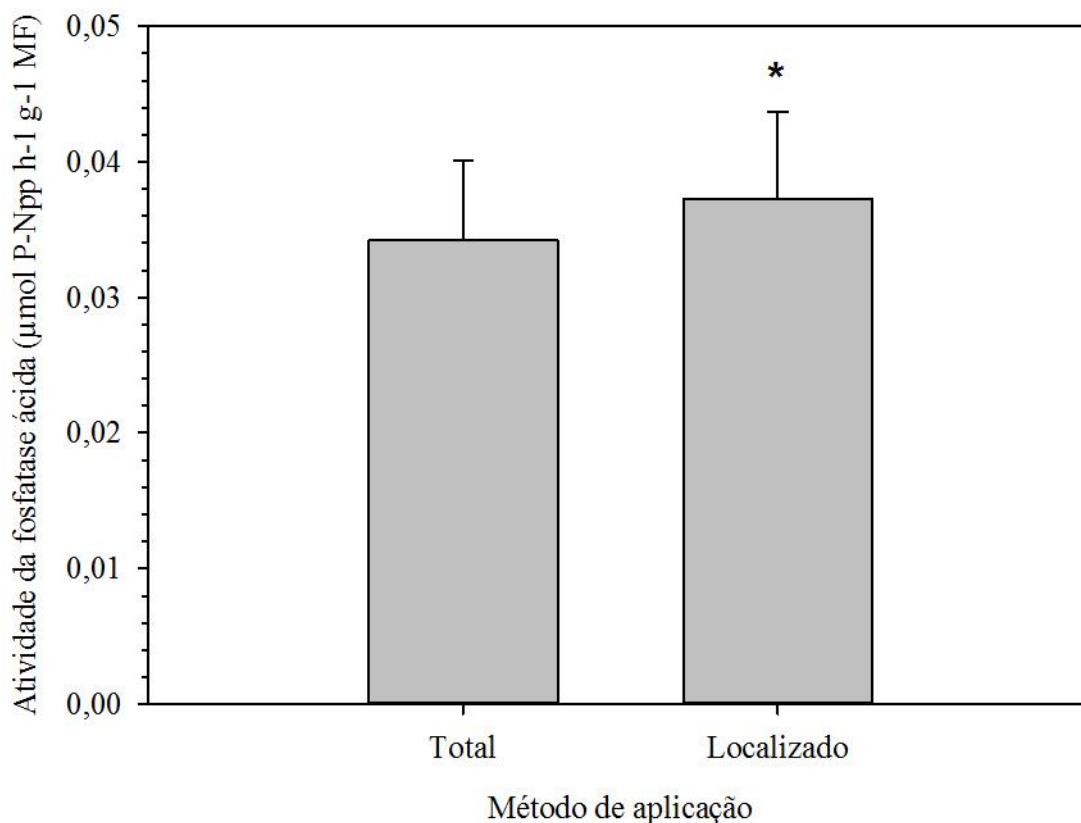
maior ganho de produtividade das fontes mais solúveis, o FRA e FRR tem efeito residual prolongado, que compensa a defasagem dos primeiros anos. Ele também constatou que a relação custo /benefício do fosfato de Araxá é 49,45% maior que o SFT, e sua eficiência agrônômica após três anos de cultivo representa 79% da adubação feita com SFT, com um residual igual ao SFT e as demais fontes testadas, indicando assim que experimentações de longa duração são mais responsivas para a adição de fosfatos de rocha de baixa reatividade e solubilidade no solo.

Uma das hipóteses que o BF não se apresentou tão viável em seu uso isolado ou com a substituição do SFT em 75%, seria o curto período de cultivo, pois o fungo parece não ter apresentado solubilização rápida o suficiente para suprir a demanda inicial da cultura, além da baixa solubilidade do fosfato de rocha utilizado. Entretanto, a adição do BF no solo, além de ser uma fonte de P e carrear um agente solubilizador, ele adiciona MO na forma de resíduos e *biochar* ao solo. O incremento de MO pode aumentar a carga líquida negativa na superfície do solo, ou reduzir o ponto de carga zero, diminuindo assim, a energia de adsorção do P nas partículas do solo (LOPEZ-HERNANDEZ; SIEGERT; RODRIGUEZ, 1986; ERICH; FITZGERALD; PORTER, 2002). Radicais aniônicos (como ácido carboxílico e grupos fenólicos) gerados na superfície de compostos orgânicos competem com ânions fosfato por sítios de adsorção presentes nos minerais do solo (SIBANDA; YOUNG, 1986). A MO também altera a estrutura dos microagregados, reduzindo a área superficial das partículas, propiciando o aumento da concentração de P na solução do solo (LINQUIST; SINGLETON; CASSMAN, 1997).

Como as proporções de substituição do SFT mais promissoras (50 e 75% de BF) não se diferenciaram quanto ao método de aplicação, seu uso em campo não acarretaria na adição de outra etapa na preparação do solo, pois poderia ser feita a lanço com revolvimento ou em suco de plantio, variando de acordo com os implementos disponíveis. O BF poderia ser uma alternativa viável para produtores com limitação de recursos, onde a substituição de 50% do SFT por BF resulta no mesmo aporte de P às plantas, porém metade da adubação possuindo maior solubilidade e a outra metade de liberação mais lenta. Apesar da menor produção no primeiro ano, espera-se maior eficiência a longo prazo, uma vez que o BF é de menor custo energético e proporciona ganho pela adição de material orgânico. Com isso, o uso de BF é justificado e apresenta potencial na recuperação de solos degradados e em áreas com baixa aplicação de recursos, como é o caso de pastagens.

#### 4.1.2. Atividade da fosfatase ácida

A medida da atividade da fosfatase ácida mostrou diferença no método de aplicação dos tratamentos, sendo a aplicação em volume total mais eficiente na nutrição de plantas de milho (Figura 2). A atividade da fosfatase ácida se correlaciona inversamente com a disponibilidade de P às plantas (SILVA; BASSO, 1993), ou seja, menores teores de P disponíveis no solo fazem com que as plantas apresentem maior atividade da fosfatase ácida no tecido vegetal (GARCIA; ASCENCIO, 1992). Isso ocorre porque a enzima catalisa a hidrólise de fosfatos monoésteres orgânicos do solo ou das folhas senescentes, liberando fosfato inorgânico a ser utilizado em tecidos mais novos ou em outras atividades metabólicas importantes (SNAPP; LYNCH, 1996).

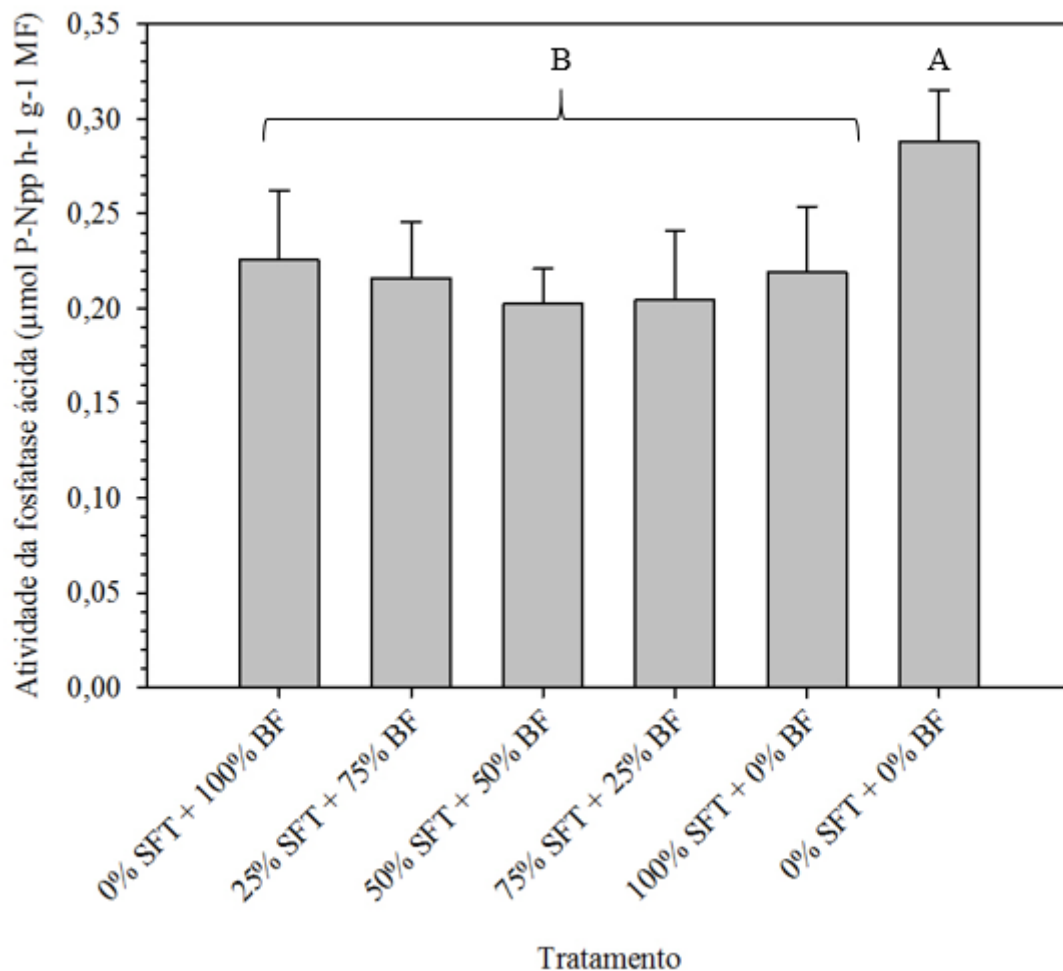


**Figura 2.** Média da atividade da fosfatase ácida para o modo de aplicação.

Como os vasos possuem volume limitado, as raízes ocuparam praticamente todo o volume, ficando mais provável a absorção de P pelas raízes quando o fertilizante é aplicado em volume total. Além de aumentar a interceptação radicular, um maior número de zonas torna o P passível de absorção em quantidades maiores.

Novais et al. (1985), em estudo com fontes de fertilizantes fosfatados em vaso, observaram o crescimento radicular direcionado com a aplicação localizada de P no solo, indicando a aplicação em volume total do vaso. Pois, como a absorção de P se dá em boa parte pela interceptação radicular, Anghinoni e Barber (1980) verificaram que o máximo volume de solo explorado proporciona a planta maior área de absorção e conseqüentemente aumento do conteúdo de P no tecido vegetal.

Não houve interação do método de aplicação dos fertilizantes, mas foi observada alteração da atividade da fosfatase ácida para as misturas de fertilizantes (Figura 3), somente o tratamento 0 % SFT + 0% BF apresentou atividade significativamente maior que os demais. Isso confirma os resultados dos estudos citados a respeito do aumento da atividade da enzima fosfatase em resposta a menores teores de P no solo.



**Figura 3.** Tratamentos dos métodos de aplicação da atividade da fosfatase ácida.



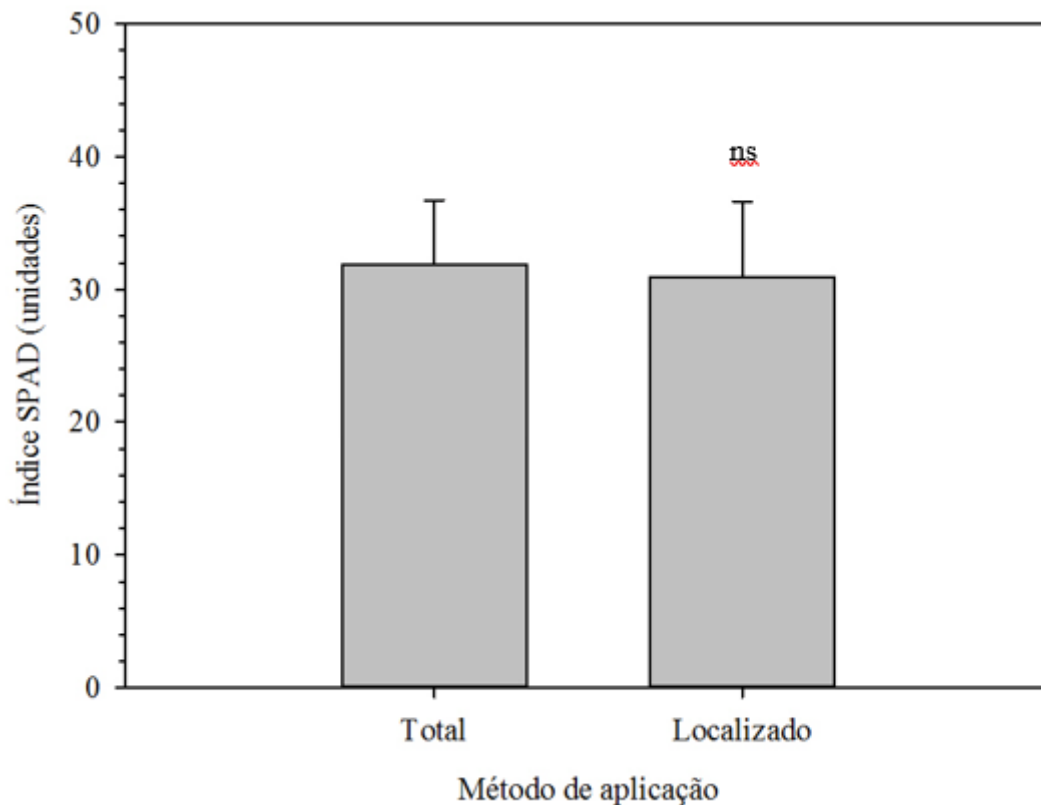
### 4.1.3. Índice Spad

O índice Spad é uma medida que proporciona relações indiretas ao estado nutricional da planta, e é feito no campo de maneira não destrutiva. O aparelho é um clorofilômetro que quantifica a intensidade de luz de 650 nm que é refletida pela folha. Muitos trabalhos relacionam essa medida ao estado nutricional do nitrogênio (N), devido ao fato de 70% desse nutriente estar nos cloroplastos (MARENCO; LOPES, 2005). Por apresentar resultados com correlação positiva para o milho, ele pode ser usado como indicador do rendimento de grãos, entretanto deve ser feito nos estágios finais de desenvolvimento da cultura (ARGENTA et al., 2001).

Apesar do Spad se relacionar mais intensamente ao estado nutricional de N da planta, a deficiência de P reduz a fotossíntese, pois ele é essencial na translocação do triose-fosfato para o citosol, formada durante a assimilação de carbono. Sem esse movimento, ocorre o acúmulo de amido nos cloroplastos, reduzindo a fotossíntese, e por consequência, alterando a coloração foliar (WALKER, 1980). Assim, plantas com menor acúmulo de P, como ocorrido nos tratamentos com aumento da dose de BF, podem vir a ter menor absorção de N.

A interdependência da absorção de N ao P também foi observada por Alves, Novais e Oliveira (1996) e Magalhães (1995), que concluíram com estudo do particionamento de raízes e omissão de P em solução nutritiva, que plantas de milho supridas com doses adequadas de N (nitrato) mas restringidas por 10 dias da presença de P em solução nutritiva causava a redução de 34 a 38 % de N total no tecido foliar. Resultado semelhante da interdependência da absorção de N quando expostas a deficiência temporária ou não de P foi observado em plantas de tabaco, arroz, braquiária e tomate (RUFTY et al., 1990, DE GROOT; MARCELIS; VAN DEN BOOGAARD, 2003; NANAMORI et al. 2004).

O tratamento controle e o tratamento com 100% BF + 0% SFT apresentaram resultados equivalentes para o índice Spad (Figura 5), evidenciando que a interdependência do N ao P, pois somente o controle não tinha adição de P no solo.

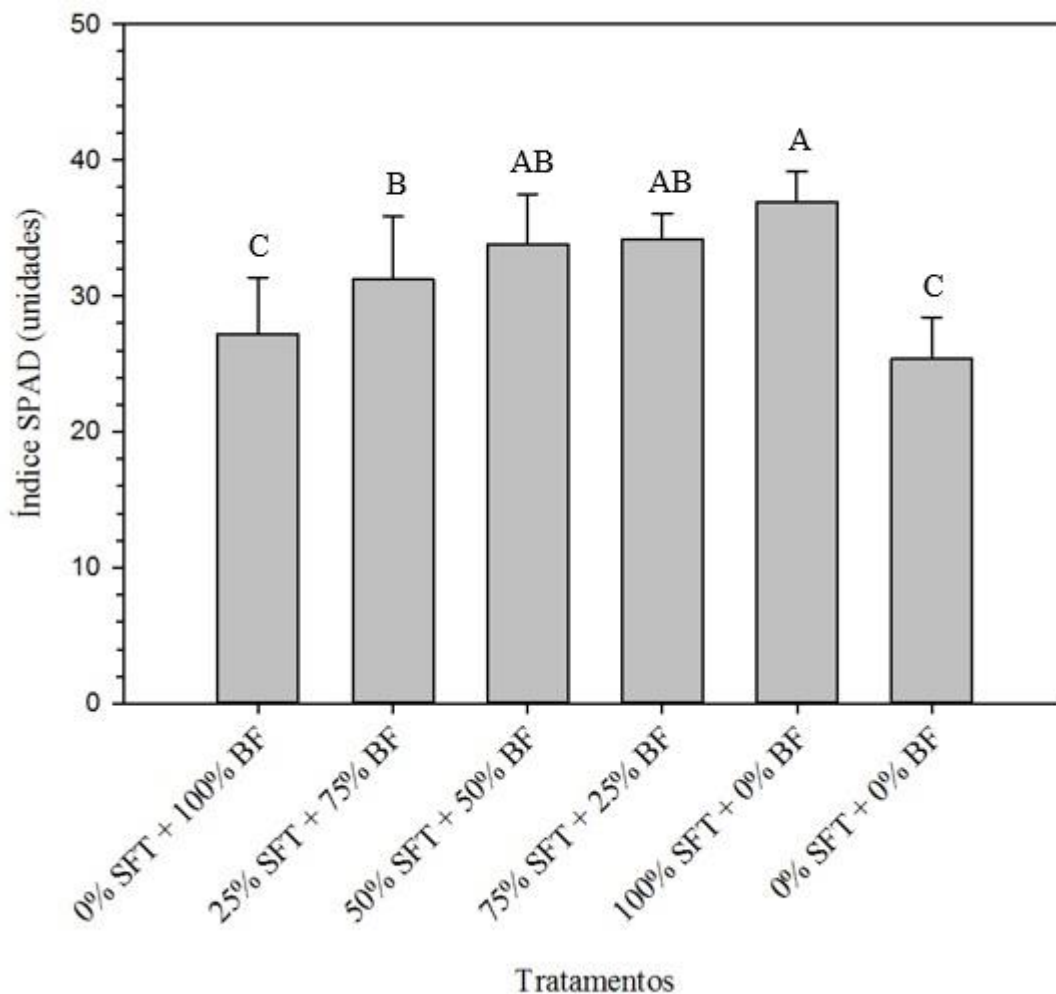


**Figura 4.** Média do índice Spad pelo modo de aplicação, ns= não significativo.

O resultado apresentado na Figura 5 mostra que o aumento da dose de BF na mistura dos fertilizantes reduziu as leituras no Spad, provavelmente pelo aumento da quantidade de fósforo insolúvel.

No entanto, um possível efeito de imobilização não é proveniente do *A. niger*, pois em estudos conduzidos por Mendes et al. (2012), o fungo apresentou relação negativa na solubilização do FR quando adicionado sulfato de amônio na fermentação, e que a dose de N proveniente do bagaço-de-cana utilizado na produção do BF era três vezes maior que a necessidade para produção de ácido cítrico descrito por Ikram et al. (2005).

Contudo, o índice Spad, mesmo sendo uma medida indireta, fornece informações importantes sobre a eficácia de fertilizantes fosfatados contendo material orgânico uma vez que há dependência entre a absorção de N e P. O índice Spad nesse caso foi mais sensível para diferenciar os tratamentos do que a atividade da fosfatase ácida, a qual mostrou apenas diferença dos tratamentos com o controle.



**Figura 5.** Média dos tratamentos do experimento 1 para o índice Spad.

#### **4.2. Experimento 2: Análise morfológica de raízes de milho recebendo biofertilizante fosfatado com e sem o fungo *Aspergillus niger***

O experimento 2 foi planejado para verificar a interação do BF contendo o fungo *A. niger* com planta de milho, e a possível alteração da morfologia de raízes. O cultivo foi feito em tubos tipo rizothrons, preenchidos com areia.

##### **4.2.1. Matéria seca da parte aérea e raiz**

A Figura 6 mostra a evolução da produção de matéria seca de raízes (R) e parte aérea (PA) em 4 semanas de coleta. O tratamento com a aplicação do SFT (controle positivo) se apresentou superior aos demais na quarta semana de coleta na produção matéria seca da parte aérea, entretanto, igual aos demais na produção de matéria seca de raízes.

As plantas que receberam os tratamentos do controle negativo, a adição do BF vivo e BF morto, apresentaram subcrescimento da parte aérea e radicular, diferenciando do tratamento com SFT a partir da segunda semana de coleta. Mollier e Pellerin, (1999) observaram que o efeito expansivo das raízes devido a deficiência de P ocorre somente nos estágios iniciais de plantas de milho, pois a redução de folhas, causada pelo direcionamento metabólico, gera a redução da fotossíntese devido a redução da área fotossintética, que restringe globalmente a produção de carboidratos.

Além dessa redução foliar, a deficiência de P causa um aumento de 30 a 40% do aerênquima radicular em relação ao córtex, causando a redução do transporte de água, diminuindo a aquisição de outros nutrientes (FAN et al., 2007). Esse aumento é uma possível causa da redução do peso do material vegetal seco de raízes (Figura 6b), pois há aumento de células radiculares preenchidas com ar.

A presença de sintomas de subcrescimento causado por insuficiência de P evidencia a importância do P no metabolismo das plantas, fotossíntese e respiração (WHITE et al., 2005). O curto período de tempo do experimento e a baixa quantidade de BF aplicada podem ter dificultado a detecção de diferenças nos tratamentos com a presença do fungo vivo e morto. Como a dose de P foi baseada no P total do BF, e não somente no P solúvel, o fungo não foi capaz de solubilizar na velocidade adequada para suprir a elevada demanda de P nos estágios iniciais de estabelecimento do milho.

A densidade radicular (DR) foi de  $0,415 \text{ g cm}^{-3}$  para o controle negativo (sem adição de P);  $0,022 \text{ g cm}^{-3}$  para o controle positivo;  $0,404 \text{ g cm}^{-3}$  para a aplicação de BF com fungo morto e  $0,353 \text{ g cm}^{-3}$  para a aplicação de BF com vivo.

Essa diferenciação da DR de acordo com o P disponível, foi observada por Richardson et al. (2009) e Vance et al. (2003), que verificaram que uma das estratégias das plantas para melhorar a capacidade de absorção de P são o ajuste do metabolismo e adaptação morfológica das raízes, pois a alocação de carbono nas raízes, principalmente em raízes finas, aumenta o volume e área explorada. Esse aumento pode resultar na redução da parte aérea, por consequência, o aumento da DR (MARSCHNER, 1995).

#### **4.2.2. Área projetada, volume e classificação de diâmetro de raízes**

Não houve diferença estatística entre os tratamentos avaliados quanto a aplicação do BF com o fungo vivo e morto (Figura 7) para os parâmetros morfológicos de área projetada e

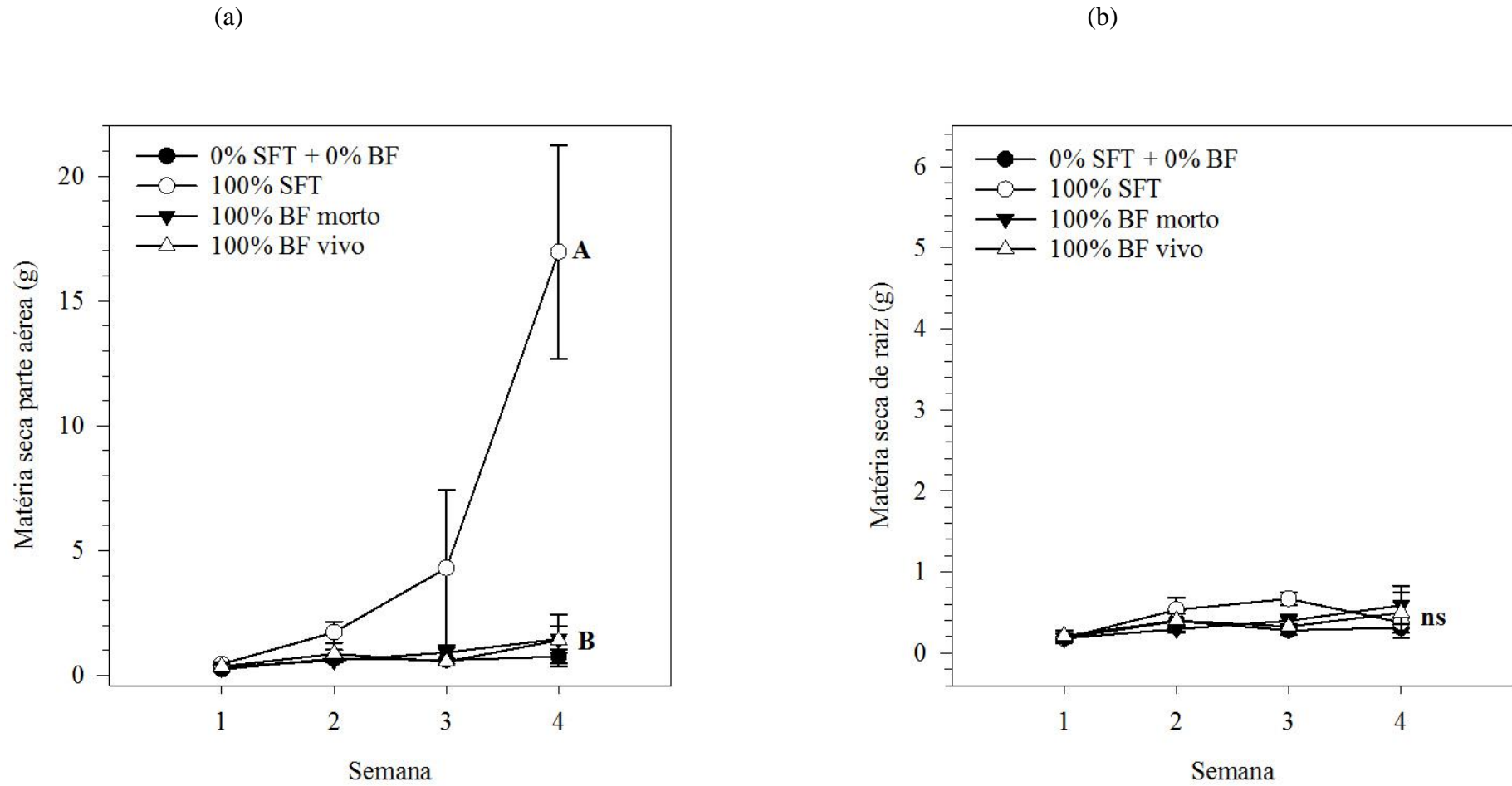
volume radicular. No entanto, o tratamento que continha somente a aplicação do SFT mostrou melhores resultados para os parâmetros avaliados comparado aos demais tratamentos.

O aumento do volume radicular, que proporciona ganho da área projetada, é um indicativo da adição de raízes finas. Essa adição é uma estratégia de adaptação radicular para driblar a deficiência de P, pois esse aumento proporciona maior capacidade de absorção de P por interceptação radicular (HAMMOND et al., 2009). No entanto, a presença do fungo no BF não causou alterações morfológicas na adição de raízes finas comparado o BF com fungo morto, mas a proporção dessas ao total de raízes produzidas foi maior que no SFT (Figura 8), que apresentou maior volume radicular e área projetada, devido ao suprimento de P solúvel na dose adequada para o desenvolvimento inicial da planta.

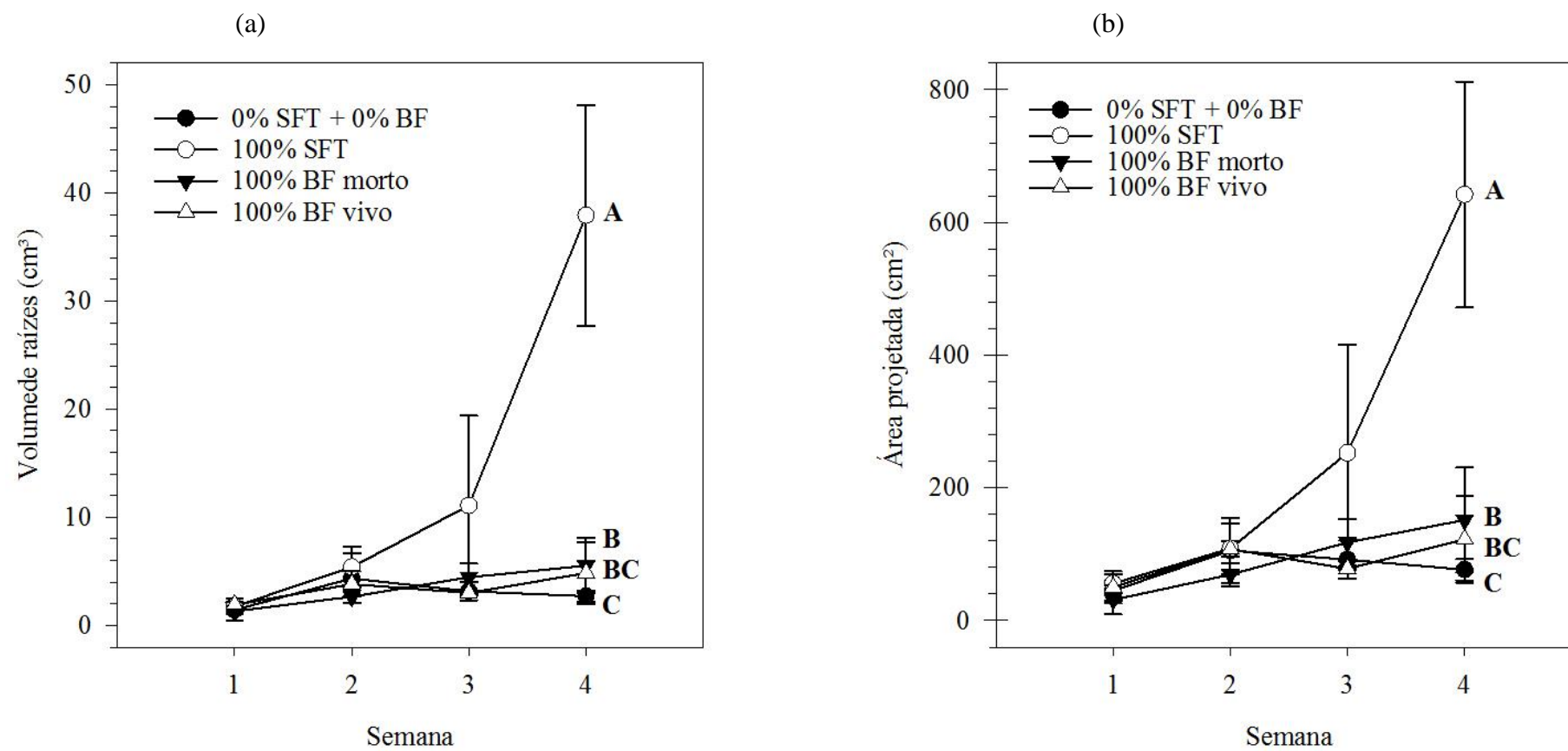
A classificação em classes do diâmetro das raízes (mm) não apresentou diferença estatística entre os tratamentos com aplicação de BF na quarta semana de coleta (Figura 8), sugerindo que o milho não apresentou uma grande plasticidade radicular aos baixos teores de P solúvel no solo na presença do fungo vivo para a quarta semana.

O aumento no tempo de avaliação do estudo da interação de raízes com *A. niger* pode ser sugerido para experimentos futuros, pois a retomada do aumento do crescimento radicular na quarta semana de coleta do BF-fungo vivo, após ligeira queda na terceira semana, sugere uma contribuição positiva do fungo no crescimento de raízes, que provavelmente não se diferenciou estatisticamente pelo curto período de cultivo.

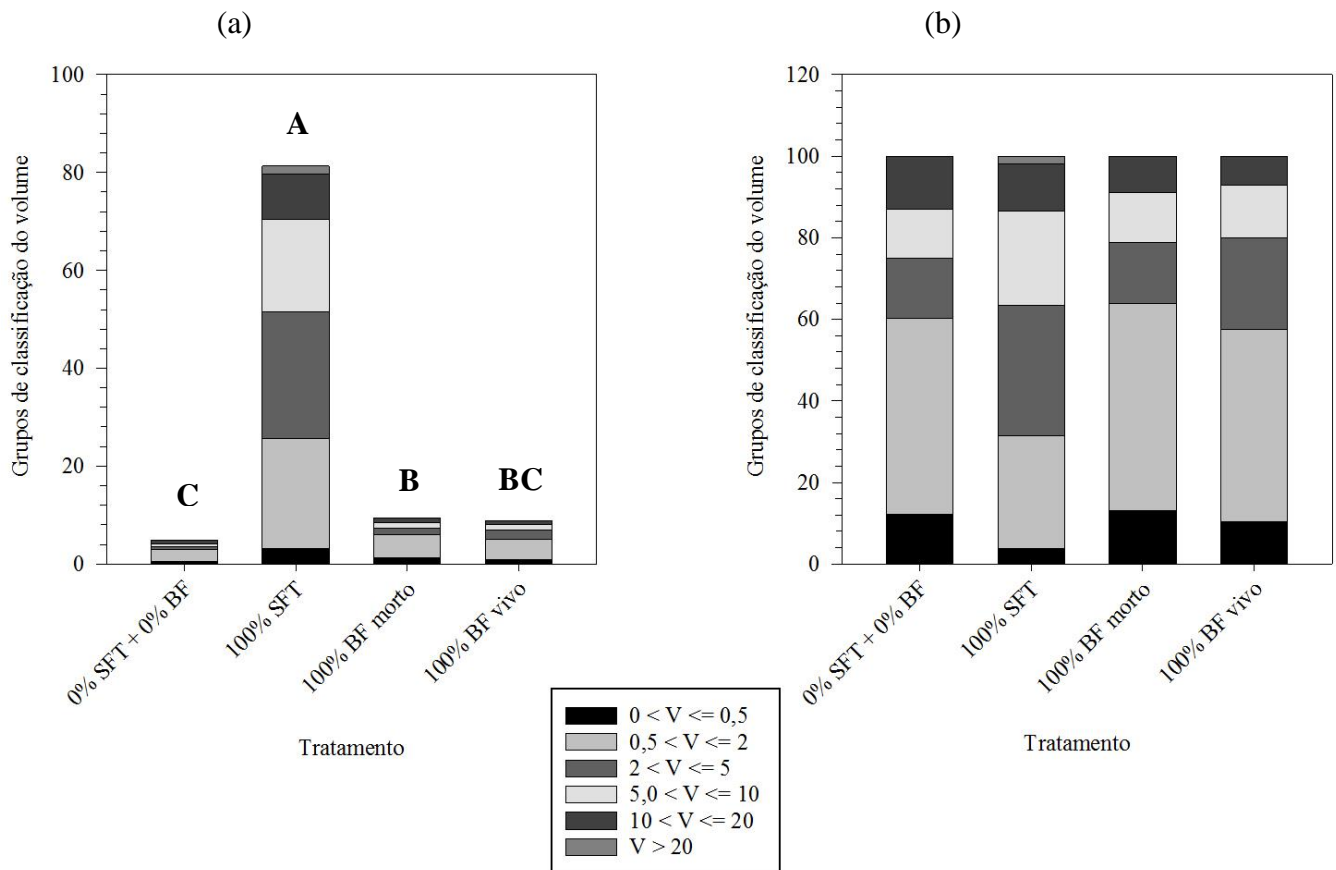
Somado a todos resultados anteriores, também seria interessante fazer a utilização do P solúvel do BF nos cálculos de adubação quando o mesmo é aplicado isoladamente, pois a velocidade de solubilização do FR se apresentou inferior a adequada para as plantas. Uma adaptação no processo de fermentação, que viesse a oferecer mais P solúvel nos estágios iniciais de desenvolvimento da planta é de grande valia. A adição de fosfato de rocha reativo é cotada, pois poderia vir a suprir essa deficiência encontrada, e principalmente, porque ele não exige a intervenção química industrial para solubilização do P da rocha.



**Figura 6.** Evolução da produção de matéria para as quatro semanas de coleta (a) parte aérea (b) matéria seca de raiz



**Figura 7.** Evolução da produção para as quatro semanas do (a) volume de raízes e (b) área projetada.



**Figura 8.** Grupos de classificação de diâmetros de raízes, (a) dados originais (b) dados considerados no volume total de raízes produzidas por cada tratamento, em mm.

### 4.3. Considerações finais

Ainda é necessário mais estudo da produção do BF, como também adaptações na produção para o aumento do potencial nutricional de plantas de milho nos estágios iniciais de desenvolvimento da cultura.

Experimentos com cultivos sucessivos poderiam ser utilizados para dar suporte na avaliação do BF com efeito residual, já que vários estudos há o aumento do desempenho de fontes menos solúveis de fósforo.

Avaliações superiores a 28 dias irão assegurar uma melhor avaliação do efeito do fungo na morfologia e crescimento de raízes de milho.





## 5. CONCLUSÕES

O biofertilizante pode substituir o SFT em até 50% da dose, com perdas de cerca de 20% da produção de MS e conteúdo de P. Isso o torna importante para um futuro próximo, em que haverá escassez das minas de rochas solúveis, proporcionando um melhor uso das rochas de baixa solubilidade.

Para a dose de substituição do STF pelo BF em até 50 % o modo de aplicação é indiferente, proporcionando maior flexibilidade de aplicação ao produtor de acordo com os equipamentos disponíveis.

No experimento 2 não houve alterações morfológicas de raízes com a presença do fungo *A. niger*, no período avaliado.



## REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, V.H.; NOVAIS, R.F.; DIAS, L.E.; OLIVEIRA, J.A. Determinação e uso do fósforo remanescente. **Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, v.25, p.27-32, 2000.
- ALVES, V.M.C.; NOVAIS, R.F.; OLIVEIRA, M.F.G. Efeito da omissão de fósforo na absorção de nitrogênio por híbridos de milho (*Zea mays* L.). **Revista Ceres**, v.43, p.435-443, 1996.
- ANGHINONI, I.; BARBER, S.A. Phosphorus influx and growth characteristics of corn roots as influenced by phosphorus supply. **Agronomy Journal**, v.72, p.685-688, 1980.
- ARGENTA, G.; SILVA, P.R.F.; BORTOLINI, C.G. Teor de clorofila na folha como indicador do nível de N em cereais. **Ciência Rural**, v.31, n.3, p.715-722, 2001.
- BESFORD, R.T. Phosphorus nutrition and acid phosphatase activity in the leaves of seven plant species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.30, n.3, p.281-285, 1979.
- BHOM, W. Methods on studying root systems. New York: Spring-Verlag, 1979, 189p.
- BRAGA, J.M.; DEFELIPO, B.V. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solo e material vegetal. **Revista Ceres**, v.21, p.73-85, 1974.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes e corretivos. Brasília, 2007, 227 p.
- COELHO, A.M. **Nutrição e Adubação do Milho**. Sete Lagoas, Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnico 78, 2006, 10p.
- COELHO, A.M.; RESENDE, A.V.R. Exigências nutricionais e adubação do milho safrinha. Embrapa Milho e Sorgo, Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnico, Sete Lagoas, v.11, 2008, 10p.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Grãos, Safra 2017/18 - Primeiro levantamento, Brasília, v.5 p.1-114, 2017. Disponível em: <http://conab.gov.br>. Acesso em: 29 outubro 2017.
- CUNHA, J.F.; CASARIN, V.; PROCHNOW, L.I. *Balanço de nutrientes na agricultura brasileira no período de 1988 a 2010*. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n.135, p.1-11, 2011.
- DE GROOT, C.C.; MARCELIS, L.F.M.; VAN DEN BOOGAARD, R. Interactions of nitrogen and phosphorus nutrition in determining growth. **Plant and Soil**, v.248, p.257-268, 2003.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2013. 353p.

ERICH, M.S.; FITZGERALD, C.B.; PORTER, G.A. The effect of organic amendments on phosphorus chemistry in a potato cropping system. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.88, p.79-88, 2002.

FAN, M.; BAI, R.; ZHAO, X.; ZHANG, J. Aerenchyma formed under phosphorus deficiency contributes to the reduced root hydraulic conductivity in maize roots. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.49, p.598-604, 2007.

FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. Produção de milho. 2. ed. Guaíba: **Agropecuária**, 2004, 360p.

GARCIA, M.; ASCENCIO, J. Root morphology and acid phosphatase activity in tomato plants during development of and recovery from phosphorus stress. **Journal Plant Nutrition**, v.15, p.2491-2503, 1992.

GUPPY, C.N.; MENZIES, N.W.; MOODY, P.W.; BLAMEY, F.P.C. Competitive sorption reactions between phosphorus and organic matter in soil: a review. **Soil Research**, v.43, n.2, p.189-202, 2005.

HAMMOND, J.P.; BROADLEY, M.R.; WHITE, P.J.; KING, G.J.; BOWEN, H.C.; HAYDEN, R.; MEACHAM, M.C.; MEAD, A.; OVERS, T.; SPRACKLEN, W.P.; GREENWOOD, D.J. Shoot yield drives phosphorus use efficiency in *Brassica oleracea* and correlates with root architecture traits. **Journal of Experimental Botany**, v.60, p.1953-1968, 2009.

IKRAM, U.L.H.; ALI, S.; QADEER, M.A.; IQBAL, J. Optimization of nitrogen for enhanced citric acid productivity by a 2-deoxy Dglucose resistant culture of *Aspergillus niger* NGd-280. **Bioresource Technology**, v.96, p.645-648, 2005.

IMEA, 2015. Disponível em:[http://www.imea.com.br/upload/publicacoes/arquivos/R410\\_CPMilho\\_01\\_2015.pdf](http://www.imea.com.br/upload/publicacoes/arquivos/R410_CPMilho_01_2015.pdf). Acesso em: 6 Nov. 2017.

INSTITUTE, S.A.S. SAS user's guide: statistics. **Version 5th Edition. SAS Institute Inc., Cary, NC**, 1996.

LINQUIST, B.A.; SINGLETON, P.W.; CASSMAN, K.G. Inorganic and organic phosphorus dynamics during a buildup decline of available phosphorus in an Ultisol. **Soil Science**, v.162, p.254-264, 1997.

LOBO, M.G.; SILVA, R.M. Produção de fertilizantes fosfatados. In: Simpósio sobre Fertilizantes na Agricultura Brasileira, 1984, Brasília. **Anais**. Brasília: EMBRAPA, p.73-102, 1984.

LOPEZ-HERNANDEZ, D.; SIEGERT, G.; RODRIGUEZ, J.V. Competitive adsorption of phosphate with maleate and oxalate by tropical soils. **Soil Science Society of America Journal**, v.50, p.1460-1462, 1986.

MAGALHÃES, J.V.; ALVES, V.M.C.; NOVAIS, R.F.; MOSQUIM, P.R. Absorção de nitrato por plantas de milho (*Zea mays* L.) submetidas a períodos crescentes de omissão de fósforo na solução nutritiva. In: Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 5., Lavras, 1995. Anais. Lavras, Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, 1995, p.269.

MARENCO, R.A.; LOPES, N.F. **Fisiologia Vegetal**: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral. 2. ed. Viçosa, 2005, 439p.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition in plants**. San Diego: Academic, 889p. 1995.

MATIAS, G.C.S. Eficiência agrônômica de fertilizantes fosfatados em solos com diferentes capacidades de adsorção de fósforo e teores de matéria orgânica. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MENDES, G.O.; DIAS, C.A.; SILVA, R.I.; RIBEIRO, J.I.; PEREIRA, O.L.; COSTA, M.D. Fungal rock phosphate solubilization using sugarcane bagasse. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 43-50, 2012

MENDES, G.O.; FREITAS, A.L.M.; PEREIRA, O.L.; SILVA, R.I.; VASSILEY, B.N.; COSTA, D.M. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. **Annals of Microbiology**, v.64, n.1, p.239-249, 2014.

MENDES, G.O.; SILVA, N.M.R.M.; ANASTÁCIO, T.C.; VASSILEV, N.B.; RIBEIRO JÚNIOR, J.I.; COSTA, M.D. Optimization of *Aspergillus niger* rock phosphate solubilization in solid-state fermentation and use of the resulting product as a P fertilizer. **Microbial Technology**, Viçosa, p.10, 2015.

MILLER, R.O. Nitric-perchloric acid wet digestion in an open vessel. In **Handbook of Reference Methods for Plant Analysis**. KALRA, Y.P. (Ed.). Boca Raton, FL, USA: CRC Press, p.57-61, 1998.

MOLLIER, A.; PELLERIN, S. Maize root system growth and development as influenced by phosphorus deficiency. **Journal of Experimental Botany**, v.50, p.487-497, 1999.

NANAMORI, M.; SHINANO, T.; WASAKI, J.; UAMAMURA, T.; RAO, M.I.; OSAKI, M. Low phosphorus tolerance mechanisms; phosphorus recycling and photosynthate partitioning in the tropical forage grass *Brachiaria* hybrid cultivar Mulato compared with rice. **Plant and Cell Physiology**, v.45, p.460-469, 2004.

NOVAIS, R.F.; FERREIRA, R.P.; NEVES, J.C.L.; BARROS, N.F. Absorção de fósforo e crescimento do milho com sistema radicular parcialmente exposto à fonte de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.20, p.749-754, 1985.

NOVAIS, R.F.; NEVES, J.C.L.; BARROS, N.F. Ensaio em ambiente controlado, In **Métodos de pesquisa em fertilidade do solo**. Embrapa, Brasília, p.189-254, 1991.

NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 399p.

PARFITT, R.L. Phosphate reactions with natural allophane, ferrihydrite and goethite. **Journal of Soil Science**, v.40, p.359-369, 1989.

RESENDE, A.V.; FURTINI, N.A.E.; ALVES, V.M.C.; MUNIZ, J.A.; CURI, N.; FAQUIN, V.; KIMPORA, D.I.; SANTOS, J.Z.L.; CARNEIRO, L.F. Fontes e modos de aplicação de fósforo para o milho em solo cultivado da região do cerrado. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.30, p.453-466, 2006.

RICHARDSON, A.E.; BAREA, J.M.; MCNEILL, A.M.; PRIGENT-COMBARET, C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and Soil**, v.321, n.1-2, p.305-339, 2009.

RIEDER, J.H. Destinação racional dos jazimentos fosfáticos nacionais. **Encontro Nacional de Rochas Fosfatadas**, v.3, p.139-170, 1986.

RUFTY, T.W.; MACKOWN, C.T.; ISRAEL, D.W. Phosphorus stress effects on assimilation of nitrate. **Plant Physiology**, v.94, p.328-333, 1990.

RUNGE-METZGER, A. Closing the cycle: obstacles to efficient P management for improved global food security. **Scope-Scientific Committee on Problems of the Environment International Council of Scientific Unions**, Chichester: j. Wiley, v.54, p.27-42, 1995.

RYSER, P. The importance of tissue density for growth and life span of leaves and roots: a comparison of five ecologically contrasting grasses. **Functional Ecology**, v.10, p.717-723, 1996.

SIBANDA, H.M.; YOUNG, S.D. Competitive adsorption of humus acids and phosphate on goethite, gibbsite and two tropical soils. **European Journal of Soil Science**, v.37, p.197-204. 1986.

SILVA, F.C.; BASSO, L.C. Avaliação da atividade *in vivo* da fosfatase ácida da folha na diagnose da nutrição fosfórica em cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.17, p.371-375, 1993.

SNAPP, S.; LYNCH, J.P. Phosphorus distribution and remobilization in bean plants as influenced by phosphorus nutrition. **Crop Science**, v.36, p.929-935, 1996.

SOUZA, A.E.; FONSECA, D.A. Fosfato. In: Economia mineral do Brasil - Departamento Nacional De Produção Mineral (DNPM), p.546-568, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed. 2009, 719p.

TISDALE, S.L.; NELSON, W.L.; BEATON, J.D. **Soil fertility and fertilizers**. New York: Macmillan, 1993. 634 p.

VAN RAIJ, B.; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2001, 285p.

VAN RAIJ, B.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo. Campinas: Instituto Agrônomo/Fundação IAC, **Boletim técnico 100**, v.285, p.100, 1997.

VANCE, C.P.; UHDE-STONE, C.; ALLAN, D.L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, v.157, p.426-440, 2003.

WALKER, D.A. Regulation of starch synthesis in leaves--the role of orthophosphate. In: **Physiological aspects of crop productivity. Proceedings of the 15th Colloquium of the International Potash Institute**. International Potash Institute, Bern, v.15, p.195-207, 1980.

WHITE, P.J.; BROADLEY, M.R.; GREENWOOD, D.J.; HOMMOAND, J.P. Genetic modifications to improve phosphorus acquisition by roots. York, UK: **International Fertilizer Society**, 2005.