

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

WAGNER DA SILVA OLIVEIRA

**EFICIÊNCIA DO FERTILIZANTE BIOLÓGICO COM QUITOSANA
FÚNGICA NO CONTROLE DE NEMATÓIDES, INDUÇÃO DE
RESISTÊNCIA E NUTRIÇÃO NA CANA-DE-AÇÚCAR**

**RECIFE
2019**

Wagner da Silva Oliveira
Engenheiro Agrônomo

Eficiência do Fertilizante Biológico com quitosana fúngica no controle de nematoides, indução de resistência e nutrição na cana-de-açúcar

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência do Solo

Orientador: Prof. Dr. Newton Pereira Stamford

Coorientadora: Dra. Andréa Chaves Fiuza Porto

**Recife
2019**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

O48e Oliveira, Wagner da Silva
Eficiência do fertilizante biológico com quitosana fúngica no controle de nematoides, indução de resistência e nutrição na cana-de-açúcar / Wagner da Silva Oliveira. – Recife, 2019.
174 f.: il.

Orientador: Newton Pereira Stamford.
Coorientadora: Andréa Chaves Fiuza Porto.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Recife, BR-PE, 2019.
Inclui referências e apêndice(s).

1. Agricultura sustentável 2. Controle biológico 3. Enzimas
4. Antioxidantes 5. Microorganismos 6. Fertilizantes orgânicos
7. Resistência. Stamford, Newton Pereira, orient. II. Porto, Andréa Chaves Fiuza, coorient. III. Título

CDD 631.4

WAGNER DA SILVA OLIVEIRA

Eficiência do Fertilizante Biológico com quitosana fúngica no controle de nematoides, indução de resistência e nutrição na cana-de-açúcar

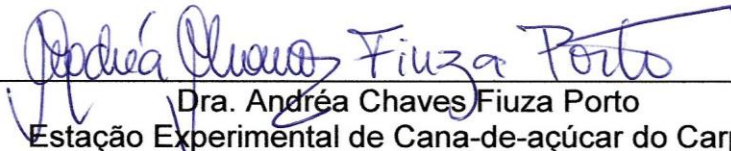
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência do Solo.

Aprovada em 15 de Fevereiro de 2019



Prof. Dr. Newton Pereira Stamford
Orientador
Universidade Federal Rural de Pernambuco

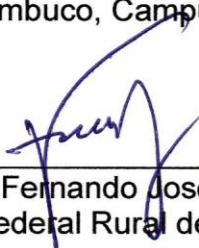
BANCA EXAMINADORA



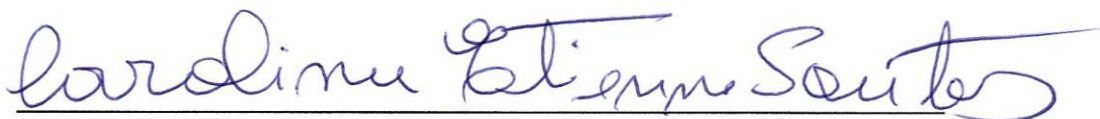
Dra. Andréa Chaves Fiuza Porto
Estação Experimental de Cana-de-açúcar do Carpina
Universidade Federal Rural de Pernambuco



Prof. Dr. Renato Lemos dos Santos
Instituto Federal de Pernambuco, Campus Vitória de Santo Antão



Prof. Dr. Fernando José Freire
Universidade Federal Rural de Pernambuco



Dra. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos
Universidade Federal Rural de Pernambuco

OFEREÇO

Aos meus pais, Carlos Rodrigues e Susana Maria, meus exemplos de vida, e a razão por eu estar vivendo este momento. Ao meu irmão Fagner, pelo carinho e apoio partilhados nos momentos difíceis e aos meus queridos sobrinhos Augusto e Helena.

Aos meus avós Maria Carolina (*in memoriam*), Átila e Izidro. “As pessoas mais iluminadas neste mundo”.

Ao meu grande amor Emmanuella Vila Nova da Silva pelo companheirismo, pela dedicação, pelo amor, pelos conselhos e por toda a paciência. Sem você não teria conseguido alcançar essa conquista.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela dádiva da vida, por sempre me fornecer forças perante as dificuldades para seguir em frente e pelas bênçãos que tem me dado ao longo de minha vida.

Ao SANTO DAIME e o Mestre Irineu que me ensinaram a ser melhor.

A meus pais, Carlos Rodrigues e Susana Maria por todo amor, conselho e apoio as minhas decisões durante minha existência.

A meu irmão Fagner pela parceria de sempre.

A minha querida noiva Emmanuella por toda compreensão e ajuda. Sem você seria muito mais difícil a conclusão deste trabalho.

Ao Amigo, Professor e Orientador, Prof^o. Newton Pereira Stamford, pela orientação decidida, por todo o conhecimento, pelos conselhos, nas horas certas, e pelo carinho.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), ao Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo pela oportunidade de realização do curso de doutorado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo apoio financeiro, na concessão da bolsa de doutorado sanduiche.

Ao Instituto Federal Baiano - IF Baiano *campus* Itapetinga – Ba, pela concessão do meu afastamento, fundamental para a realização deste trabalho.

A minha co-orientadora, Dra. Andréa Chaves, pela amizade, pelas dúvidas tiradas, pelo carinho e pela atenção a mim dedicada.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo pelos conhecimentos transmitidos durante o curso de doutorado.

A secretária do programa, Maria do Socorro, pela a atenção e carinho.

Ao Sr. Fabian, Técnico Agrícola da UFRPE e a todos os funcionários terceirizado do setor de Horticultura da UFRPE.

Ao Centro de Edafologia y Biología Aplicada del Segura (CEBAS) – CSIC, pela estrutura e equipamentos utilizados durante o Doutorado Sanduiche realizado em Murcia-Espanha. Agradeço também toda a equipe e ao coordenador professor Carlos García Izquierdo, pela hospitalidade e atenção que me foi dada no período que estive na Espanha. **Muchas Gracias!**

Ao Instituto Agrônômico de Pernambuco: em nome do Dr. José de Paula, Diretor do Laboratórios de Biologia do Solo pela estrutura e equipamentos

fornecidos, e por nunca ter medido esforços para ajudar na realização deste trabalho.

A Estação Experimental de Cana de Açúcar do Carpina (EECAC) da UFRPE, ao Dr. Djalma Neto e ao Sr. Walber do Setor de Nematologia pelo apoio prestado.

Ao Sr. Sandro, técnico agrícola e a todos os funcionários de campo da Usina São José, pela atenção e por todo apoio prestado.

Aos meus amigos e amigas do Laboratório de Biotecnologia: Marllon, Joais, Jamilly e Maria Iderlane pelo enorme carinho e apoio prestado na realização deste trabalho.

Para não pecar por alguma omissão, deixo aqui a minha mais profunda gratidão a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para este feito.

Obrigado a todos, por terem tornado mais suave esta caminhada e desta forma contribuído para a concretização deste ideal.

ORAÇÃO DE SÃO FRANCISCO DE ASSIS

Senhor, fazei de mim um instrumento da Vossa paz.

Onde houver ódio, que eu leve o amor.

Onde houver ofensa, que eu leve o perdão.

Onde houver discórdia, que eu leve a união.

Onde houver dúvidas, que eu leve a fé.

Onde houver erro, que eu leve a verdade.

Onde houver desespero, que eu leve a esperança.

Onde houver tristeza, que eu leve a alegria.

Onde houver trevas, que eu leve a luz.

Ó Mestre, fazei que eu procure mais:

consolar, que ser consolado;

compreender, que ser compreendido;

amar, que ser amado.

Pois é dando que se recebe.

É perdoando que se é perdoado.

E é morrendo que se vive para a vida eterna.

“O rio atinge seus objetivos, porque aprendeu a contornar obstáculo!”

LAO TSÉ

Eficiência do Fertilizante Biológico com quitosana fúngica no controle de nematoides, indução de resistência e nutrição na cana-de-açúcar

RESUMO

A cana-de-açúcar é uma cultura importante para a economia nacional, visto que o Brasil é o maior produtor mundial, e para melhorar o rendimento da cultura, recomenda-se a adição de fertilizantes e pesticidas químicos na agricultura o que ocasiona sérios riscos ambientais. Uma alternativa é o uso de processos microbiológicos no controle de doenças de plantas e na disponibilidade de nutrientes, como a produção de biofertilizantes de rochas fosfatada e potássica, misturadas com matéria orgânica inoculada com *Beijerinckia indica* e fungo *Cunninghamella elegans*. Esse trabalho tem por objetivo avaliar o efeito nematicida e nutricional do fertilizante biológico em cana-de-açúcar, bem como na comunidade microbiana e nos atributos químicos do solo. Para isso os experimentos foram conduzidos com 8 tratamentos, sendo quatro com fertilizante convencional na dose recomendada, em atuação isolada e em combinação com nematicidas (Azadiractina, *Bacillus* spp. e Benfuracarbe), mais três doses de fertilizante biológico (2,5 t ha⁻¹, 5 t ha⁻¹ e 7,5 t ha⁻¹), além do controle com torta de filtro 20 t ha⁻¹, em arranjo fatorial (8x2). O biofertilizante em maiores doses (100% e 150%), apresentou efeitos positivos com melhores propriedades químicas e bioquímicas do solo, além de promover mudanças estruturais na comunidade microbiana, dependendo do tratamento de fertilização. O fertilizante solúvel em combinação com nematicidas e as diferentes doses do fertilizante biológico proporcionaram o decréscimo do fator de reprodução, reduzindo a densidade populacional de *M. incognita* em cana-de-açúcar. O fertilizante biológico afetou positivamente as propriedades químicas do solo (P e K disponível), o rendimento e as características tecnológicas nos dois ciclos da cultura, especialmente aplicando na dose mais elevada. Os resultados confirmaram a eficácia do fertilizante biológico no manejo sustentável de culturas com bioagentes que possuem dupla ação, e podem ser uma alternativa viável para promover a fertilidade do solo.

Palavras-chave: Agricultura sustentável. Biofertilizante organomineral. *Cunninghamella elegans*. Comunidade microbiana. Controle biológico. Enzimas antioxidantes.

Effectiveness of the Biological Fertilizer with fungal chitosan in the control of nematodes, induction of resistance and nutrition in the sugarcane

ABSTRACT

Sugarcane is a very important economic crop and since Brazil is the world's largest producer, in order to improve crop yields, it is recommended adding chemical fertilizers and pesticides in agriculture and these actions may promote serious risks to the environment. An alternative is the use of microbiological processes in the control of plant diseases and on availability of nutrients, such as the production of biofertilizers of phosphate and potassium rocks, mixed with organic matter inoculated with *Beijerinckia indica* and with fungi *Cunninghamella elegans*. This work aims to evaluate the nematicidal and nutritional effect of biological fertilizer on sugarcane, as well as on the microbial community and soil chemical attributes. The experiment was realized in a factorial arrangement (8x2), with 8 treatments, four with conventional fertilizer in recommended dose, applied in isolate and combined with nematicides (Azadirachtin, Bacillus spp. and Benfuracarbe), with biological fertilizer applied in three doses (2.5 t ha⁻¹, 5.0 t ha⁻¹ and 7.5 t ha⁻¹), and a control treatment with sugarcane mud cake (20 t ha⁻¹), with and without inoculation with nematodes, in four replicates. The biofertilizer in higher doses (100% and 150%) had positive effects with better chemical and biochemical properties of the soil, besides promoting structural changes in the microbial community, depending on the fertilization treatment. The soluble fertilizer in combination with nematicides and the different doses of the biological fertilizer provided the decrease of the reproduction factor, reducing the population density of *M. incognita* in sugarcane. Biological fertilizer positively affected the chemical properties of the soil (P and K available), yield and industrial characteristics in the two crop cycles, especially applying at the highest dose. The results confirmed the efficacy of the biological fertilizer in the sustainable management of cultures with double action bioagents and can be a viable alternative to promote soil fertility.

Keywords: Antioxidant enzymes. Biological control. *Cunninghamella elegans*. Microbial community. Organomineral biofertilizer. Sustainable agriculture.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 01

Tabela 1 - Caracterização química e física do solo de Lorca, Murcia - Espanha.....	63
Tabela 2 - Características químicas do fertilizante biológico (peso seco). Entre parêntesis, desvio padrão (n = 3).....	68
Tabela 3 - Concentração de nutrientes no solo após os tempos (0, 30 e 60 dias) submetidos aos diferentes tratamentos de adubação.	72
Tabela 4 - Análise de correlação de Spearman entre variáveis químicas, indicadores de atividade e índice de biomassa microbiana.....	76
Tabela 5 - Concentração de PLFAs de fungo, bactéria, Gram ⁺ , Gram ⁻ , actinobactéria em solo tratado com bioprotetor e fertilizante solúvel após 60 dias de incubação.....	78

Capítulo 02

Tabela 1 - Atributos químicos e físicos do solo em diferentes profundidades na área do ensaio de campo no Engenho Água Branca, Usina São José S/A; Igarassu – PE.....	100
Tabela 2 - Peso fresco da raiz (PFR) e fator de reprodução (FR) nos diferentes tratamentos de fertilização em cana-de-açúcar inoculada e não-inoculada com <i>Meloidogyne incognita</i>	105
Tabela 3 - Valores médios das enzimas ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) em folha de cana-de-açúcar variedade RB92579, sob efeito da interação entre <i>Meloidogyne incognita</i> e tempo, independentemente do tratamento de fertilização.	108
Tabela 4 - Valores médios de proteína total em folha de cana-de-açúcar variedade RB92579, sob efeito da interação entre tratamentos de fertilização e <i>Meloidogyne incognita</i> em casa de vegetação.....	110

Capítulo 03

Tabela 1 - Atributos químicos e físicos do solo em diferentes profundidades na área do ensaio de campo no Engenho Água Branca, Usina São José S/A; Igarassu – PE.....	132
---	-----

Tabela 2 - Valores de acidez ativa (pH) e dos teores de P e K disponível, Ca e Mg trocável do solo na profundidade de 0 - 20 cm, afetados por diferentes tratamentos de fertilização cultivado com a variedade RB 92579, ao ciclo de cana planta.....	139
Tabela 3 - Valores de acidez ativa (pH) e dos teores de P e K disponível, Ca e Mg trocável do solo na profundidade de 0 - 20 cm, afetados por diferentes tratamentos de fertilização cultivado com a variedade RB 867515, ao ciclo de cana planta.....	140
Tabela 4 - Valores de acidez ativa (pH) e dos teores de P e K disponível, Ca e Mg trocável do solo na profundidade de 20 - 40 cm, afetados por diferentes tratamentos de fertilização cultivado com as variedades RB 92579 e RB 867515, ao ciclo de cana planta.....	144
Tabela 5 - Valores de acidez ativa (pH) e dos teores de P e K disponível, Ca e Mg trocável do solo, afetados por diferentes tratamentos de fertilização cultivado com as variedades RB 92579 e RB 867515, ao ciclo de cana soca.....	146
Tabela 6 - Teores de N total, P total, K total, Ca total e Mg total em folhas de variedades de cana-de-açúcar submetidas a tratamentos de fertilização aos 150 dias após o plantio (DAP) no ciclo da cana planta.....	148
Tabela 7 - Altura de planta e diâmetro de colmo de variedades de cana submetidas a tratamentos de fertilização aos 150 dias após o plantio (DAP) no ciclo cana planta.....	150
Tabela 8 - Produtividade de colmos (TCH), de Pol (TPH), sólidos solúveis e percentagem de sacarose aparente no caldo (Pol) de diferentes variedades de cana-de-açúcar submetidas a tratamentos de fertilização aos 480 dias após o plantio (DAP), no ciclo cana planta.....	151
Tabela 9 - Pol na cana (PC), pureza, fibra e açúcar total recuperável (ATR) no colmo de diferentes variedades de cana-de-açúcar submetidas a aplicação de tratamentos de fertilização aos 480 dias após o plantio (DAP), no ciclo cana planta.....	152
Tabela 10 - Produtividade de colmos (TCH) e de Pol (TPH) nas variedades de cana-de-açúcar submetidas a tratamentos de fertilização aos 360 dias após o plantio (DAP), no ciclo cana soca.....	154

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 01

- Figura 1 - Preparo dos biofertilizantes de rochas: (A) Adição do pó de Rocha Apatita; (B): Adição do pó de rocha Relinktum; (C): Adição de enxofre elementar; (D): Homogeneização dos materiais; (F) Detalhe do inoculante com *Acidithiobacillus*. 65
- Figura 2 - Preparo do biofertilizante organomineral. (A): mistura dos biofertilizantes de rochas + húmus de minhoca; (B): Cultura da *Beijerinckia indica* pronta para inocular; (C): Inoculação com *B. indica*; (D): Homogeneização; (E): Cultivo da bactéria diazotrófica *B. indica*. 66
- Figura 3 - Preparo do Fertilizante biológico em canteiro da UFRPE. (A): Cultura do fungo *Cunninghamella elegans*; (B): Fungo *C. elegans* pronto para inocular; (C): Inoculação com *C. elegans*; (D): Homogeneização do material, após inoculação. 67
- Figura 4 - Efeito de diferentes tratamentos de fertilização nas propriedades biológicas do solo. Atividades da β -glucosidase, A β G (a), Fosfatase, AF (b), Urease, AU (c), Desidrogenase, AD (d) e glicina aminopeptidase (e). Tratamentos: Controle; FI: fertilizante solúvel convencional (FNPK 100% Dose Recomendada - DR); B1: 5 t ha⁻¹ bioprotetor (PNPK 50% DR); B2: 10 t ha⁻¹ bioprotetor (PNPK 100% DR); B3: 15 t ha⁻¹ bioprotetor (PNPK 150% DR). As barras representam o desvio padrão. Dados com a mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). 75
- Figura 5 - Razões de Gram⁺ / Gram⁻ e ^aMonosaturados/ ^bSaturados de PLFAs em tratamentos de solo após 60 dias de incubação. Tratamentos: controle; FI: fertilizante solúvel convencional (FNPK 100% Dose Recomendada - DR); B1: 5 t ha⁻¹ bioprotetor (PNPK 50% DR); B2: bioprotetor 10 t ha⁻¹ (PNPK 100% DR); B3: 15 t ha⁻¹ bioprotetor (PNPK 150% DR). Para cada parâmetro, os dados seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey B ($p < 0,05$). Barras representam desvio padrão. 79

Figura 6 - Análise de componentes principais para PLFAs em solo com diferentes tratamentos de fertilização (■) B1: 5 t ha⁻¹ de bioprotetor (PNPK 50%), (◆) B2: 10 t ha⁻¹ de bioprotetor (PNPK 100%), (▲) B3: 15 t ha⁻¹ de bioprotetor (PNPK 150%), (●) FI: fertilizante solúvel convencional (FNPK 100%), (□) Controle após 60 dias de cultivo..... 80

Capítulo 02

Figura 1 - Atividade específica de superóxido dismutase (SOD) em folha de cana-de-açúcar variedade RB92579, em diferentes tempos de avaliação, associado a *Meloidogyne incognita* não-inoculado (A) e inoculado (B) e, sob diferentes tratamentos de fertilização: FC: fertilizante solúvel convencional (FC 100% Dose Recomendada - DR); FC+Az: FC 100% (DR) + Azadiractina (AZAMAX®); FC + NE: FC 100% (DR) + *Bacillus* spp. (NEMIX®); FC + PO: FC 100% (DR) + Benfuracarbe (POTTENTE®); Bio 50%: Fertilizante biológico 50% DR (equivalente a 2,5 t ha⁻¹); Bio 100%: Fertilizante biológico 100% DR (equivalente a 5 t ha⁻¹); Bio 150%: Fertilizante biológico 150% DR (equivalente a 7,5 t ha⁻¹); Controle (20 t ha⁻¹ de torta de filtro)..... 107

Figura 2 - Efeito dos tratamentos de fertilização nos valores médios da enzima catalase (CAT) em folha de cana-de-açúcar variedade RB92579 em casa de vegetação, sob diferentes tratamentos de fertilização: FC: fertilizante solúvel convencional (FC 100% Dose Recomendada - DR); FC+Az: FC 100% (DR) + Azadiractina (AZAMAX®); FC + NE: FC 100% (DR) + *Bacillus* spp. (NEMIX®); FC + PO: FC 100% (DR) + Benfuracarbe (POTTENTE®); Bio 50%: Fertilizante biológico 50% DR (equivalente a 2,5 t ha⁻¹); Bio 100%: Fertilizante biológico 100% DR (equivalente a 5 t ha⁻¹); Bio 150%: Fertilizante biológico 150% DR (equivalente a 7,5 t ha⁻¹); Controle (20 t ha⁻¹ de torta de filtro). 109

Capítulo 03

Figura 1 - Temperatura (°C) e Precipitação (mm) registradas durante o período de condução do experimento na Usina São José, em Igarassu, PE..... 131

Figura 2 - Plantio da cana-de-açúcar. A e B: Cana semente; C: Sulcos de plantio; D: Distribuição da cana semente; E: Plantio em corrente dupla; F: Secção de colmos.	134
Figura 3 - Aplicação de fertilizantes no experimento. A: Distribuição do fertilizante solúvel; B: Distribuição do fertilizante biológico; C e D: Distribuição da torta de filtro; E: fertilizante biológico.	135
Figura 4 - Avaliação biométrica aos 150 DAP. A: Avaliação de altura da planta; B e C: Avaliação de diâmetro de colmo.	137

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	27
1.1 Hipóteses	29
1.2 Objetivo Geral	29
1.3 Objetivos específicos	29
2 REVISÃO DE LITERATURA	31
2.1 A cultura da cana-de-açúcar	31
2.2 Biofertilizante/Bioprotetor na nutrição e proteção das plantas.....	32
2.3 Nematoides em cana-de-açúcar	36
2.4 Uso da quitosana no Controle de nematoide	40
REFERÊNCIAS.....	43
3 USO DE BIOFERTILIZANTE DE ROCHA COMO ALTERNATIVA AO FERTILIZANTE QUÍMICO EM UMA AGRICULTURA SUSTENTÁVEL - EFEITOS NOS ATRIBUTOS QUÍMICOS E NA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO	57
Resumo.....	58
Abstract.....	59
3.1 Introdução	60
3.2 Material e Métodos.....	63
3.2.1 Condução do experimento	63
3.2.2 Produção do biofertilizante organomineral	64
3.2.3 Amostragem e análises química e bioquímica do solo.....	67
3.2.4 Análise estatística	70
3.3 Resultados	70
3.3.1 Características químicas do solo.....	70
3.3.2 Propriedades biológicas do solo.....	74
3.3.3 Análise de perfil de ácidos graxos (PLFA).....	77
3.4 Discussão.....	80
3.4.1 Efeitos da aplicação do biofertilizante nos atributos do solo	80
3.4.2 Atividade enzimática e PLFA.....	82
3.5 Conclusões.....	84
Referências	85

4 POTENCIAL DO FERTILIZANTE BIOLÓGICO NO CONTROLE E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA SOBRE <i>Meloidogyne incognita</i> EM CANA-DE-AÇÚCAR (<i>Saccharum</i> spp.)	93
Resumo	94
Abstract	93
4.1 Introdução	96
4.2 Material e Métodos	99
4.2.1 Experimento em vasos com solo (mudas de cana-de-açúcar)	99
4.2.2 Produção do fertilizante biológico	101
4.2.3 Determinação da população de <i>M. incognita</i>	102
4.2.4 Determinação da atividade enzimática	103
4.2.4.1 Atividade superóxido dismutase	103
4.2.4.2 Atividade de ascorbato peroxidase	103
4.2.4.3 Atividade de catalase	104
4.2.4.4 Determinação de proteínas totais	104
4.2.5 Análise estatística	104
4.3 Resultados	105
4.3.1 Potencial Nematicida do Biofertilizante	105
4.3.2 Atividade enzimática e teor de proteína	106
4.4 Discussão	110
4.5 Conclusão	114
Referências	115
5 FERTILIZANTE BIOLÓGICO NA NUTRIÇÃO, PRODUTIVIDADE E QUALIDADES TECNOLÓGICAS DA CANA-DE-AÇÚCAR E EM ATRIBUTOS QUÍMICOS DO SOLO EM CULTIVOS CONSECUTIVOS	125
Resumo	126
Abstract	127
5.1 Introdução	128
5.2 Material e Métodos	130
5.2.1 Experimento em campo	130
5.2.2 Produção do Fertilizante Biológico	132
5.2.3 Delineamento experimental	133
5.2.4 Preparo da área experimental	133
5.2.5 Fertilização	134

5.2.6 Determinações no solo.....	135
5.2.7 Análise Biométrica.....	136
5.2.8 Determinações na parte aérea	136
5.2.9 Análise estatística	138
5.3 Resultados	138
5.3.1 Atributos do solo.....	138
5.3.2 Avaliação nutricional (cana planta).....	147
5.3.2.1 Teores de N, P e K na folha +3	147
5.3.2.2 Teores de Ca e Mg nas folhas	149
5.3.3 Avaliação biométrica	149
5.3.4 Produtividade e características tecnológicas (cana planta).....	150
5.4 Discussão.....	155
5.4.1 Atributos químicos do solo	155
5.4.4 Avaliação nutricional (cana planta).....	158
5.4.5 Biometria	161
5.4.6 Produtividade e avaliação tecnológica	162
5.5 Conclusões.....	164
Referências	165
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	173
7. APÊNDICE A - Resumo da análise estatística.....	174

1 INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é uma cultura originária da Ásia, introduzida no Brasil no período colonial no início do século XVI, sendo uma planta semi-perene e própria de climas tropicais e subtropicais. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, atualmente é tida como uma das culturas mais importantes no cenário socioeconômico do país por ser matéria prima utilizada na indústria sucroalcooleira.

O aumento das exportações e a expansão do setor automobilístico bicomustível na frota brasileira contribuiu para o incentivo a realização de pesquisas que visam aumentar a produtividade desta cultura, de forma sustentável.

A produtividade nacional de cana-de-açúcar estimada para a safra 2017/18 valores superiores a 76 t ha⁻¹, porém em relação a região nordeste, principalmente o estado de Pernambuco sua produtividade não ultrapassam as 48 t ha⁻¹ (CONAB, 2018). Essa baixa produtividade está relacionada com o ambiente de cultivo, que leva em consideração as condições edafoclimáticas e a fertilidade do solo, que são fatores que contribuem para uma baixa nutrição da cultura, proporcionando deste modo baixa produtividade agrícola e características tecnológicas. Neste sentido, a nutrição da cana-de-açúcar se constitui em alguns desses fatores que garantem uma melhor nutrição mineral para a cultura, possibilitando afirmar que a eficiência no incremento de produtividade será maior quanto melhor forem os ajustes desses agentes específicos de produtividade.

Na agricultura sustentável, o uso de fertilizantes e corretivos tem a finalidade de elevar a produção de alimentos, procurando minimizar danos ao meio ambiente, conservando a fertilidade e a biodiversidade do solo, além de atender os critérios econômicos. Por outro lado, com as atuais dificuldades econômicas do país, e os elevados custos dos insumos agrícolas, é necessário buscar formas alternativas de manter ou mesmo aumentar os rendimentos de produtividade nos canaviais, para que a atividade agrícola continue rentável.

Fertilizantes organomineral, comparados a fertilizantes solúveis, apresentam custos relativamente inferior, contudo, seu potencial químico reativo é menor. O biofertilizante produzido a partir de rochas fosfatada e potássica moídas, foi desenvolvido como alternativa à fertilização mineral de culturas como cana-de-açúcar. A produção de biofertilizantes de rochas é um processo prático, onde são

misturadas as rochas moídas com enxofre elementar e inoculados com bactérias do gênero *Acidithiobacillus* que reduz o consumo de energia. As bactérias oxidantes de enxofre, são capazes de produzir ácido sulfúrico, atuando nas rochas e solubilizando alguns minerais, aumentando a disponibilidade de nutrientes para as plantas, e minimiza os impactos ambientais sendo importantes na reciclagem de nutrientes no solo. Desse modo, o uso de microrganismos com habilidade de solubilizar rochas fosfatadas e potássicas com adição de enxofre é de suma importância para a agricultura.

Para que o biofertilizante de rochas disponibilize, além de fósforo e potássio, devem ser misturados com matéria orgânica e inoculados com bactéria diazotrófica de vida livre, enriquecendo o produto em N através do processo de fixação biológica de N₂ sendo denominado de biofertilizante misto, para o melhor desenvolvimento das plantas.

O biofertilizante misto inoculado com fungo *Cunninghamella elegans*, constitui o fertilizante biológico, além de apresentar quitina e quitosana na parede celular que podem atuar como substância fungistática e bacteriostática, estes fungos promovem a produção de polifosfato inorgânico, disponibilizando maior quantidade de fósforo para as plantas.

Entre os problemas fitossanitários na cultura da cana-de-açúcar no Brasil, que influenciam a produtividade na região nordeste onde as condições edafoclimáticas são menos favoráveis à cultura, estão as altas incidências de fitonematoides com destaque para *Meloidogyne incognita* que são de grande importância induzindo grandes perdas para os canaviais.

Os elevados custos dos agrotóxicos e a resistência de pragas a esses produtos têm estimulado a busca por agentes biológicos menos agressivos ao ambiente, e de menor impacto financeiro. Técnicas mais eficientes são necessárias no manejo integrado de nematoides na cultura da cana-de-açúcar, dentre as alternativas mais promissoras estão o controle biológico, indutores de resistência e fertilizantes. Além de proporcionar uma boa produtividade, o fertilizante biológico fornece uma nutrição balanceada conferindo a planta maior tolerância aos estresses ambientais bióticos ou abióticos.

A presente tese está dividida em referencial teórico e três capítulos. O referencial teórico traz uma revisão bibliográfica sobre o biofertilizante de rocha e sua importância na disponibilidade dos nutrientes e como alternativa aos fertilizantes

solúveis, além do potencial da quitosana na indução dos mecanismos de resistência de plantas a nematoides. No primeiro capítulo foi avaliado, o uso de biofertilizantes na resposta das atividades enzimáticas e comunidades microbiana do solo. O segundo capítulo trata do controle de *Meloidogyne incognita* através da indução de mecanismos de resistência em cana-de-açúcar por meio do uso de fertilizante biológico em casa de vegetação. No terceiro capítulo o fertilizante biológico com quitosana foi avaliado em campo, quanto ao seu efeito nos atributos químicos do solo, absorção de nutrientes, na produtividade e características tecnológicas em duas variedades de cana-de-açúcar cultivada em dois ciclos consecutivos.

1.1 Hipóteses

A adição do biofertilizante proporciona mudanças nas atividades das enzimas hidrolíticas do solo e na biomassa microbiana do solo, devido ao aumento na disponibilidade de nutrientes.

O fertilizante biológico atua no controle biológico dos nematoides das galhas, através da ação da quitosana fúngica presente na sua composição, ativando o mecanismo de defesa da planta como indutor de resistência a *M. incognita* na cultura da cana-de-açúcar.

O fertilizante biológico atua como fonte de nutriente, tanto quanto o fertilizante solúvel aumentando a produtividade agrícola da cana-de-açúcar.

1.2 Objetivo Geral

Estudar o efeito do fertilizante biológico nas propriedades químicas, atividades enzimáticas e na comunidade microbiana do solo, além de avaliar sua eficiência como fonte de nutrientes e indutor de resistência aos nematoides em cana-de-açúcar.

1.3 Objetivos específicos

Avaliar as relações entre propriedades químicas do solo, atividades enzimáticas e composição da comunidade microbiana do solo.

Verificar a atuação do fertilizante biológico na indução de resistência da cana-de-açúcar a *Meloidogyne incognita* em casa de vegetação e o aumento da atividade de enzimas antioxidantes relacionadas com a patogenicidade.

Avaliar o efeito do fertilizante biológico nas características químicas do solo e sua eficiência como alternativa aos fertilizantes minerais na cana-de-açúcar em área afetada por nematoides.

Verificar a produtividade agrícola e as características tecnológicas da cana-de-açúcar em função da aplicação do fertilizante biológico, comparando com fertilizantes minerais solúveis em dois ciclos consecutivos no campo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da cana-de-açúcar

Originária nas regiões da Indonésia e Nova Guiné no sudeste da Ásia, a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) pertence à família Poaceae sendo amplamente cultivada não somente por acumular sacarose, mas também pelo potencial que a cultura exhibe para alimentação e geração de energia com boa adaptação às condições brasileiras.

A cana-de-açúcar é cultivada em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo. Introduzida no Brasil em meados do século XVI, seu cultivo mostrou-se promissor devido às condições edafoclimáticas favoráveis. Essa cultura é de grande importância econômica para o agronegócio brasileiro e vem sendo explorada desde a época do Brasil colônia, inicialmente estabelecida na região Nordeste e posteriormente na região Sudeste.

Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido pela Índia e China. A produção na Safra 2017/18 foi de 633,3 toneladas de colmos de cana, e uma produtividade de 76 t ha⁻¹ (CONAB, 2018), sendo responsável por mais da metade do açúcar comercializado no mundo e líder mundial na produção de etanol de cana (MAPA, 2017). No Brasil, 12,9% de toda a área cultivada são destinados à atividade sucroalcooleira, correspondente a 9,8 milhões de hectares (IBGE, 2017). A expansão do setor no país gera impacto positivo na economia, contudo, a produtividade média da cana-de-açúcar é considerada baixa, comparado ao potencial genético das variedades utilizadas, que apresentam registros superiores a 140 t ha⁻¹ de produtividades (RIDESA, 2010). Na região Nordeste, esta produtividade média é menor que 60 t ha⁻¹ (XAVIER et al., 2016).

O Nordeste está entre as principais regiões produtoras de cana-de-açúcar do Brasil, apresentando a terceira maior área plantada, contribuindo com 6,5 % na produção nacional da cana-de-açúcar (CONAB, 2018). Seu cultivo concentra-se principalmente na faixa litorânea dos Estados de Alagoas, Pernambuco e Paraíba, geralmente em solos bem intemperizados e de baixa fertilidade.

Desse montante de produção na safra 2017/2018, a região nordeste contribuiu com cerca de 41,1 milhões de toneladas de colmos, onde o estado de Pernambuco participou com aproximadamente 10,8 milhões de toneladas de cana, destinada a indústria sucroalcooleira e classificada como a segunda maior produtora

da região (CONAB, 2018). No entanto, a produtividade média é relativamente baixa, com cerca de 48 t ha⁻¹. A razão que dificulta melhorias na produtividade da cana-de-açúcar é expressa principalmente com a diversidade nas características do solo, terrenos inclinados e padrões irregulares de chuvas, onde longos períodos de veranico são comuns.

O aumento das exportações e a expansão do setor automobilístico bicomustível na frota brasileira contribuiu para o incentivo a realização de pesquisas que visam aumentar a produtividade desta cultura, de forma sustentável.

2.2 Biofertilizante/Bioprotetor na nutrição e proteção das plantas

Com o crescimento da população, a agricultura convencional desempenha um papel significativo no atendimento às demandas alimentares, levando a uma dependência de fertilizantes químicos e pesticidas (SANTOS et al., 2012). Os fertilizantes convencionais são substâncias compostas de quantidades conhecidas de nitrogênio, fósforo e potássio, e sua exploração promove a poluição do ar e das águas subterrâneas, provocando a eutrofização dos corpos d'água (YOUSSEF; EISSA, 2014).

Numa agricultura sustentável, a exigência do uso de fertilizantes tem o propósito de proporcionar incremento na produção das culturas, atendendo critérios econômicos, além de conservar a fertilidade e a biodiversidade do solo, procurando minimizar danos ao meio ambiente (STAMFORD et al., 2008a; JEHANGIR et al., 2017). A este respeito, a agricultura biológica é uma das estratégias que não só garante a segurança alimentar, como também contribui para a biodiversidade do solo (MEGALI; GLAUSER; RASMANN, 2014).

Com o interesse em promover práticas agrícolas mais sustentáveis, o uso de microrganismos, seja em conjunto ou como substituto de fertilizantes convencionais, seria viável para o setor agrícola (BAREA, 2015). Os biofertilizantes podem ser usados como suplementos de fertilizantes químicos, pois são fontes relativamente baratas e renováveis de nutrientes. Os microrganismos benéficos para o crescimento das plantas são selecionados e cultivados em laboratório, misturados com materiais de suporte adequados e posteriormente aplicados em campos, mantendo a qualidade do solo, minimizando a poluição do meio ambiente, diminuindo o uso de produtos químicos (TRIPTI; KUMAR; ANSHUMALI, 2012).

Dentre os nutrientes essenciais, o nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) são requeridos em maiores quantidades em relação aos demais. Porém, para o desempenho das funções metabólicas das plantas é necessário adicionar ao solo todos os elementos essenciais, sem os quais a produção das culturas seria inviável (TAIZ; ZEIGER, 2009) e isso é conseguido através da prática de fertilização, onde uma das vertentes tecnológicas são os fertilizantes solúveis, como o NPK em formulações preparadas com as necessidades do solo.

Dessa forma, compreender a demanda nutricional das variedades de cana-de-açúcar é fundamental para a produção, pois a fertilização constitui parte significativa dos custos da cultura (SILVA et al., 2017a). Estudos mostraram que as cultivares podem apresentar variações na extração de nutrientes (OLIVEIRA et al., 2010; CALHEIROS et al., 2011), demonstrando que a adequada gestão nutricional da cana é importante para que a cultura se torne mais produtiva e competitiva.

Considerando que os solos brasileiros são deficientes em fósforo disponível devido ao seu alto grau de intemperização, e que os fosfatos são recursos naturais não renováveis (ARAÚJO et al., 2008; BASTOS et al., 2008; KORNDÖRFER; MELO, 2009), há necessidade em utilizá-lo eficientemente. A adubação fosfatada desempenha papel importante na produtividade e longevidade dos canaviais, agindo como fator decisivo no desenvolvimento das raízes, perfilhamento, produção de colmos e na qualidade tecnológica da cana-de-açúcar (SANTOS et al., 2011).

O fósforo é um dos principais macronutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas, embora requerido em quantidades menores que o nitrogênio e o potássio, apresentando grande efeito na produtividade em termos de massa vegetal e açúcar, já que o fósforo desempenha função-chave no metabolismo da cana-de-açúcar, tais como metabolismo energético, biossíntese de fosfolípidios e ácido nucléico, transdução de sinal e regulação de atividade enzimática (TAIZ et al., 2017; ROCHA et al., 2007).

Além da importância metabólica, para a cana-de-açúcar, Albuquerque et al. (2016) observaram que o fósforo é importante na industrialização do caldo, de grande importância na qualidade da cana-de-açúcar, influenciando a porcentagem aparente de sacarose contida no caldo da cana e pureza de caldo. Santos et al. (2011) verificaram aumento nos teores de sólidos solúveis, de açúcares redutores totais e de sacarose nos colmos aumentando a produtividade de açúcar, quando aplicado fósforo no sulco de plantio.

Segundo Holanda, Silva e Freitas (2008) o fósforo é um nutriente com finalidade energética, que faz parte da ATP e participa da síntese de vários compostos orgânicos. Estudos realizados por Simões Neto et al. (2012) em solos de Pernambuco cultivados com cana-de-açúcar, apresentaram resultados positivos nas variáveis tecnológicas quando adubados com fósforo, principalmente no primeiro ano de cultivo em que, os valores de Açúcares Totais Redutores (ATR) foram maiores.

O potássio (K) é o nutriente mais extraído pela cultura, apresentando sua maior demanda e concentração na folha na fase inicial do crescimento com posterior diminuição dos teores à medida que a planta se desenvolve (MEDINA et al., 2013). Absorvido pelas plantas na forma iônica (NIEVES-CORDONES et al., 2014), desempenha várias funções, como regulação do potencial osmótico, ativação enzimática, abertura e fechamento de estômatos, transporte de carboidratos e fotossíntese (ALMEIDA et al., 2015; RAZA et al., 2014) principalmente pela socaria da cana-de-açúcar (palha) (KORNDÖRFER; OLIVEIRA, 2005).

Além disso, o potássio influencia na qualidade industrial da cana, quando a concentração do nutriente é elevada na planta, há um atraso na maturação da cana-de-açúcar, aumentando proporcionalmente os teores de açúcares redutores e as cinzas do caldo reduzindo a pureza da sacarose obtida (SILVA et al., 2017b).

A disponibilidade natural de K^+ no solo, é basicamente em função do material de origem em que o solo se formou e seu grau de desenvolvimento. No solo, o potássio pode estar presente nas formas estrutural, trocável e não-trocável, onde faz parte de minerais primários e/ou retido nos sítios com cargas negativas dos minerais da fração argila ou presente na solução do solo (MELO et al., 2003; MEDEIROS et al., 2014). A baixa disponibilidade de K no solo contribui para reduzir a longevidade da cana, sendo considerado um elemento importante na recuperação da produtividade das soqueiras (SCHULTZ et al., 2010).

As rochas fosfatadas e potássicas são fontes efetivas de nutrientes para as culturas, contudo também apresentam baixa eficiência em razão da baixa solubilidade das suas formas químicas (GUELFIL-SILVA et al., 2013), necessitando serem alteradas através de processos físicos, químicos e/ou biológicos, visto que as mesmas não ocorrem na natureza, prontamente disponível para as plantas (VAN STRAATEN, 2002). Desse modo, o uso de microrganismos com habilidade de solubilizar rochas fosfatadas e potássicas com adição de enxofre são de suma

importância para a agricultura. As bactérias do gênero *Acidithiobacillus*, são capazes de produzir ácido sulfúrico, atuando nas rochas com redução do pH e solubilizando alguns minerais (STAMFORD et al., 2007; 2008a, b; 2009; 2014).

Avaliando a eficiência agronômica do biofertilizante de rochas, produzido a partir de rochas fosfatadas e potássicas com adição de enxofre elementar inoculado com bactérias oxidantes do enxofre do gênero *Acidithiobacillus* em diversas culturas, como melão, leguminosas, uva e cana-de-açúcar (SILVA et al., 2012; ANDRADE et al., 2013; STAMFORD et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014, 2015, 2017a), os autores observaram resultados superiores ou equivalentes aos fertilizantes minerais e concluíram que o biofertilizante de rochas pode ser utilizado como fonte nutricional fornecendo P, Ca, K, Mg e S para as plantas.

A inoculação de bactérias oxidantes do enxofre gênero *Acidithiobacillus*, em rochas fosfatadas e potássicas é uma alternativa viável para uma fertilização efetiva e econômica, através da aplicação do biofertilizante produzido. Sabe-se que estes microrganismos podem tornar os nutrientes disponíveis para as plantas por diferentes mecanismos (FACCIN et al., 2009; ZHAO et al., 2016). Essas bactérias são responsáveis pela reciclagem de elementos no solo, enquanto algumas espécies são de reconhecida relevância na disponibilização de nutrientes de rochas (STAMFORD et al., 2008b; 2014). Porém, não é possível a disponibilidade do nitrogênio para as plantas pelos biofertilizantes de rochas fosfatadas e potássicas.

O nitrogênio é um dos macronutrientes mais importantes para o desenvolvimento dos organismos, visto que faz parte de compostos químicos essenciais como proteínas, ácidos nucleicos, e outros componentes indispensáveis para toda forma de vida. A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é um processo biológico dos mais importantes, especialmente quando envolve o sistema simbiótico entre leguminosas e as bactérias rizóbios; as bactérias diazotróficas de vida livre (não simbióticas) e as associativas dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, que vivem, principalmente, associadas a gramíneas, especialmente em cana-de-açúcar (REIS et al., 2009). A associação entre bactérias diazotróficas e cana-de-açúcar pode ocorrer naturalmente ou através do uso de inoculantes.

Em sistemas agrícolas, as bactérias de vida livre aeróbias e microaeróbias como *Azotobacter*, *Beijerinckia* e *Derxia*, têm um grande potencial para a inoculação de resíduos orgânicos urbanos (DÖBEREINER, 1961), e outros materiais orgânicos,

que apresentam alta relação C:N. Esses microrganismos apresentam grande potencial para aumentar o desenvolvimento de plantas de diferentes espécies (REIS JUNIOR et al., 2004). Além disso, a mistura de biofertilizante de rochas com resíduos orgânicos, tais como, húmus de minhoca e torta de filtro de cana-de-açúcar, inoculado com bactérias diazotróficas de vida-livre eficiente na fixação do N₂, podem complementar a fertilização do solo disponibilizando nitrogênio para as plantas (LIMA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2015).

O biofertilizante misto além de ser uma fonte alternativa de adição de nutrientes para as plantas, especialmente quando inoculado com o fungo *Cunninghamella elegans*, que contém quitina e quitosana em sua parede celular (FRANCO et al., 2011), pode atuar como substância fungicida e/ou fungistática, além de atuar como substância bactericida e/ou bacteriostática (BERGER et al., 2011; STAMFORD et al., 2014).

Berger et al. (2013) observaram os efeitos da quitosana fúngica na atividade de algumas enzimas e no crescimento de plantas de feijão-caupi, em solo do Nordeste brasileiro, região com baixo conteúdo em nutrientes P e K, aplicando quitosana fúngica e biofertilizante (PNPK), embora não tenham sido observados sintomas de doença (*Fusarium oxysporum*) em plantas de feijão-caupi tratadas com fertilizante solúvel (FNPK). Oliveira et al. (2017b) avaliando a eficácia do bioprotetor (PNPK) sobre características de tomate e no controle da *Ralstonia solanacearum*, concluíram que a aplicação de bioprotetor com quitosana de fungos controla a murcha bacteriana do tomate, e que seus efeitos fertilizantes permitiram o crescimento normal das plantas.

Estudos desenvolvidos por Stamford et al. (2014) e Oliveira et al. (2014, 2015), nas culturas da uva, melão e cana-de-açúcar, confirmaram a eficiência do biofertilizante a partir do biofertilizante misto (BNPK) com adição de quitosana fúngica através da inoculação do fungo *Cunninghamella elegans* no fornecimento de nutrientes, mostrando o potencial do produto (bioprotetor – PNPk) como alternativa viável em substituição aos fertilizantes minerais solúveis.

2.3 Nematoides em cana-de-açúcar

Além de proporcionar uma boa produtividade, a nutrição balanceada confere a planta maior resistência aos estresses ambientais bióticos ou abióticos. Dentre os estresses bióticos o parasitismo por nematoides é um dos que causam maiores

prejuízos na cultura da cana-de-açúcar, visto que o hábito semi-perene da cultura a submete diferentes formas de estresses no campo, tornando mais severos os prejuízos causados por pragas ou patógenos como nematoides fitoparasitas, principalmente quando esses organismos se encontram em populações elevadas podendo reduzir a produção drasticamente (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011; CHAVES et al., 2009a; NOVARETTI; REIS, 2009).

Como estes patógenos dependem do tecido das plantas para seu crescimento, desenvolvimento e reprodução, os fitonematoides são considerados como parasitas obrigatórios, que obtêm nutrientes do citoplasma de células vivas para o seu desenvolvimento e reprodução causando danos ao sistema radicular. Quanto às modalidades de parasitismo podem ser endoparasitas ou ectoparasitas, nos dois casos sedentários ou migradores (FREITAS et al., 2012).

Os nematoides atacam as raízes da cana-de-açúcar, injetam toxinas no sistema radicular, extraem substâncias para o crescimento e desenvolvimento, resultando em deformações, como as galhas características do parasitismo de *Meloidogyne* spp. (VASCONCELOS; DINARDO-MIRANDA, 2011). As plantas atacadas por nematoides ficam raquíticas, cloróticas e menos produtivas, incapazes de absorver a água e os nutrientes necessários ao adequado desenvolvimento (ASSUNÇÃO et al., 2010). Normalmente a presença de nematoides ocorre em áreas limitadas, manchas em reboleiras, onde se observam plantas infestadas com galhas, necrose e lesões escuras nas radículas e baixa produtividade, contrastando com o restante da área (FREITAS et al., 2012).

Em variedades suscetíveis e níveis populacionais muito altos de nematoides, as perdas de produtividade podem atingir 50%, e os danos não se limitam à cana planta, afetam inclusive as produtividades das soqueiras, em consequência, a longevidade do canavial (DINARDO-MIRANDA et al., 2008).

Estudos relatam, mais de 310 espécies de 48 gêneros de nematoides associados a cultura da cana-de-açúcar, sendo os ectoparasitas os mais frequentes (CADET; SPAULL, 2005) e determinadas espécies se destacam por causarem redução na produtividade, dentre os quais temos os nematoides das lesões radiculares (*Pratylenchus* spp.) e das galhas (*Meloidogyne* spp.).

Os nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.) estão entre as mais importantes do mundo, tendo sobrevivência prolongada em solos com temperatura acima de 28°C. As espécies *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* são cosmopolitas e

apresentam boa adaptação as condições edafoclimáticas do Brasil (EMBRAPA, 2006). Solos mais arenosos tendem ser mais favoráveis ao nematoide devido a fácil migração, onde o aumento da severidade desse patógeno é favorecido pela monocultura (SILVA et al., 2012).

No Brasil, os fitonematoides mais frequentemente relacionados a danos na cultura da cana-de-açúcar, são pertencentes aos gêneros *Meloidogyne* e *Pratylenchus* (nematoide das galhas e das lesões, respectivamente) (CHAVES et al., 2016; BELLE et al., 2014), cujos prejuízos causados variam com a densidade populacional no solo, condições ambientais, com o grau de resistência/suscetibilidade das plantas e com presença de outros patógenos que podem interagir com esses organismos fitoparasitas. Devido à ampla distribuição no território brasileiro, a severidade e danos causados pela meloidoginose, constitui um dos maiores desafios do setor sucroalcooleiro (SILVA et al., 2012). As áreas infestadas pelos nematoides podem se tornar economicamente inviáveis para novos cultivos, tornando a exploração das culturas suscetíveis, como a cana-de-açúcar, insustentáveis nesses locais (DINARDO-MIRANDA et al., 2005; DINARDO-MIRANDA et al., 2008).

Levantamentos realizados em diferentes regiões do país, frequentemente observa-se cada vez mais elevada a densidade populacional desses fitoparasitas. Considerando-se os dados de levantamentos nematológicos em diferentes regiões canavieira do país (NOVARETTI et al., 1998; MOURA et al., 1999, 2000; CHAVES et al., 2009a; SEVERINO; DIAS-ARIEIRA; TESSMANN, 2010), pode-se afirmar que mais de 70% das áreas cultivadas, estão infestadas por uma ou mais espécies de grande importância econômica. Na região nordeste, Chaves et al. (2009a) identificaram as espécies *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood, *M. javanica* (Treb) Chitwood e *P. zae* Graham, após levantamento de espécies do gênero *Meloidogyne* e *Pratylenchus* em canaviais no Estado de Pernambuco e caracterização por padrões perineais e estudos com a isoenzima esterase (MOURA et al., 2000).

Pesquisas voltadas para métodos de controle, têm sido realizadas nos últimos anos, na tentativa de diminuir as populações de nematoides abaixo do nível de dano econômico (CHAVES et al., 2016; DINARDO-MIRANDA et al., 2010), para tornar o processo produtivo mais racional, eficiente e econômico. Na prática, a eficiência

desses métodos é frequentemente questionável quando usada isoladamente (CHAVES et al., 2009b).

A aplicação de nematicidas químicos, como o benfuracarbe 400 g/L (Pottente®) diminuem o número da população de nematoides favorecendo o aumento da produtividade na cultura da cana-de-açúcar em solos infestados. Contudo, o uso de nematicidas químicos no plantio, é bastante comum, resultando em um acréscimo de até 50 % na produtividade (DINARDO-MIRANDA et al., 2005; NOVARETTI; REIS, 2009). Entretanto o uso de nematicidas químicos nem sempre apresentam resultados aceitáveis, demonstrando desse modo a necessidade de pesquisas na área (BARROS et al., 2000, 2003).

A resistência de pragas a defensivos agrícolas, e os elevados custos desses produtos têm estimulado a busca por alternativas sustentáveis e menos agressivas ao meio ambiente, além de um menor impacto financeiro à agricultura. Produtos derivados da *Azadirachta indica* (nim) têm a vantagem de apresentar baixa toxicidade e serem rapidamente degradados no solo e nas plantas, não necessitando de um período de carência (ISMAN, 2006). Além disso, o óleo de nim apresenta efeito repelente a muitos organismos e possuem propriedades antivirais e antibacterianas (BAUMER, 1983), bem como afeta o comportamento, o desenvolvimento e a reprodução das espécies-alvo, principalmente através da ingestão (SCHMUTTERER, 1990).

Chaves et al. (2009b) avaliaram a eficiência do óleo de nim e torta de filtro, sobre a densidade populacional de nematoides da cana-de-açúcar em canavial do nordeste brasileiro, concluíram que o óleo de nim a 4 L ha⁻¹ foi efetiva no controle de *P. zaeae*, podendo o mesmo ser utilizada no manejo desse nematoide em cana-de-açúcar. A azadiractina é o principal ingrediente ativo com propriedade inseticida presente na planta de nim, um tetranortriterpenóide ativo no controle de pragas (NEVES et al., 2003). Uma formulação comercial derivada da planta de nim à base de azadiractina (Azamax®) é introduzida no mercado nacional, sendo um dos produtos registrados para o controle de pragas na agricultura (AGROFIT, 2016).

Como a utilização de nematicidas químicos estão associados aos impactos ambientais e sociais, pesquisas com agentes de biocontrole adquiriram maior importância (QIUHONG et al., 2006; VAZ et al., 2011). Algumas espécies microbianas, foram avaliadas como potencial para utilização no controle dos fitonematoides interferindo no ciclo desses parasitas no solo (KAVITHA;

JONATHAN; UMAMAHESWARI, 2007; SOUSA et al., 2006). Dentre os microrganismos utilizados no controle de patógenos de solo, o *Bacillus subtilis* é o mais estudado (BETTIOL et al., 2009). Cardozo e Araújo (2011) relataram que, o *Bacillus subtilis* além de promover o crescimento das plantas, contribuiu com a redução da população de nematoides do gênero *Meloidigine* em cana-de-açúcar. O Nemix® (coquetel de bactérias formuladas em pó) é um produto comercial, que apresenta em sua composição $3,2 \times 10^{10}$ UFC g⁻¹ (correspondendo a 32 bilhões de bactérias viáveis por grama do produto): $1,6 \times 10^{10}$ UFC g⁻¹ de *Bacillus subtilis* e $1,6 \times 10^{10}$ UFC g⁻¹ de *B. licheniformis*.

Morgado et al. (2015) avaliando a eficácia e a persistência do controle biológico (*B. subtilis*) em relação à redução da comunidade *Meloidogyne* spp. e *P. zae* no solo, observaram redução na infestação de nematoide na raiz da cana-de-açúcar. Kavitha, Jonathan e Umamaheswari (2007), estudando o mesmo efeito do *B. subtilis* sobre *Meloidogyne incognita*, em beterraba açucareira, concluíram que o aumento na atividade de enzimas de defesas em plantas quando tratadas com *B. subtilis* pode ter contribuído para o controle do parasita. Em outro trabalho, avaliando o controle biológico proporcionado por *B. subtilis*, apresentou uso potencial para programas de manejo integrado da meloidoginose em tomateiro reduz a reprodução dos nematoides da galha em raiz (ARAÚJO; MARCHESI, 2009).

2.4 Uso da quitosana no Controle de nematoide

O método mais utilizado para o controle desses fitopatógenos é o químico. Entretanto, o intensivo uso de produtos químicos nas últimas décadas vem criando inúmeros problemas como resistência microbiana, contaminação ambiental e elevação dos custos de produção. Portanto, métodos alternativos de controle de nematoides ou nematicidas menos tóxicos precisam ser desenvolvidos (BRAGA JUNIOR et al., 2017).

A quitina é dos principais constituintes do exoesqueleto de invertebrados marinhos, como, carapaças de camarões e caranguejos, sendo esta uma das principais fontes de extração comercial desse polímero (AL SAGHEE et al., 2009; DEEPMALA et al., 2014). Outra fonte de extração de alto potencial é a parede celular fúngica, pois alguns fungos, principalmente da Ordem Mucorales possuem razoável quantidade de quitina na estrutura de sua parede celular, como é o caso

dos incluídos na classe dos Zygomycetes (FAI et al., 2008; FRANCO et al., 2011; DIAS et al., 2013).

A aplicação de quitina no solo aumenta a população de microrganismos quitinolíticos que pode levar a supressão de fitonematoides no solo, através da produção de barreiras físicas (CASTRO; FLORES; URIBE, 2011). Mercer et al. (1992) estudando o efeito de quitinases vegetais e microbianas nos ovos e juvenis de *Meloidogyne hapla* Chitwood, verificou que a quitinase aumentou as taxas de eclosão de ovos de nematoides, mas causou a morte de juvenis. A quitina pode atuar como importante fonte de carbono e sinalizar moléculas para regular a produção de quitinase (CHEN et al., 2015), no entanto, até o momento, informações sobre o mecanismo nematicida da quitinase são limitadas na literatura (YANG et al., 2013). A estrutura complexa e o sistema multicomponente de quitina dificultam a compreensão se o mecanismo de ação da quitinase é diferente ou o mesmo em fungos, insetos e nematoides (CHEN et al., 2017).

Avaliando o efeito de um vermicomposto enriquecido com quitina na infecção por *Meloidogyne incognita* em tomate em casa de vegetação, Castro, Flores e Uribe (2011) observaram a redução da reprodução de nematoides na cultura e indicaram que o efeito nematicida seria devido a atividade quitinolítica derivada da adição ao solo do composto com quitina, fator relevante na redução da população de nematoides no solo.

A quitosana é um derivado desacetilado de polissacarídeo da quitina, onde o processo de obtenção de quitosana a partir da biomassa de fungos apresenta como vantagens, em relação ao método convencional em laboratório, o baixo custo de obtenção, reduzida produção de resíduos, menor agressão ao ambiente, e não apresentar limitações sazonais (BERGER et al., 2012).

Biopolímero do tipo polissacarídeo, a quitosana, apresenta uma estrutura quimicamente similar à celulose, diferenciando apenas nos grupos funcionais, onde a quitosana apresenta grupos amina (NH_2) ao invés dos grupos hidroxila (OH) que estão presentes na celulose (AZEVEDO et al., 2007). A extração desse polissacarídeo se dá através da desacetilação alcalina da quitina, e tem um amplo potencial para aplicações em razão de uma variedade de propriedades dentre elas, biodegradabilidade, biocompatibilidade, atividade antimicrobiana e atoxicidade (YANG et al., 2009; BERGER et al., 2011; SILVA et al., 2015).

Características como solubilidade em soluções de ácidos orgânicos, insolubilidade em água e em ácidos concentrados, possibilitam a quitosana atuar em diferentes áreas, devido a sua natureza policatiónica e a sua capacidade de se transformar fisicamente, atuando de diferentes formas e finalidades, tais como na forma de pó, microesferas, nanopartículas, mostrando assim suas principais características (KONG et al., 2010; SANTOS et al., 2011; SILVA et al., 2015).

Aplicada em diversas áreas, a quitosana tem sido utilizada com frequência na agricultura, na biotransformação e detecção de pesticidas (DU et al., 2007; STAMFORD et al., 2008); como propriedade antifúngica, e na indução de resistência relacionada à produção de enzimas (glucanases, quitinases e peroxidases) envolvidas na resistência da planta às doenças e aos insetos (BOONLERTNIRUN; BOONRAUNG; SUVANASARA, 2008; DI PIERO, GARDA, 2008; BERGER et al., 2011). Além disso, a quitosana pode ser utilizada como fonte de carbono para os microrganismos do solo, acelerando a mineralização da matéria orgânica e a disponibilização de nutrientes (BOONLERTNIRUN; BOONRAUNG; SUVANASARA, 2008), favorecendo também a nodulação em plantas leguminosas (BERGER et al., 2013).

Outros estudos demonstraram que a quitosana reduziu significativamente a severidade de doenças, como: antracnose em feijão (*Phaseolus vulgaris*), ocasionada por *Colletotrichum lindemuthianum* (DI PIERO; GARDA, 2008), na murcha do crisântemo, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* (PINTO; BETTIOL; MORANDI, 2010) e no crescimento micelial *in vitro*, em diversos fungos patogênicos como: *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* sp., *Elsione ampelina*, *Penicillium* sp. e *Rhizoctonia solani* (BOTELHO et al., 2010; MAIA et al., 2010; FREDDO et al., 2014; BERGER et al., 2016). A atividade de enzimas relacionadas com a patogenicidade em morangueiro, através da adição de quitosana de crustáceo foi constatada por Mazaro et al. (2012), os quais verificaram que a quitosana atua na resistência sistêmica adquirida, ativando as PRPs, β -1,3-glucanase e a quitinase.

Segundo Berger et al. (2016), além de favorecer o crescimento e proteção das plantas contra o ataque de patógenos, a quitosana ativa a defesa no tecido vegetal. Tem sido relatado que a quitosana apresentou indução dos mecanismos de resistência de plantas de tomate contra o nematoide de galhas, *M. incognita* (RADWAN et al., 2012). Melo et al. (2012) estudando o efeito da quitosana como

indutor de resistência ao *M. incognita* em tomateiro, verificaram a redução do fator reprodução do patógeno e no número de ovos em todas as doses aplicadas. O modo de ação da quitosana como indutor de resistência é atribuído a biossíntese de lignina e lignificação da parede celular, acúmulo de quitinases, além da síntese de moléculas envolvidas nos caminhos de sinalização intracelular que conduzem à ativação de outras respostas de defesa (BERGER et al., 2013; MELO et al., 2012).

REFERÊNCIAS

AGROFIT. **Site Ministério da Agricultura e Pecuária**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 18 jul. 2016.

ALBUQUERQUE, A. W.; SÁ, L. A.; RODRIGUES, W. A. R.; MOURA, A. B.; OLIVEIRA FILHO, M. S. Growth and yield of sugarcane as a function of phosphorus doses and forms of application. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.20, n.1, p.29-35, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v20n1p29-35>>.

ALMEIDA, H. J.; PANCELLI, M. A.; PRADO, R. M.; CAVALCANTE, V. S.; CRUZ, F. J. R. Effect of potassium on nutritional status and productivity of peanuts in succession with sugar cane. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162015005000001>>.

AL SAGHEER, F. A.; AL-SUGHAYER, M. A.; MUSLIM, S.; ELSABEE, M. Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 77, n. 2, p. 410-419, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.01.032>>.

ANDRADE, M. M. M.; STAMFORD, N. P.; FREITAS, A. D. S.; SANTOS, C. E. R. S.; SOUSA, C. A. ; LIRA JÚNIOR, M. A. Effects of biofertilizer with diazotrophic bacteria and mycorrhizal fungi on the soil attribute cowpea nodulation, yield and nutrient uptake in field conditions. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 161, p. 374-379, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.08.019>>.

ARAÚJO, F. F.; MARCHESI, G. V. P. Uso de *Bacillus subtilis* no controle da meloidoginose e na promoção do crescimento do tomateiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n. 5, p.1558-1561, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782009000500039>>.

ARAÚJO, F. F.; TIRITAN, C. S.; PEREIRA, H. M.; CAETANO JÚNIOR, O. Desenvolvimento do milho e fertilidade do solo após aplicação de lodo de curtume e fosforita. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 12, n. 05, p. 507-511, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662008000500011>>.

ASSUNÇÃO, A.; SANTOS, L. D. C.; ROCHA, M. R.; REIS, A. J. D. S.; TEIXEIRA, R. A.; LIMA, F. S. D. O. Efeito de Indutores de Resistência sobre *Meloidogyne incognita* em Cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 34, p. 56-62, 2010.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.

BAREA, J.M. Future challenges and perspectives for applying microbial biotechnology in sustainable agriculture based on a better understanding of plant-microbiome interactions. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 15, n. 2, p. 261-282, 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162015005000021>>.

BARROS, A. C. B.; MOURA, R. M.; PEDROSA, E. M. R. Influência da aplicação conjunta de nematicida com calcário, cupinicida ou torta de filtro na eficiência do nematicida em cana-de-açúcar. In: Congresso Brasileiro de Nematologia, 24, Petrolina, **Anais...** Petrolina: EMBRAPA, 2003. p. 236. CD-Rom

BARROS, A. C. B.; MOURA, R. M.; PEDROSA, E. M. R. Aplicação de Terbufos no controle de *Meloidogyne incognita* Raça 1 e *Pratylenchus zaeae* em cinco variedades de Cana-de-açúcar no Nordeste. Parte 1 – Efeitos na cana planta. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 24, p. 73-78, 2000.

BASTOS, A. L.; COSTA, J. P. V.; SILVA, I. F.; RAPOSO, R. W. C.; SOUTO, J. S. Influência de doses de fósforo no fluxo difusivo em solos de Alagoas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.12, p.136-142, 2008.

BAUMER, M. 1983. **Notes on Trees and Shrubs in Arid and Semi-arid Regions**. FAO, p. 280.

BELLE, C.; KULCZYNSKI, S. M.; GOMES, C. B.; E KUHN, P. R. Fitonematoides associados à cultura da cana-de-açúcar no Rio Grande do Sul, Brasil. **Nematropica**, Florida, v. 44, n. 2, p. 207-217, 2014.

BERGER, L. R. R.; STAMFORD, N. P.; WILADINO, 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 crustacean chitosan and by biomass and chitosan obtained from *Cunninghamella elegans*. **Biological Control**, Amsterdam, v. 92, p. 45-54, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.09.006>>.

BERGER, L. R. R.; STAMFORD, N. P.; 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**, Temuco, v.13, n. 3, p. 592-603, 2013. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162013005000047>>.

BERGER, L. R. R.; CAVALCANTE, H. M. M.; STAMFORD, T. C. M.; SILVA, M. C. F.; OLIVEIRA, C. E. V.; SARMENTO, B. F. C. C.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. **Chitin and chitosan produced by *Cunninghamella elegans* using alternative medium-coconut water**. *Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges*. 2012. p. 377.

BERGER, L. R. R.; STAMFORD, T. C. H. M.; STAMFORD, N. P. Perspectivas para uso da quitosana na agricultura. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, País Vasco, v.12, n.4, 2011. Disponível em: <<http://www.ehu.es/reviberpol/pdf/AGO11/ramos.pdf>>.

BETTIOL, W.; GHINI, R.; MARIANO, R. R. L.; MICHEREFF, S. J.; MATTOS, L. P. V.; ALVARADO, I. C. M.; PINTO, Z. V. Supressividade a fitopatógenos habitantes do solo. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas**. Jaguariúna: EMBRAPA. 2009. p. 187-208.

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

BOTELHO, R.V.; MAIA, A. J.; RICKLI, E. H.; LEITE, C. D.; FARIA, C. M. D. R. Quitosana no controle de *Penicillium* sp. na pós colheita de maçãs. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v.5, n. 2, p.200-206, 2010.

BRAGA JUNIOR, G. M.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; CHAGAS, L. F. B.; CARVALHO FILHO, M. R.; MILLER, L. O.; SANTOS, G. R. Controle biológico de fitopatógenos por *Bacillus subtilis* in vitro. **Biota Amazônica**, Macapá, v.7, n.3, p. 45-51, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v7n3p45-51>>.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira cana-de-açúcar**. Brasília, v. 4, SAFRA 2017/18 n.4, Quarto levantamento – ABRIL 2018, 2018. p. 1-73.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pecuária Agropecuária. 2006. **Cultivo de Tomate para Industrialização - Doença**. Sistemas de Produção, 1 – 2ª Edição. Embrapa Hortaliças. Versão eletrônica. Dez. 2006. Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial_2ed/doencas_nema.htm>. Acesso em: 18 jun. 2018.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores: Estatística da Produção Agrícola**. 2017. 72 p.

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Cana-de-açúcar**. 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>>. Acesso em: 12/06/2018.

CADET, R.; SPAULL, V.W. Nematodes parasites of sugarcane. In: Luc, M.; Sikora, R.A.; Bridge, J. (Eds.). **Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture**. 2ª ed. Cambridge: CABI Publishing, 2005. p. 645-674.

CALHEIROS, A. S.; OLIVEIRA, M. W.; FERREIRA, V. M.; BARBOSA, G. V. S.; COSTA, J. P. V.; LIMA, G. S. A.; ARISTIDES E. V. S. Acúmulo de nutrientes e produção de sacarose de duas variedades de cana-de-açúcar na primeira rebrota, em função de doses de fósforo. **Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil - Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 29, n. 3, 26-29, 2011.

CARDOZO, R.B.; ARAÚJO, F.F. Multiplicação de *Bacillus subtilis* em vinhaça e viabilidade no controle da meloidoginose, em cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.15, n.12, p.1283-1288, 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662011001200010>>.

CASTRO, L.; FLORES, L.; URIBE, L. Efecto del vermicompost y quitina sobre el control de *Meloidogyne incognita* en tomate a nivel de invernadero. **Agronomía Costarricense**, San Pedro de Montes de Oca, v. 35, n. 2, p. 21-32, 2011.

CHAVES, A.; PEDROSA, E. M. R.; WILADINO, L. G.; CARDOSO, M. S. O. Activation of resistance to *Meloidogyne incognita* in sugarcane treated with pyraclostrobin. **Nematoda**, Piracicaba, v.3, n.1, p. 1-7. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4322/nematoda.00516>>.

CHAVES, A.; MARANHÃO, S. R. V. L.; PEDROSA, E. M. R.; GUIMARÃES, L. M. P.; OLIVEIRA, M. K. R. S. Incidência de *Meloidogyne spp.* e *Pratylenchus sp.* em cana-de-açúcar no Estado de Pernambuco, Brasil. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.33, n. 4, p. 278-280, 2009a.

CHAVES, A.; PEDROSA, E. M. R.; GUIMARÃES, L. M. P.; MARANHÃO, S. R. V. L.; OLIVEIRA, M. K. R. S. Utilização de Produtos Alternativos no Manejo de Nematoides da Cana-de-açúcar no Estado de Pernambuco. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.33, n. 3, p. 260-264, 2009b.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; ABREU, H. M. C.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J. C.; BURNQUIST, W. L.; CRESTE, S.; ULIAN, E. C. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical plant biology**, Kunia, v. 4, p. 62-89, 2011.

CHEN, J.; AN, Y.; KUMAR, A.; LIU, Z. Improvement of chitinase Pachi with nematicidal activities by random mutagenesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, Colorado, v. 96, p. 171-176, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.093>>.

CHEN, L., JIANG, H., CHENG, Q., CHEN, J., WU, G., KUMAR, A., SUN, M., LIU, Z. Enhanced nematicidal potential of the chitinase pachi from *Pseudomonas aeruginosa* in association with Cry21Aa. **Scientific Reports**, Bethesda, v. 5, 1-11; 2015. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/srep14395>>.

DEEPMALA, K.; HEMANTARANJAN, A.; BHARTI, S.; NISHANT BHANU, A. A Future Perspective in Crop Protection: Chitosan and its Oligosaccharides. **Advances in Plants & Agriculture Research**, Edmond, v. 1, n. 1, p. 23-30, 2014. Disponível em: < <https://doi.org/10.15406/apar.2014.01.00006>>.

DIAS, K. B.; SILVA, D. P.; FERREIRA, L. A.; FIDELIS, R. R.; COSTA, J. L.; SILVA, A. L. L.; SCHEIDT, G. N. Chitin and chitosan: Characteristics, uses and production current perspectives. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 4, n. 3, p. 184-191, 2013.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; FRACASSO, J. V.; COSTA, V. P. Influência da época de aplicação de nematicidas em soqueiras colhidas em início de safra sobre as populações de nematoides e a produtividade da cana-de-açúcar. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 34, n. 2, p. 106-117, 2010.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; PIVETTA, J. P.; FRACASSO, J. V. Influência da época de aplicação de nematicidas em soqueiras sobre as populações de nematoides e a produtividade da cana-de-açúcar. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 1, p.179-190, 2008. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052008000100022>>.

DINARDO-MIRANDA, L. L. **Nematoides e pragas de solo em cana-de-açúcar**. Centro de Cana do Instituto Agrônomo, Ribeirão Preto, v. 110, 2005, p. 25-32.
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**, Brasília, v. 43, p. 1121-1128, 2008.

DÖBEREINER, J. **Enriquecimento do composto do lixo com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico**. Instituto de Pesquisa Agropecuária (Comunicado Técnico n. 11). Rio de Janeiro. 1961, p. 10.

DU, D.; DING, J.; CAI, J.; ZHANG, A. Determination of carbaryl pesticide using amperometric acetylcholinesterase sensor formed by electrochemically deposited chitosan. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Ontario, v. 58, p. 145-150, 2007.

FACCIN, G. L.; MIOTTO, L. A.; NASCIMENTO VIEIRA, L.; BARRETO, P. L. M.; AMANTE, E. R. Chemical, sensorial and rheological properties of a new organic rice bran beverage. **Rice Science**, Beijing, v. 16, p. 226-234, 2009. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1672-6308\(08\)60083-9](https://doi.org/10.1016/S1672-6308(08)60083-9)>.

FAI, A. E. C.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. Quitosanos em alimentação. **Iberoamericana de Polímeros**, La Rioja, v. 9, n. 5, p.435-451, 2008.

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**, São Paulo, v. 54, p. 70-78, 2011.

FREDDO, Á. R.; MAZARO, S. M; BRUN, E. J.; WAGNER JÚNIOR, A. A quitosana como fungistático no crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 1, p. 1-4, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782014000100001>>.

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L. O.; FERRAZ, S. Nematoides como patógenos de plantas. In: ZAMBOLIM, L.; JESUS JUNIOR, W.C.; PEREIRA, O.L. **O essencial da fitopatologia: agentes causais**. Volume 2. Viçosa, MG: UFV, DFP, 2012. p. 417.

GUELFY-SILVA, D. R.; MARCHI, G.; SPEHAR, C. R.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V. Agronomic efficiency of potassium fertilization in lettuce fertilized with alternative nutrient sources. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 44, n. 2, p. 267-277, 2013.

HOLANDA, J. S.; SILVA, J. R.; FREITAS, J. A. D. Fertilidade do solo, nutrição e adubação do meloeiro. In: BRAGA SOBRINHO, R.; GUIMARÃES, J. A.; FREITAS, J. A. D.; TERAPO, D. **Produção integrada de melão**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 2008. p.127-137.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.51, p.45-66, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151146>>.

JEHANGIR, I. A.; MIR, M. A.; BHAT, M. A.; AHANGAR, M. A. Biofertilizers an Approach to Sustainability in Agriculture: A Review. **International Journal of Pure and Applied Bioscience**, New Delhi, v. 2017, n. 5, p. 327-334. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.18782/2320-7051.5011>>.

KAVITHA, J.; JONATHAN, E. I.; UMAMAHESWARI, R. Field application of *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* and *Trichoderma viride* for the control of *Meloidogyne incognita* in sugarbeet. **Journal of Biological Control**, Bangalore, v.21, p. 211-215, 2007.

KONG, M.; CHEN, X. G.; XING, K. E.; PARK, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, Grugliasco, v. 144, p. 51-63, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012>>.

KORNDÖRFER, G. H.; MELO, S. P. Fontes de fósforo (fluida ou sólida) na produtividade agrícola e industrial da cana-de-açúcar. **Revista Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 92-97, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542009000100013>>.

KORNDÖRFER, G.H.; OLIVEIRA, L. A. O potássio na cultura da cana-de-açúcar. In Yamada, T., e T.L. Roberts (eds.) **Potássio na agricultura brasileira**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), Piracicaba, São Paulo, Brasil, 2005. p. 469-490.

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 Journal of Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 26, n. 10, p. 1769-1775, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-010-0357-z>>.

- MAIA, A. J.; BOTELHO, R. V.; FARIA, C. M. D. R.; LEITE, C. D. Ação de quitosana sobre o desenvolvimento de *Plasmopora viticola* e *Elsione ampelina*, *in vitro* e em videiras cv. 'Isabel'. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.36, p.203-209, 2010.
- MAZARO, S. M.; GOUVEA, A.; WAGNER JUNIOR, A.; CITADIN, I. Enzimas associadas a indução de resistência em morangueiro pelo uso de quitosana e acibenzolar-s-metil. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, Guarapuava, v. 14, p. 91-99, 2012.
- MEDEIROS, J. S.; OLIVEIRA, F. H. T.; SANTOS, H. C.; ARRUDA, J. A.; VIEIRA, M. D. S. Formas de potássio em solos representativos do Estado da Paraíba. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 45, n. 2, p. 417-426, 2014.
- MEDINA, N. H.; BRANCO, M. L. T.; SILVEIRA, M. A. G.; SANTOS, R. B. B. Dynamic distribution of potassium in sugarcane. **Journal of Environmental Radioactivity**, Manitoba, v. 126, p. 172-175, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2013.08.004>>.
- MEGALI, L.; GLAUSER, G.; RASMANN, S. Fertilization with beneficial microorganisms decreases tomato defenses against insect pests. **Agronomy for Sustainable Development**, Dordrecht, v. 34, n. 3, p. 649-656, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13593-013-0187-0>>.
- MELO, T. A.; SERRA, I. M. R. S.; SILVA, G. S.; SOUSA, R. M. S. Produtos naturais aplicados para manejo de *Meloidogyne incognita* em tomateiros. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.38, n.3, p. 223-227, 2012.
- MELO, V. F.; CORRÊA, G. F.; MASCHIO, P. A.; RIBEIRO, A. N.; LIMA, V. C. Importância das espécies minerais no potássio total da fração argila de solos do Triângulo Mineiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, p. 807-819, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832003000500005>>.
- MERCER, C.; GREENWOOD, D.; GRANT, J. Effect of plant and microbial chitinases on the eggs and juveniles of *Meloidogyne hapla* Chitwood (Nematoda: Tylenchida). **Nematologica**, Boston, v. 38, n. 1-4, p. 227-236, 1992. Disponível em: <<https://doi.org/10.1163/187529292X00199>>.
- MORGADO, T. D. T.; GUERRA, J. T.; ARAUJO, F. F.; MAZZUCHELLI, R. C. L. Effectiveness and persistence of biological control of nematodes in sugarcane. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 10, n. 49, p. 4490-4495, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5897/AJAR2015.10344>>.
- MOURA, R. M.; PEDROSA, E. M. R.; MARANHÃO, S. R. V. L.; MACEDO, M. E. A.; MOURA, A. M.; SILVA, E. G.; LIMA, R. F. Ocorrência dos nematoides *Pratylenchus zae* e *Meloidogyne* spp. em cana-de-açúcar no Nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 101-103, 2000.

MOURA, R. M.; PEDROSA, E. M. V.; MARANHA, S. R. V. L.; MOURA, A. M.; MACEDO, M. E. A.; SILVA, E. G. Nematoides associados à cana-de-açúcar no Estado de Pernambuco, Brasil. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 23, n.2, p. 92-99, 1999.

NEVES, B. P.; OLIVEIRA, I. P. & NOGUEIRA, J. C. M. **Cultivo e Utilização do Nim Indiano**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Goiânia (GO), (Circular técnica, 62). 2003. p. 12.

NIEVES-CORDONES, M.; ALEMÁN, F.; MARTÍNEZ, V.; RUBIO, F. K⁺ uptake in plant roots. The systems involved, their regulation and parallels in other organisms. **Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 171, n. 8, p. 688-695, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.09.021>>.

NOVARETTI, W. R. T.; MONTEIRO, A. R.; FERRAZ, L. C. C. B. Controle químico de *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus zaeae* em cana-de-açúcar com carbofuran e terbufós. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 22, n. 1, p. 60-74, 1998.

NOVARETTI, W. R. T.; REIS, A. M. Influência do método de aplicação de nematicidas no controle de *Pratylenchus zaeae* em soqueiras de cana-de-açúcar e definição dos níveis de dano e de controle. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 33, p. 83-89. 2009.

OLIVEIRA, E. C. A.; FREIRE, F. J.; OLIVEIRA, R. I. D.; FREIRE, M. B. G. S.; SIMÕES NETO, D. E.; SILVA, S. A. M. D. Extração e exportação de nutrientes por variedades de cana-de-açúcar cultivadas sob irrigação plena. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, n. 4, p. 1343-1352, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-06832010000400031>>.

OLIVEIRA, F. L. N.; OLIVEIRA, W. S.; STAMFORD, N. P.; SILVA, E. V. N.; SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S. Effectiveness of biofertilizer enriched in N by *Beijerinckia indica* on sugarcane grown on an Ultisol and the interactive effects between biofertilizer and sugarcane filter cake. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 17, n. 4, p. 1040-1057, 2017a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162017000400015>>.

OLIVEIRA, F. L. N.; STAMFORD, N. P.; SIMOES NETO, D. E.; OLIVEIRA, E. C. A.; OLIVEIRA, W. J.; SANTOS, C. E. R. E. 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**, Brisbane, v. 9, n. 6, p. 504-508, 2015.

OLIVEIRA, W. S.; COELHO, I. L.; OLIVEIRA, J. R. S.; LEITE, M. C. B. S.; ARNAUD, T. M. S.; STAMFORD, N. P.; SILVA, E. V. N. Biological control of the bacterial wilt *Ralstonia solanacearum* by bioprotector with fungi chitosan from *Cunninghamella elegans* on tomatoes. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 12, n. 1, p. 42-49, 2017b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5897/AJAR2016.11748>>.

OLIVEIRA, W. S.; STAMFORD, N. P.; SILVA, E. V. N.; SANTOS, C. E. R. S.; 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**, Brisbane, v. 8, n. 7, p. 1124-1131, 2014.

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**, Viçosa, v. 35, n. 1, p.16-23, 2010.

QIUHONG, N.; XIAOWEI, H.; BAOYU, T.; JINKUI, Y.; JIANG, L.; LIN, Z.; KEQIN, Z. *Bacillus* sp. B16 kills nematodes with a serine protease identified as a pathogenic factor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Münster, v. 69, n. 6, p. 722-730, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-005-0019-5>>.

RADWAN, M. A.; FARRAG, S. A. A.; ABU-ELAMAYEM, M. M.; AHMED, N. S. Extraction, characterization, and nematicidal activity of chitin and chitosan derived from shrimp shell wastes. **Biology and Fertility of Soils**, Dordrecht, v. 48, n. 4, p. 463-468, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00374-011-0632-7>>.

RAZA, M. A. S.; SALEEM, M. F.; SHAH, G. M.; KHAN, I. H.; RAZA, A. Exogenous application of glycinebetaine and potassium for improving water relations and grain yield of wheat under drought. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 14, n. 2, p. 348-364, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162014005000028>>.

REIS JUNIOR, R. F. B.; SILVA, M. F.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, p. 103-113, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832004000100011>>.

REIS, V. M.; PEREIRA, W.; HIPÓLITO, G. D. S. **Métodos de aplicação de bactérias diazotróficas em cana planta para fins de determinação da eficiência agrônômica**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico 117, 2009. p. 1-4.

RIDESA - Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. **Catálogo nacional de variedades "RB" de cana-de-açúcar**. Curitiba, 2010. 136 p.

ROCHA, F. R.; PAPINI-TERZI, F. S.; NISHIYAMA, M. Y., JR., VENCIO R. Z.; VICENTINI, R.; DUARTE, R. D.; ROSA, V. E. de, JR., VINAGRE F., BARSALOBRES, C.; MEDEIROS, A. H.; RDORIGUES, F. A.; ULIAN, E. C.; ZINGARETTI, S. M.; GALBIATTI, J. A.; ALMEIDA, R. S.; FIGUEIRA, A. V. O.; HEMERLY, A. S.; SILVA-FILHO, M. C.; MENOSSI, M.; SOUZA, G. M. Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. **BMC genomics**, Toledo, 2007, 8:71. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-8-71>>.

SANTOS, D. H.; SILVA, M. A.; TIRITAN, C. S.; FOLONI, J. S. S.; ECHER, F. R. Qualidade tecnológica da cana-de-açúcar sob adubação com torta de filtro enriquecida com fosfato solúvel. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 15, n. 5, p. 443-449, 2011.

SANTOS, V. B.; ARAUJO, S. F.; LEITE, L. F.; NUNES, L. A.; MELO, J. W. Soil microbial biomass and organic matter fractions during transition from conventional to organic farming systems. **Geoderma**, Beijing, v. 170, p. 227-231, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2011.11.007>>.

SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticide from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.35, p.271-297, 1990. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.en.35.010190.001415>>.

SCHULTZ, N.; LIMA, E.; PEREIRA, M. G.; ZONTA, E. Efeito residual da adubação na cana planta e da adubação nitrogenada e potássica na cana soca colhidas com e sem a queima da palhada. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, p. 811-820, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832010000300023>>.

SEVERINO, J. J.; DIAS-ARIEIRA, C. R.; TESSMANN, D. J. Nematodes associated with sugarcane (*Saccharum* spp.) in sandy soils in Parana, Brazil. **Nematropica**, Florida, v. 40, p. 111-119, 2010.

SILVA, A. P.; PEDROSA, E. M. R.; CHAVES, A.; MARANHÃO, S. R. V. L.; GUIMARÃES, L. M. P.; ROLIM, M. M. Reação de variedades de cana-de-açúcar ao parasitismo de *Meloidogyne incognita* e *M. enterolobii*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.7, p.814-819, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5039/agraria.v7isa2276>>.

SILVA, J. F. M.; PRADO, G.; MADEIRA, J. E. G. C.; OLIVEIRA, M. S.; FARACO, A. A. G.; MALTA, C. M.; NICOLI, J. R.; PIMENTA, R. S. Utilização de filme de quitosana para o controle de aflatoxinas em amendoim. **Bragantia**, Campinas, v. 74, n. 4, p. 467-475, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1678-4499.0120>>.

SILVA, V. S. G.; OLIVEIRA, M. W.; OLIVEIRA, D. C.; OLIVEIRA, T. B. A.; PEREIRA, M. G.; NOGUEIRA, C. H. C. Nutritional diagnosis of sugarcane varieties in a Yellow Oxisol during three agricultural seasons. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 12, n. 1, p. 50-57, 2017a. Disponível em: <<https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11865>>.

SILVA, V. S. G.; OLIVEIRA, M. W.; SILVA, A. C.; SILVA, A. F.; GALVÃO, E. R.; SANTANA, M. B. Agro-industrial quality in plant, first and second ratoon crops of sugarcane varieties. **Australian Journal of Crop Science**, Brisbane, v. 9, n. 10, p. 915-924, 2017b. Disponível em: <<https://doi.org/10.21475/ajcs.17.11.09.pne688>>.

SIMÕES NETO, D. E.; OLIVEIRA, A. C.; ROCHA, A. T.; FREIRE, F. J.; FREIRE, M. B. G. S.; NASCIMENTO, C. W. A. Características agroindustriais da cana-de-açúcar em função da adubação fosfatada, em solos de Pernambuco. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 16, n. 4, p. 347-354, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662012000400003>>.

SOUSA, C. S.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. S.; ALMEIDA, G. M. C. O. Estreptomicetos no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n. 12, p.1759-1766, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2006001200010>>.

STAMFORD, N. P.; SILVA JUNIOR, 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 biofertilizers with diazotrophic bacteria and fungi chitosan. **Australian Journal of Crop Science**, Brisbane, v. 8, n. 2, p. 301-306, 2014.

STAMFORD, N. P. ; SILVA JUNIOR ; SANTOS, C. E. R. S. ; FREITAS, A. D. S. ; LIRA JÚNIOR, M. A. ; BARROS, CAVALCANTI, M. F. Cowpea nodulation, biomass yield and nutrient uptake, as affected by biofertilizers and rhizobia, in a sodic soil amended with *Acidithiobacillus*. **Acta Scientiarum. Agronomy (Online)**, Maringá, v. 35, n. 4, p. 454-459, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v35i4.16994>>.

STAMFORD, N. P.; MOURA, P. M.; LIRA JUNIOR, M. A.; SANTOS, C. E. R. S.; DUENHAS, L. H.; GAVA, C. A. T. Chemical attributes of an Argisol of the Vale do São Francisco after melon growth with phosphate and potash rocks biofertilizers. **Horticultura Brasileira**, Recife, v. 27, p. 447- 452, 2009.

STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S.; SILVA JUNIOR, S.; LIRA JUNIOR, M. A.; FIGUEIREDO, M. V. B. Effect of rhizobia and rock biofertilizers with *Acidithiobacillus* on cowpea nodulation and nutrients uptake in a tableland soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 24, n. 9, p.1857-1865, 2008a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-008-9684-8>>.

STAMFORD, N. P.; LIMA, R. A.; LIRA JUNIOR, M. A.; SANTOS, C. E. R. S. Effectiveness of phosphate and potash rocks with *Acidithiobacillus* on sugarcane yield and their effects in soil chemical attributes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 24, n. 10, p. 2061-2066, 2008b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-008-9710-x>>.

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

STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M.; FRANCO, L. O. Produção, propriedades e aplicações da quitosana na agricultura e no ambiente. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S. **Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. 1a edição, Guaíba: Agrolivros, 568 p., 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal 6th ed., Porto Alegre: Artmed. 2017. p. 888.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

TRIPTI; KUMAR, V.; ANSHUMALI. Phosphate Solubilizing Activity of Some Bacterial Strains Isolated from Chemical Pesticide Exposed Agricultural Soil. **International Journal of Engineering Research and Development**, Indianapolis, v. 3, n. 9, p. 01-06, 2012.

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

VASCONCELOS, A. C. M.; DINARDO-MIRANDA, L. L. **Dinâmica do desenvolvimento radicular da cana-de-açúcar e implicações no controle de nematoides**. Americana, SP: Ed. Adonis, 2011. p. 56.

VAZ, M. V.; CANEDO, E. J.; MACHADO, J. C.; VIEIRA, B. S.; LOPES, E. A. Controle biológico de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* com *Bacillus subtilis*. **Revista Perquirere**, Patos de Minas, v.1, n. 8, p.203-212, 2011.

XAVIER, L. F. S.; BIGATON, A.; DANELON, A. F.; SILVA, H. J. T.; MARQUES, P. V. Projeções de Custos e Rentabilidade do Setor Sucreenergético na Região Nordeste para a Safra 2015/16. **Revista iPecege**, Piracicaba, v. 2, n. 1, p. 100-110, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.22167/r.ipecege.2016.1.100>>.

YANG, F.; HU, J.J.; LI, J.L.; WU, X.L.; QIAN, Y. R. Chitosan enhances leaf membrane stability and antioxidant enzyme activities in apple seedlings under drought stress. **Plant Growth Regulation**, Penrith, v. 58, p. 131-136, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10725-009-9361-4>>.

YANG, J.; LIANG, L.; LI, J.; ZHANG, K. Nematicidal enzymes from microorganisms and their applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Münster, v.97, n. 16, p. 7081-7095, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-013-5045-0>>.

YOUSSEF, M. M. A.; EISSA, M. F. M. Biofertilizers and their role in management of plant parasitic nematodes. A review. **E3 Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research**, Milpitas, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2014.

ZHAO, S.; LI, K.; ZHOU, W.; QIU, S.; HUANG, S.; HE, P. Changes in soil microbial community, enzyme activities and organic matter fractions under long-term straw return in north-central China. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Nanning, v. 216, p. 82-88, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.09.028>>.

CAPÍTULO 01

3 USO DE BIOFERTILIZANTE DE ROCHA COMO ALTERNATIVA AO FERTILIZANTE QUÍMICO EM UMA AGRICULTURA SUSTENTÁVEL - EFEITOS NOS ATRIBUTOS QUÍMICOS E NA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO

Uso de biofertilizante de rocha como alternativa ao fertilizante químico em uma agricultura sustentável - Efeitos nos atributos químicos e na comunidade microbiana do solo

Resumo

A fertilização é um dos fatores mais importantes para melhorar as características da planta e a absorção de nutrientes. O biofertilizante a partir de rochas aumenta a disponibilidade dos nutrientes para a nutrição das plantas com baixo impacto ambiental. Entretanto, a compreensão de como as comunidades microbianas do solo e suas funções respondem às adições do biofertilizante ainda não está completa. O estudo tem como objetivo avaliar o uso de biofertilizantes produzidos a partir de rochas fosfatadas e potássicas como alternativa aos fertilizantes solúveis e na resposta das atividades enzimáticas e comunidades microbiana do solo. O experimento foi conduzido durante 30 e 60 dias, em solo original da região de Lorca (Múrcia, Espanha). Os tratamentos de adubação foram: (1) Fertilizante solúvel - 100% de dose recomendada (DR); (2) Bioprotetor - 50% DR (5 t ha^{-1}); (3) Bioprotetor - 100% DR (10 t ha^{-1}); (4) Bioprotetor - 150% (15 t ha^{-1}) e (5) Tratamento controle - sem adubação NPK. Macro e micronutrientes no solo foram analisados. Os efeitos sobre a comunidade microbiana do solo foram avaliados por análises de atributos microbianos e bioquímicos, incluindo atividades enzimáticas e ácidos graxos fosfolipídicos (PLFAs). O biofertilizante em maiores doses (100% e 150%), apresentou efeitos positivos com melhores propriedades químicas e bioquímicas, aumentando o P e K disponível, e melhorando as atividades da β -glicosidase e desidrogenase, quando comparado com os fertilizantes solúveis convencionais. Além disso, o biofertilizante promoveu um comportamento maior e significativo em comparação com o fertilizante solúvel e mostrou mudanças estruturais na comunidade microbiana, dependendo do tratamento de fertilização. Os resultados confirmaram a eficácia do biofertilizante e podem ser uma alternativa viável para promover a fertilidade do solo.

Palavras-chave: Biofertilizantes de rocha. Ecologia da comunidade. Enzimas do solo. Propriedades bioquímicas e microbiológicas.

Use of biofertilizer as an alternative to soluble fertilizer in a sustainable agriculture - Effects on chemical attributes and soil microbial community

Abstract

Fertilization is one of the most important factors to improve plant characteristics and nutrient absorption. The biofertilizer from rock increase nutrients for plant nutrition with low environmental impact. However, our understanding of how soil microbial communities and their functions respond to additions of biofertilizer is still not complete. The study aims to evaluate the use of biofertilizers produced from phosphate and potassium rocks as an alternative to soluble fertilizers and in the response of the enzymatic activities and microbial communities of the soil. The experiment was conducted for 30 and 60 days, in a soil original from the Lorca region (Murcia, Spain). The fertilization treatments were: (1) Soluble fertilizer- 100% recommended rate (RR); (2) Biofertilizer- 50% RR (5 t ha⁻¹); (3) Biofertilizer- 100% RR (10 t ha⁻¹); (4) Biofertilizer- 150% (15 t ha⁻¹) and (5) Control treatment – without NPK fertilization. Macro and micronutrients in soil were analysed. The effects on the soil microbial community were evaluated by analysis of microbial and biochemical attributes, including enzymatic activities, and phospholipid fatty acids (PLFAs). The biofertilizer in greater rates (100% and 150%), showed positive effects with best chemical and biochemical properties increasing available P and K, and improving the activities of β -glucosidase and dehydrogenase, when compared with conventional soluble fertilizers. Also, the biofertilizer promoted a greater and significant behavior compared with the soluble fertilizer and showed structural changes in the microbial community, depending on the fertilization treatment. The results confirmed the effectiveness of biofertilizer and that they may be viable alternative to promote soil fertility.

Keywords: Biochemical and microbiological properties. Community ecology. Rock biofertilizers. Soil enzymes.

3.1 Introdução

Atualmente, é evidente a preocupação com o sistema produtivo que vem sendo desenvolvido para atender as diretrizes voltadas ao desenvolvimento sustentável, objetivando o cumprimento dos três pilares fundamentais, sendo eles de cunho econômico, social e ambiental. Segundo Lal (2010), a questão da segurança alimentar global que decorre da alta taxa de crescimento da população mundial que induz pressões sobre o manejo da agricultura e como consequência, os maiores impactos do solo surgem devido à agricultura intensiva, tais como perda de matéria orgânica, depleção de nutrientes, erosão do solo e contaminação da água subterrânea (MONTEMURRO et al., 2015).

Os fertilizantes minerais solúveis são de grande importância para o rendimento das plantas porque fornecem nutrientes que estão prontamente disponíveis, aumentando a produção agrícola, mas não melhoram a qualidade do solo nem substituem a matéria orgânica que é perdida durante o cultivo subsequentes. Além disso, os nutrientes solúveis tendem a ser lixiviados para as camadas mais profundas do solo, promovendo a contaminação da superfície e das águas subterrâneas (LIANG et al., 2013).

O solo é um dos recursos naturais mais importantes para a qualidade de vida, haja vista possui múltiplas funções nos ciclos dos nutrientes, no ciclo da água além de ser importante para a sustentabilidade dos sistemas naturais, como as florestas e campos (SILVA et al., 2016).

Muitas propriedades são utilizadas para definir a qualidade do solo, uma vez que estas forem quantificadas, as estratégias mais adequadas para o manejo do solo podem ser realizadas (SCHLOTTER; DILLY; MUNCH, 2003; WINDING; HUNDRINKE; RUTGERS, 2005). Os variáveis químicos e físicos do solo, como matéria orgânica (M.O.), estabilidade agregada, são utilizados para medir a qualidade do solo, porém esses parâmetros mudam muito lentamente necessitando de muito tempo para observar mudanças significativas (KÖRSCHENS, 2006). Propriedades biológicas e bioquímicas (atividade microbiana) tem sido utilizada como variável para obter informações sobre a qualidade do solo, pois são mais sensíveis a qualquer perturbação ocorrida no ecossistema do solo, fornecendo informações imediatas e precisas.

A atividade microbiana é de vital importância no ciclo biogeoquímico, pois além de promover a disponibilidade de nutrientes para as plantas, os microrganismos do solo controlam o funcionamento do ecossistema, englobando um amplo espectro de atividades, dentre as quais critérios específicos como atividades enzimáticas (NANNIPIERI et al., 1996). Como as enzimas hidrolíticas (urease, desidrogenase, fosfatase, β -glucosidase e glicina aminopeptidase) estão envolvidas no ciclo de nutrientes, suas atividades podem ser utilizadas como uma indicação do estado bioquímico do solo (UTOBO; TEWARI, 2014; BASTIDA et al., 2017; WAHSHA et al., 2017).

Tem sido relatado que os fertilizantes minerais têm efeitos positivos, negativos e neutros nas atividades enzimáticas de aquisição de C, N e P do solo (WANG et al., 2011; STONE et al., 2012; QIAN et al., 2014). Também foi apontado que a resposta das enzimas do solo às adições de nutrientes é altamente dependente do contexto e que varia com os fatores ambientais e relacionados ao manejo (GEISSELER; SCOW, 2014). Portanto, mais estudos sobre os efeitos de diferentes fertilizantes em uma variedade de tipos de solo e condições ambientais são necessários para fornecer uma melhor compreensão dessas interações complexas. Nos últimos anos, a influência da adição de nutrientes nas comunidades microbianas do solo tem sido intensamente estudada (WEAND et al., 2010; CUSACK, 2013).

Visando o aproveitamento de novas tecnologias para obtenção de fertilizantes biológicos, surge o biofertilizante organomineral produzidos através da inoculação de microrganismos em resíduos das mais diversas naturezas, sendo essa uma alternativa viável aos fertilizantes solúveis (STAMFORD et al., 2004).

O uso de microrganismos na solubilização de nutrientes de rocha vem recebendo a atenção dos pesquisadores (MEENA et al., 2015; STAMFORD et al., 2016; SATYAPRAKASH et al., 2017) e, em especial, as bactérias oxidantes do enxofre do gênero *Acidithiobacillus* (KELLY; WOOD, 2000), que ocorrem naturalmente nos solos. Estas bactérias específicas são importantes na reciclagem de nutrientes no solo, e algumas espécies são necessárias para a liberação de elementos contidos nas rochas (EL-TARABILY et al., 2006; STAMFORD et al., 2008).

Estudos recentes descreveram a eficácia dos biofertilizantes de rocha PK misturados com matéria orgânica como alternativas aos fertilizantes solúveis

(OLIVEIRA et al., 2014; STAMFORD et al., 2016, 2017). No entanto, as rochas fosfatada e potássica não contêm nitrogênio (N) e, portanto, não fornecem N para o rendimento e a nutrição das plantas.

Para produzir um adubo completo o biofertilizante de rocha PK com as bactérias oxidantes de enxofre *Acidithiobacillus*, precisa ser misturado com matéria orgânica, e inoculado com bactérias diazotróficas de vida livre selecionadas *Beijerinckia indica*, que é mais eficaz no enriquecimento de N pelo processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) como descrito por Lima et al. (2010), e este é um importante mecanismo ambiental e estratégico para o incremento da fertilidade do solo.

A função dos microrganismos no controle biológico das plantas contra patógenos microbianos, é de grande importância numa agricultura orgânica sustentável. Particularmente, quando pode ser inoculado com o fungo *Cunninghamella elegans* que contém quitosana em suas paredes celulares (FRANCO et al., 2004), já que este biopolímero natural mostrou característica antimicrobiana e além de aumentar a concentração de nutrientes e a característica de proteção fitossanitária a doenças e neste contexto é nomeado bioprotetor (BERGER et al., 2013; FRANCO et al., 2011).

Quitina e a quitosana podem ser encontradas em crustáceos, e essas fontes são freqüentemente utilizada em ensaios para aumentar a resistência contra patógenos das plantas. Porém a quitosana da biomassa de fungos da ordem Mucorales (*Cunninghamella elegans*), em comparação com as fontes de crustáceos, independe dos fatores sazonais e permite a extração simultânea de quitina e quitosana (FRANCO et al., 2011). Fungos que produzem quitina e quitosana nas paredes celulares pode ser uma alternativa para a produção de bioprotetores (STAMFORD et al., 2008).

Nossa hipótese é que as atividades das enzimas hidrolíticas do solo e a biomassa microbiana são modificadas sob as adições de diferentes fontes de nutrientes, devido à maior disponibilidade de recursos de fontes complexas; também esperamos encontrar relações significativas entre as atividades de enzimas hidrolíticas envolvidas nas transformações de C, N e P, conteúdo de P do solo e a composição das comunidades microbianas. Este estudo foi conduzido para determinar a resposta das atividades enzimáticas do solo e comunidades microbianas à adição de biofertilizante organomineral e fertilizantes solúveis em três

tempos de incubação, e examinar as relações entre propriedades do solo, composição da comunidade microbiana e atividades enzimáticas do solo.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Condução do experimento

O experimento foi conduzido no Centro de Edafologia e Biología Aplicada em Murcia – Espanha. O solo utilizado no experimento, foi originário de uma propriedade agrícola da região de Lorca, coletado a uma profundidade de 0-30 cm. Este solo é classificado como Haplic Calcisol (FAO, 2015), as principais características químicas e físicas do solo estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização química e física do solo de Lorca, Murcia - Espanha

Características Químicas																
N total	P	K	Ca	Mg	Fe	Na	S	Al	Mn	B	Li	Mo	COT	C. E.	pH	
g 100g ⁻¹									mg kg ⁻¹				%		μS/cm H ₂ O 1:5	
0,084	0,02	0,49	16,74	0,72	1,52	0,09	0,18	0,05	314,9	13,9	16,7	0,38	29,6	0,31	696,3	8,23
Metal Pesado																
Cr	Ni	Cu	Zn	Pb	Cd	Co										
mg kg ⁻¹																
22,32	11,28	8,67	22,96	10,01	0,18	< 0,5										
Características Físicas																
Granulometria (%)			Umidade Residual				Textura do solo									
Areia	Silte	Argila	%				Franco-arenosa									
65,2	18,7	16,1	2,19													

O experimento foi conduzido em vasos plásticos (4 kg) contendo de solo peneirado (4 mm), em delineamento inteiramente casualizado, num arranjo fatorial (4x2) + 1, com quatro tratamentos de fertilização e três tempos de incubação, mais um tratamento controle, com quatro repetições. O experimento foi realizado durante 0, 30 e 60 dias, em solo arenoso originário da região de Lorca (Múrcia, Espanha). Os tratamentos de adubação foram: (1) FI: Fertilizante convencional solúvel - FNPk

100% da Dose Recomendada (DR); (2) B1: Bioprotetor - PNPk 50% DR (equivalente a 5 t ha⁻¹); (3) B2: Bioprotetor - PNPk 100% DR (equivalente a 10 t ha⁻¹); (4) B3: Bioprotetor - PNPk 150% DR (equivalente a 15 t ha⁻¹) e (5) Tratamento Controle, sem fertilização NPK. Nos tratamentos de fertilização, foram utilizadas uma dose de fertilizante convencional (FNPk 100%) e três de biofertilizante (BNPK 50%, BNPK100% e BNPK 150%), em relação a dose recomendada para hortaliça de acordo com as análises do solo.

3.2.2 Produção do biofertilizante organomineral

Para a realização do experimento em campo foram produzidos 4000 kg de cada biofertilizante com rocha fosfatada (BP) e potássica (BK), utilizando-se dois canteiros da horta da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, com 10 metros de comprimento, 1 metro de largura e 0,50 m de profundidade. As rochas utilizadas na produção dos biofertilizantes foram: fosfato natural (Irecê – BA), com 24 % de P₂O₅ total, e a rocha potássica (Relinktum) proveniente de Minas Gerais, com 8-10 % de K₂O total. Na produção de cada biofertilizante de rocha fosfatada e potássica, foi adicionado S elementar (100 kg de S por 1000 kg de rocha), de acordo com Stamford et al. (2008), inoculado com a bactéria oxidante do enxofre *Acidithiobacillus thiooxidans* (Figura 1).

Para obter um biofertilizante orgânico enriquecido em N, foi realizada a inoculação com a bactéria diazotrófica de vida livre *Beijerinckia indica* (NFB 10001), selecionada por Lima et al. (2010). A seguir foi produzido o fertilizante biológico em canteiros da horta da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), como relatado anteriormente. Como fonte de carbono de rápida utilização pela bactéria diazotrófica de vida livre, foi aplicado em cada canteiro, 1 m³ de resíduo de sorvete, cedido pela indústria Unilever Recife (Sorvetes Kibon), com alto teor de açúcar solúvel.



Figura 1. Preparo dos biofertilizantes de rochas: (A) Adição do pó de Rocha Apatita; (B): Adição do pó de rocha Relinktum; (C): Adição de enxofre elementar; (D): Homogeneização dos materiais; (F) Detalhe do inoculante com *Acidithiobacillus*

Para a biofertilizante organomineral foi feita a preparação do inóculo com a bactéria *B. indica* em meio de cultura (LG líquido), por 5 dias em fermentador de vidro com capacidade para 20 L, na temperatura de $\pm 28^{\circ}\text{C}$ (Figura 2).

Foi produzido também para teste no experimento o fertilizante biológico com quitosana fúngica (Figura 3). Trata-se do biofertilizante orgânico enriquecido em N, obtido como descrito acima, inoculado com massa micelial do fungo *Cunninghamella elegans* (UCP 542), o qual apresenta considerável quantidade de quitosana em sua parede celular. Para a produção do fertilizante biológico, o fungo *Cunninghamella elegans* foi purificado em placas de Petri (meio BDA) por 10 dias a 28°C . A partir da cultura monospórica de *C. elegans*, o fungo da ordem Mucorales foi cultivado em

meio Batata-Dextrose (BD) de acordo com Franco et al. (2011), em Erlenmeyers de 2000 mL, sob agitação a 180 rpm (28 °C), durante 96 h. A massa micelial do fungo foi aplicada numa concentração de 10 %, e em seguida feita a aplicação manual com uso de regador, sendo incubado por 30 dias.



Figura 2. Preparo do biofertilizante organomineral. (A): mistura dos biofertilizantes de rochas + húmus de minhoca; (B): Cultura da *Beijerinckia indica* pronta para inocular; (C): Inoculação com *B. indica*; (D): Homogeneização; (E): Cultivo da bactéria diazotrófica *B. indica*



Figura 3. Preparo do Fertilizante biológico em canteiro da UFRPE. (A): Cultura do fungo *Cunninghamella elegans*; (B): Fungo *C. elegans* pronto para inocular; (C): Inoculação com *C. elegans*; (D): Homogeneização do material, após inoculação

Após 90 dias de incubação, foram coletadas amostras do fertilizante biológico para a determinação de: pH, N total, P disponível, K disponível, Ca^{2+} trocável, Mg^{2+} trocável, e metais pesados (Tabela 2). O N total foi quantificado por digestão sulfúrica, com destilação pelo método de Kjeldhal em analisador automático Kjeltec (modelo 1030). P e K disponível foram extraídos pelo método de Mehlich 1, sendo determinado o P por colorimetria, com leitura efetuada em espectrofotômetro digital Spectronic Genesys 2 no comprimento de onda de 660 nm, e o K em fotômetro de chama. O pH em água (1,0:2,5) foi realizado por potenciometria (Potenciômetro digital Quimis Mod. 400 A), de acordo com a metodologia da Embrapa (2009).

3.2.3 Amostragem e análises química e bioquímica do solo

Amostras de solo foram coletadas em diferentes épocas (0, 30 e 60 dias) peneiradas (peneira de 2mm) e armazenadas a 4 °C e posteriormente processadas as análises químicas (pH, macro e micronutrientes). Além disso, foram analisadas algumas características microbiológicas (glicina aminopeptidase, ácidos graxos, β -glucosidase, fosfatase ácida, desidrogenase e urease).

Tabela 2. Características químicas do fertilizante biológico (peso seco). Entre parêntesis, desvio padrão (n = 3)

Características químicas	Biofertilizante		
pH	3.50 (0.02)		
Condutividade elétrica (dS m ⁻¹)	4.90 (0.01)		
Carbono total (g 100g ⁻¹)	6.03 (0.10)		
Carbono orgânico (g 100 g ⁻¹)	5.42 (0.08)		
Nitrogênio total (g 100 g ⁻¹)	0.56 (0.01)		
P total (g 100 g ⁻¹)	1.47 (0.03)		
P disponível (mg kg ⁻¹)	1,100.20 (32.2)		
K total (g 100 g ⁻¹)	0.81 (0.05)		
K disponível (mg kg ⁻¹)	301.60 (23.7)		

Metal Pesado	Limites EU^a		Biofertilizante
	Classe A	Classe B	
Cd (mg kg ⁻¹)	0.7	1.5	1.03 (0.32)
Cu (mg kg ⁻¹)	100	150	38.67 (2.80)
Cr (mg kg ⁻¹)	100	150	47.47 (3.24)
Ni (mg kg ⁻¹)	50	75	8.64 (2.95)
Pb (mg kg ⁻¹)	100	150	12.37 (1.34)
Zn (mg kg ⁻¹)	200	400	101.49 (35.5)

^aEU Commission, DG Environment, Working Document, 2nd draft: "Biological treatment of biowaste" (DG Env., 2001). Os desvios padrão aparecem entre parênteses

A solução aquosa 1:5 (m:v) foi usada para medir o pH, que foi determinado usando um Metromhm 848 Titrino plus titroprocessor (Metrohm Herisau, Switzerland). As concentrações totais de Carbono, N total e carbono orgânico do solo foram determinadas em um analisador elementar automático LECO TruSpec C / N / S (St. Joseph MI, USA).

O carbono e nitrogênio solúvel em água foram extraídos com água destilada (1:5, m: v) em agitação por 2 h, seguido de centrifugação a 26.916 g por 15 min e filtragem. A análise dos extratos foi realizada em um analisador automático para amostras líquidas (Multi N / C 3100, Analytik Jena). Amostras de solo foram analisadas quanto as concentrações totais de macro e micronutrientes após digestão com micro-ondas em 65% de HNO₃ usando Espectrometria de plasma com emissão óptica (ICP-OES, modelo ICAP 6500 Duo Thermo).

A atividade da desidrogenase do solo foi determinada por uma modificação (GARCÍA et al., 1997) do método relatado por Von Mersi e Schinner (1991),

utilizando 1 g de solo e a redução do cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT) para *p*-iodonitrotetrazolium formazan (INTF). O DHA do solo foi expresso como μg de INTF g^{-1} solo h^{-1} . A atividade da urease no solo foi determinada pelo método de Kandeler e Gerber (1988), adicionando 0,5 mL de uma solução de ureia (0,48%) e 4 mL de tampão borato (pH 10) a 1 g de solo e depois incubados durante 2 h a 37 °C. A concentração de NH_4^+ dos extratos centrifugados foi determinada por colorimetria. Os controles foram preparados sem substrato para determinar a quantidade de amônio produzido na ausência de ureia adicionada.

As atividades de β -glucosidase de solo e fosfatase alcalina foram determinadas colorimetricamente seguindo os métodos descritos por Tabatabai e Bremmer (1969) e uma modificação do método de Eivazi e Tabatabai (1988), respectivamente, adicionando 2 mL de MUB (tampão universal modificado) pH 11 e 0,5 mL de *p*-nitrofenilfosfato ($0,115 \text{ mol L}^{-1}$) para atividade de fosfatase ou 2 mL de MUB pH 6,5 e 0,5 mL de *p*-nitrofenil β -D-glucopiranosido ($0,025 \text{ mol L}^{-1}$) para atividade de β -glucosidase, em 0,5 g de solo. As misturas foram então incubadas a 37 ° C durante 1 h, após as reações enzimáticas foram interrompidas por arrefecimento em gelo durante 15 min. Em seguida foram adicionados, 0,5 mL de CaCl_2 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) e 2 mL de NaOH ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) para fosfatase ou 2 mL de tampão tris (hidroximetil) aminometano-hidróxido de sódio (THAM-NaOH pH 12) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para β -glucosidase. Nos testes de controle, os respectivos substratos foram adicionados antes da adição de CaCl_2 e NaOH.

Para a determinação da atividade de glicina aminopeptidase foi utilizada a metodologia de Tabatabai e Bremmer (1969), adicionando 2,0 mL de uma solução de glicina *p*-nitroanilida (pNA) ($0,002 \text{ mol L}^{-1}$) e 2,0 mL de tampão Tris-HCl (pH 7,0) a 0,5 g de solo e depois incubados durante 2 h a 40 °C. Após a reação enzimática foi interrompida por resfriamento em gelo (4°C) durante 15 min. Em seguida foi adicionado 1,0 mL de Ácido acético (0,75 % v/v). A formação de glicina *p*-nitroanilina liberada na reação foi mensurada em espectrofotômetro a 410 nm.

Os fosfolípidos foram extraídos de 6 g de solo fresco utilizando extração de clorofórmio-metanol como descrito por Bligh e Dyer (1959) e foram fracionado e quantificado usando o procedimento descrito por Frostegård et al. (1993). Os fosfolípidos foram transformados em ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) por metanólise alcalina (GUCKERT et al., 1985) e designados como descrito por Frostegård et al. (1993). A fração FAME completamente seca foi dissolvida em

isooctano contendo 0,23 mg ml⁻¹ de 21: 0 FAME como padrão interno. A análise foi realizada utilizando um cromatógrafo de gás Trace Ultra Thermo Scientific equipado com uma coluna capilar de 60 m (filme Thermo TR-FAME de 60 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm filme), usando hélio como gás transportador.

Os seguintes ácidos graxos são ácidos graxos bacterianos característicos e foram escolhidos como biomarcadores bacterianos: i15:0, a15:0, 15:0, i16:0, i17:0, cy17:0, cy19:0, 16:1ω7c, 16:1ω7 t, 18:1ω9c, 18:1ω9 t, 10Me16:0 e 10Me18:0 (FROSTEGÅRD et al., 1993; DUNGAIT et al., 2011). O ácido graxo 18:2ω6 foi utilizado como indicador de biomassa fúngica (BRANT et al., 2006; RINNAN; BÅÅTH, 2009). Os ácidos graxos representativos de Gram-positivo utilizados foram i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, 10Me16:0 e 10Me18:0; Os ácidos graxos Gram-negativos utilizados foram cy17:0, cy19:0, 16:1ω7c, 16:1ω7 t, 18:1ω9c e 18:1ω9 t (FROSTEGÅRD et al., 1993; DUNGAIT et al., 2011). 10Me-FAMES ramificados (10Me16:0 e 10Me18:0) foram tomados como biomarcadores específicos de actinobactérias dentro de bactérias Gram-positivas (DUNGAIT et al., 2011).

3.2.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o software IBM-SPSS Statistics (versão 19.0). Todas as variáveis foram submetidas à ANOVA de duas vias (Tabela S1, Apêndice A). Os dois fatores foram: i) Tratamentos de fertilização, que teve 5 níveis (cont., F1, B1, B2, B3) e ii) Tempo de incubação, que teve três níveis (0, 30 e 60 dias) para os dados químicos e enzimáticos do solo, observando um efeito significativo do tempo em quase todas as variáveis. Para determinar diferenças significativas entre os tratamentos, os dados foram submetidos à ANOVA unidirecional em cada tempo de amostragem, seguida pela diferença significativa de Tukey B como um teste post hoc (Diferença significante, DHS, no intervalo de confiança de 95% no modelo linear). Uma análise fatorial foi realizada para a quantidade relativa de PLFA para explorar possíveis diferenças entre tratamentos.

3.3 Resultados

3.3.1 Características químicas do solo

Os efeitos de diferentes tratamentos sobre as características químicas do solo são ilustrados na Tabela 3. O pH do solo foi significativamente afetado pelo tempo

de incubação ($p < 0,05$) que variaram de 8,04 a 8,60, onde o menor pH foi registrado no tratamento B3 no tempo 0 (T0) e o maior valor foi encontrado no tratamento controle no período T60, que diferiu estatisticamente de todos os outros tratamentos utilizados, exceto o adubo inorgânico (FI). O pH do solo também diferiu significativamente ($p < 0,05$) dentro dos tratamentos de fertilização que variou de 8,04 a 8,33 no tempo inicial (T0), e de 8,21 a 8,60 no tempo de incubação T60. O menor pH do solo para T0 e T60 foi encontrado em B3, que não era diferente do pH determinado nos tratamentos B1 e B2. O maior pH do solo para os tempos T0 e T60 foi encontrado no tratamento controle que não diferia do tratamento FI. (Tabela 3).

Após o período T0, os tratamentos de fertilização (biofertilizantes e fertilizantes solúveis) não mostraram diferenças significativas, quanto às concentrações de nutrientes (nitratos, sulfatos, cloretos e fosfatos) dados não mostados. No entanto, para os tempos de incubação sucessivos T30 e T60, os solos tratados com biofertilizante apresentaram concentrações significativamente maiores de C orgânico, N total e principalmente P e K total e disponível em comparação com os solos tratados com fertilização inorgânica e controle (Tabela 3).

O conteúdo de N solúvel do solo foi significativamente afetado pelos tratamentos de fertilização ($p < 0,05$) e variou de 32 a 118 mg kg⁻¹, onde o menor conteúdo de N solúvel foi encontrado no tratamento controle e o maior valor foi encontrado quando aplicado FI que não foi significativamente diferente do tratamento B1 no tempo inicial de incubação T0. Nos diferentes tempos de avaliação, o teor de N do solo apresentou diferença significativo ($p < 0,05$) para todos os tratamentos, e após incubação por T30 e T60 os valores de N solúvel do solo ficaram próximos de 0 (zero) mg kg⁻¹ (Tabela 3). O N total apresentou comportamento inverso, pois houve um incremento dos valores após T30 onde os maiores valores foram medidos nos tratamentos controle e B3 (0,069 g 100g⁻¹) e no T60 os solos tratados com biofertilizante obteve o maior valor (0,059 g 100g⁻¹) em comparação com o tratamento com fertilizante inorgânico (0,053 g 100g⁻¹), contudo não foi observada diferença significativa entre esses tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração de nutrientes no solo após o tempo de incubação (0, 30 e 60 dias) submetidos aos diferentes tratamentos de adubação

Tratamento ¹	pH	N solúvel	C solúvel	P disponível	K disponível	N total	C Orgânico	P total	K total
	H ₂ O (1:5)	----- mg kg ⁻¹ -----				----- g 100g ⁻¹ -----			
Tempo inicial de incubação (T0)									
Controle	8,33c (0,03)	32,89e (0,61)	38,66b (0,09)	9,00c (0,48)	227,10a (1,44)	0,021ab (0,0)	0,331bc(0,01)	0,024b (0,0)	0,637a (0,02)
FI	8,27b (0,02)	118,00a(1,96)	45,88a (0,05)	10,79c (0,25)	226,53a (1,23)	0,017b(0,0)	0,286c (0,04)	0,024b (0,0)	0,629a (0,02)
B1	8,07a (0,04)	94,38a (0,71)	46,68a (0,58)	19,19b (0,37)	227,05a (1,93)	0,028a (0,0)	0,314bc(0,02)	0,022b (0,0)	0,554a (0,05)
B2	8,05a (0,03)	81,95c (0,39)	52,63a (0,32)	28,86a (0,44)	228,73a (1,61)	0,029a (0,0)	0,357ab(0,04)	0,034a (0,0)	0,550a (0,07)
B3	8,04a (0,02)	77,52d (0,61)	48,53a (0,37)	29,17a (0,51)	228,30a (1,62)	0,020ab (0,0)	0,394a (0,04)	0,032a (0,0)	0,576a (0,08)
Tempo de incubação 30 dias (T30)									
Controle	8,48c (0,03)	12,16a (0,32)	57,82a (0,74)	7,58c (0,70)	6,02a (0,62)	0,069a (0,0)	0,394bc(0,02)	0,024c (0,0)	0,618a (0,02)
FI	8,46c (0,03)	10,40a (0,57)	54,42a (0,07)	6,70c (0,40)	5,31a (0,59)	0,050ab(0,0)	0,364c (0,03)	0,022c (0,0)	0,569a (0,05)
B1	8,40b (0,03)	0,55b (1,10)	57,46a (0,61)	21,31b (0,59)	3,77a (0,38)	0,041b (0,0)	0,462ab(0,06)	0,034b (0,0)	0,620a (0,02)
B2	8,27a (0,02)	0,00b (0,00)	60,13a (0,12)	24,68b (0,36)	4,25a (0,46)	0,049ab(0,0)	0,410bc(0,02)	0,033b (0,0)	0,652a (0,08)
B3	8,22a (0,01)	0,00b (0,00)	58,32a (0,45)	37,00a (0,34)	3,75a (0,37)	0,069a (0,0)	0,481a (0,03)	0,051a (0,0)	0,601a (0,02)
Tempo de incubação 60 dias (T60)									
Controle	8,59c (0,06)	11,11a (0,51)	64,47b (0,51)	8,40c (0,69)	6,45a (0,20)	0,064a (0,0)	0,255b (0,01)	0,024c (0,0)	0,693a (0,04)
FI	8,54c (0,01)	0,00b (0,00)	66,38b (1,09)	7,19c (0,50)	6,00a (0,18)	0,053ab(0,0)	0,247b (0,09)	0,024c (0,0)	0,711a (0,02)
B1	8,36b (0,04)	1,04b (1,20)	9,02ab(0,44)	25,63b (0,16)	5,61a (0,18)	0,059ab(0,0)	0,314ab(0,02)	0,036b (0,0)	0,655a (0,02)
B2	8,29ab(0,03)	0,00b (0,00)	122,79a(1,26)	46,67a (0,56)	5,93a (0,14)	0,056ab(0,0)	0,344a (0,07)	0,047a (0,0)	0,695a (0,03)
B3	8,21a (0,03)	0,00b (0,00)	4,83ab(0,95)	51,74a (0,64)	5,70a (0,23)	0,053ab(0,0)	0,350a (0,05)	0,050a (0,0)	0,659a (0,04)

¹Tratamentos: Controle; FI: fertilizante solúvel (FNPK 100% Dose Recomendada - DR); B1: 5 t ha⁻¹ bioprotetor (PNPK 50% DR); B2: bioprotetor 10 t ha⁻¹ (PNPK 100% DR); B3: 15 t ha⁻¹ bioprotetor (PNPK 150% DR). Os dados seguidos com a mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O teor de P do solo foi significativamente afetado pelos tratamentos aplicados ($p < 0,05$). O conteúdo de P assimilável variou de 9,00 a 29,17 mg kg⁻¹ no tempo inicial de avaliação (T0) e de 7,19 a 51,74 mg kg⁻¹ no tempo T60, onde as menores quantidades foram determinadas no tempo inicial (T0) no tratamento controle, e no tempo de avaliação T60 foi observado no tratamento FI que não se diferiram estatisticamente em nenhum dos três tempos.

O maior conteúdo de P disponível no solo foi obtido no tratamento B3 em ambos os tempos de incubação, e mostrou diferença significativa para os demais tratamentos, exceto para o B2 no tempo T60. O teor de fósforo assimilável no solo variou significativamente ($p < 0,05$) em relação aos tempos de incubação de 6,70 a 51,74 mg kg⁻¹. O menor conteúdo de P foi encontrado no tratamento FI no tempo T30, e o maior valor foi encontrado quando aplicado B3 no tempo de incubação T60 (Tabela 3).

O teor de K disponível do solo apresentou comportamento semelhante ao N solúvel, onde o no tempo de incubação inicial T0 apresentou os maiores resultados, no entanto, não foi significativamente afetado pelos tratamentos ($p > 0,05$) com valor médio de 227,05 mg kg⁻¹. Para os tempos de incubação, o teor de K do solo foi significativo ($p < 0,05$) para todos os tratamentos, que apresentaram após T30 e T60 de incubação valores de K disponível próximos de 0 (zero) mg kg⁻¹ (Tabela 3). Para o conteúdo de K total do solo, houve um incremento dos valores após T30 dias onde os maiores valores foram medidos nos tratamentos B2 e B3 (0,652 e 0,601 g 100g⁻¹) e no tempo de avaliação T60 não foi observada diferença estatística entre os tratamentos variando entre (0,655 a 0,711 g 100g⁻¹). De um modo geral, os solos tratados com biofertilizante obtiveram os maiores valores variando de (0,550 a 0,695 g 100g⁻¹) em comparação com fertilizante solúvel e com o tratamento controle (Tabela 3).

O carbono solúvel do solo seguiram uma tendência similar nos tempos T0 e T30 não apresentando efeito significativo ($p > 0,05$), em relação aos tratamentos ou tempo de incubação sendo significativamente afetado ($p < 0,05$) no tempo T60 com valores variando de 64,47 para 122,79 mg kg⁻¹. O menor valor foi encontrado no tratamento controle (38,66 mg kg⁻¹) que não diferiu nos tempos de avaliação utilizados. O maior valor foi encontrado no tratamento B2 (122,79 mg kg⁻¹) que promoveu incremento significativo em relação aos demais tratamentos (Tabela 3). O conteúdo de C orgânico foi afetado pelos tratamentos e aumentou

significativamente, em especial, os níveis B2 e B3 (0,410 e 0,481 g 100g⁻¹) no tempo T30, em comparação aos demais tratamentos.

Os conteúdos de matéria orgânica total do solo (MOT) seguiu uma tendência similar ao carbono orgânico. Os tratamentos afetaram o conteúdo MOT com aumento significativo ($p < 0,05$), quando aplicado os tratamentos com biofertilizante, principalmente no tempo de incubação T30, em comparação com os tratamentos fertilizante solúvel e controle. O MOT do solo foi de 0,627 e 0,830 g 100g⁻¹ para os tratamentos com fertilizante inorgânico e com biofertilizante na dose B3, respectivamente, no tempo de avaliação T30. Conforme observado no carbono orgânico do solo, os solos tratados com biofertilizante apresentaram os maiores valores, em comparação com os tratamentos fertilizante inorgânico e controle, em todos os tempos de incubação.

3.3.2 Propriedades biológicas do solo

Os efeitos de diferentes tratamentos de fertilização sobre as propriedades biológicas do solo estão ilustrados na Figura 4. A enzima β -glucosidase catalisa a última etapa da degradação da celulose, a hidrólise da celobiose para glicose. No solo tratado com FI observa-se no tempo de incubação inicial T0 um aumento na atividade da β -glucosidase, quando comparado com o controle diferindo significativamente, exceto para o tratamento B2. No entanto, após 30 dias houve um aumento significativo nos solos tratados com biofertilizante nas doses B1 e B3, em relação ao solo tratado com fertilizante inorgânico e com o controle. A atividade de β -glucosidase medida nos tratamentos variou de 0,123 a 0,096 $\mu\text{moles PNF g}^{-1}\text{h}^{-1}$ para os tratamentos B3 e controle respectivamente (Figura 4a). Além disso, esta atividade manteve-se maior nos solos tratados com biofertilizante até 60 dias, mas não se diferiu tratamento com fertilizante solúvel.

A fosfomonoesterase tem a função de transformar diferentes formas de fósforo orgânico em formas simples que sejam facilmente assimiladas pelas plantas. A atividade da fosfomonoesterase no tempo de incubação inicial T0 manteve-se em níveis semelhantes para os tratamentos com adição de fertilizante solúvel e biofertilizante nas diferentes doses. Aos 30 dias de incubação, a atividade desta enzima aumentou nas amostras de solo tratado com FI e controle em comparação com as doses de biofertilizante diferindo estatisticamente ($p < 0,05$), variando entre

0,315 e 1,170 $\mu\text{moles PNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$ e sua atividade foi maior no solo tratado com FI (Figura 4b).

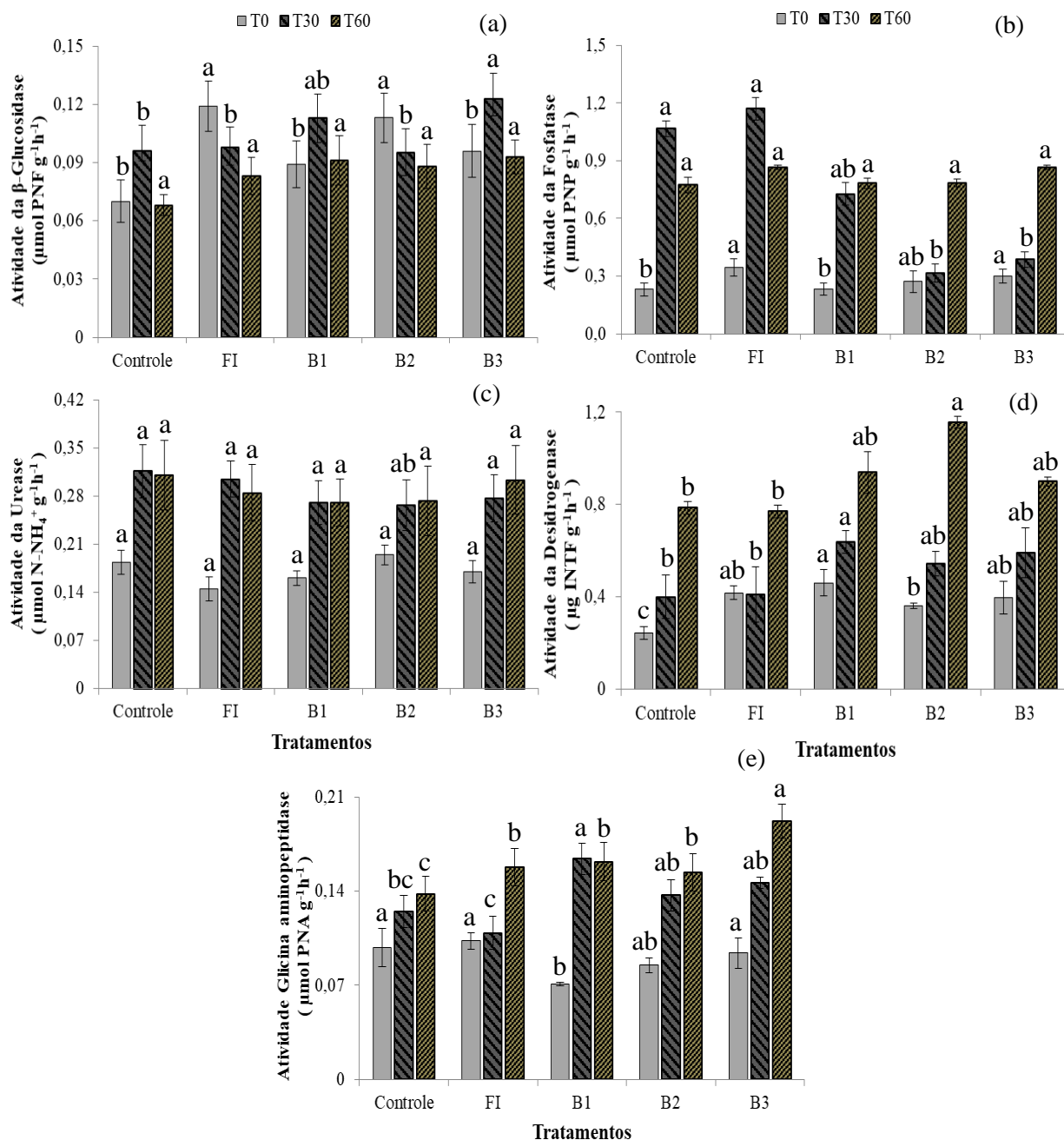


Figura 4. Efeito de diferentes tratamentos de fertilização nas propriedades biológicas do solo. Atividades da β -glucosidase, A β G (a), Fosfatase, AF (b), Urease, AU (c), Desidrogenase, AD (d) e glicina aminopeptidase (e). Tratamentos: Controle; FI: fertilizante solúvel convencional (FNPK 100% Dose Recomendada - DR); B1: 5 t ha⁻¹ bioprotetor (PNPK 50% DR); B2: 10 t ha⁻¹ bioprotetor (PNPK 100% DR); B3: 15 t ha⁻¹ bioprotetor (PNPK 150% DR). As barras representam o desvio padrão. Dados com a mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

No solo com biofertilizante foi observada uma correlação negativa entre a atividade da fosfatase e o teor de P disponível ($r = -0,75$, $p < 0,01$) e P total ($r = -0,61$, $p < 0,01$) no solo, especialmente aos 30 dias de incubação, em comparação com os tratamentos com fertilizante solúvel e controle (Tabela 4).

Tabela 4. Análise de correlação de Spearman entre variáveis químicas, indicadores de atividade e índice de biomassa microbiana

	AF	P Total	P disponível	A β G	AD	AU	Fungo
Total P	-0,61 (<0,01)						
P disponível	-0,75 (<0,01)	0,91 (<0,01)					
A β G	0,061 (0,8)	0,45 (<0,05)	0,29 (0,22)				
AD	-0,53 (<0,01)	0,67 (<0,01)	0,63 (<0,01)	0,44 (0,05)			
AU	0,16 (0,51)	-0,40 (0,08)	-0,40 (0,08)	-0,31 (0,18)	-0,30 (0,20)		
Fungo	-0,14 (0,56)	0,57 (<0,01)	0,54 (<0,05)	0,13 (0,58)	0,61 (<0,01)	-0,07 (0,78)	
Bact	0,094 (0,69)	0,45 (<0,05)	0,43 (0,06)	0,30 (0,20)	0,40 (0,08)	0,02 (0,94)	0,67 (<0,01)

AF, atividade da fosfatase; P Total; P disponível; atividade de A β G, β -glucosidase; AD, atividade da desidrogenase; AU, atividade da urease; Fungos, biomassa microbiana, soma de PLFAs fúngicos; Bact., Biomassa microbiana, soma de PLFAs bacterianos. Os coeficientes de correlação são seguidos pelos valores de p (entre parênteses).

A enzima urease catalisa a hidrólise de ureia em amônio. Para o solo após 30 e 60 dias de incubação, a atividade da urease variou de 0,267 a 0,317 $\mu\text{moles N-NH}_4^+ \text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$ (Figura 4c), sendo maior no controle em comparação com os tratamentos com biofertilizante do que com o solo tratado com fertilizante inorgânico.

No tempo inicial de avaliação (T0), a atividade de urease nos solos com diferentes tratamentos de fertilização, não variou significativamente, porém os maiores valores dessa atividade enzimática foram observados no controle e no tratamento B2. A maior atividade de urease foi encontrada quando avaliado aos 60 dias de incubação, e o biofertilizante em maior proporção (B3) e os tratamentos controle apresentaram os maiores valores (0,304 e 0,311 $\mu\text{moles N-NH}_4^+ \text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$), respectivamente (Figura 4c).

As desidrogenases são as principais representantes da classe de enzimas oxidorreduzidas cuja atividade também é considerada um indicador eficiente da atividade metabólica microbiana. A atividade da desidrogenase seguiu uma tendência crescente em relação ao tempo de incubação, onde os solos tratados com biofertilizante mostraram valores de atividade da desidrogenase significativamente

maiores ($p < 0,05$) comparado com os tratamentos controle e fertilizante solúvel (Figura 4d). A presença do biofertilizante aumentou a atividade da desidrogenase, e o solo tratado com a dose B2 apresentou o maior valor de atividade da desidrogenase ($1,157 \mu\text{g INTF g}^{-1}\text{h}^{-1}$) após 60 dias de incubação, enquanto que o controle e o FI apresentaram valores significativamente mais baixos.

As aminopeptidases encontradas no solo atuam na despolimerização de macromoléculas orgânicas, hidrolisando extremidades C e N-terminais, liberando polipeptídios menores ou aminoácidos que servirão como fonte de nutrientes para plantas e organismos no solo. A atividade da glicina aminopeptidase apresentou no início da avaliação maiores valores no tratamento com FI e no controle, comparados com os tratamentos com biofertilizante. Contudo, após 30 e 60 dias de incubação foram observados valores mais elevados nos solos tratados com doses de biofertilizante (Figura 4e), destacando a dose B3 que apresentou o maior valor de atividade da glicina aminopeptidase ($0,192 \mu\text{mol PNA g}^{-1}\text{h}^{-1}$) quando avaliada após 60 dias de incubação, enquanto que o controle e o FI apresentaram valores significativamente mais baixos.

A adição do biofertilizante em suas diferentes doses, promoveram as melhores atividades enzimáticas em todos os tempos de incubação (Figura 4 a, b, c, d, e). Esses incrementos foram, como padrão geral, mais elevados no T60. Observou-se que as atividades enzimáticas mostraram tendência crescente na inter-relação com o tempo de incubação, exceto β -glucosidase, que seguiu um comportamento decrescente em alguns tratamentos (Figura 4a).

3.3.3 Análise de perfil de ácidos graxos (PLFA)

Os tratamentos com biofertilizante afetaram a quantidade de ácidos graxos fosfolipídicos (PLFA) e promover um aumento geral em comparação com os outros tratamentos. O fertilizante solúvel apresentou níveis significativamente mais baixos de PLFA bacteriano (bacPLFA), PLFA fúngico (fungPLFA), PLFA Gram⁺ e PLFA Gram⁻ quando comparados com os solos tratados com biofertilizante, onde os valores de PLFA em B2 foram significativamente maiores que os correspondentes aos demais tratamentos ($p < 0,05$) (Tabela 5). No entanto, o teor de ácidos graxos Gram⁻ não diferiu entre as doses nos solos tratados com biofertilizante.

Tabela 5. Concentração de PLFAs de fungo, bactéria, Gram⁺, Gram⁻, actinobactéria em solo tratado com bioprotetor e fertilizante solúvel após 60 dias de incubação

PLFA (nmol g ⁻¹)	Controle	FI	B1	B2	B3
Fungo PLFA	0,16b (0,05)	0,09b (0,01)	0,19b (0,04)	0,36a (0,04)	0,16b (0,05)
Bactéria PLFA	1,68cd(0,19)	1,23d (0,15)	2,18a (0,18)	2,09ab(0,39)	1,72bc(0,23)
Actinobactéria PLFA	0,07a (0,01)	0,05a (0,01)	0,09a (0,02)	0,11a (0,05)	0,07a (0,01)
Bactéria Gram⁺	1,15ab(0,08)	0,85b (0,10)	1,40a (0,15)	1,36ab(0,25)	1,28ab(0,20)
Bactéria Gram⁻	0,53ab(0,12)	0,38b (0,07)	0,78a (0,03)	0,72a (0,14)	0,44ab(0,04)

Tratamentos: controle; FI: fertilizante solúvel convencional (FNPK 100% Dose Recomendada - DR); B1: 5 t ha⁻¹ bioprotetor (PNPK 50% DR); B2: bioprotetor 10 t ha⁻¹ (PNPK 100% DR); B3: 15 t ha⁻¹ bioprotetor (PNPK 150% DR). Dados com a mesma letra, na linha, não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O solo tratado com biofertilizante não mostrou um conteúdo de PLFA de actinobactérias significativamente maior do que o solo tratado com adubo e controle. Contudo, a dose B2 do biofertilizante induziu um maior teor de PLFA actinobacteriano do que doses B1 e B3 (Tabela 5). Similar ao PLFAs bacterianos, o teor de PLFA fúngico também aumentou na dose B2 em solos tratados com biofertilizante em comparação com os solos tratados com fertilizante solúvel e controle.

A relação Monosaturado/Saturado foi maior no solo tratado com biofertilizante B1, B2 e controle diferindo estatisticamente do tratamento com biofertilizante na dose B3 (Figura 5). Para a proporção Gram⁺/Gram⁻ foi observado um efeito contrário, onde o biofertilizante na dose B3 apresentou os maiores valores embora não haja diferenças significativas entre os tratamentos exceto o B1, assim como na proporção fungPLFA/bacPLFA nos diferentes tratamentos devido ao aumento da PLFA em ambos (dados não mostrados).

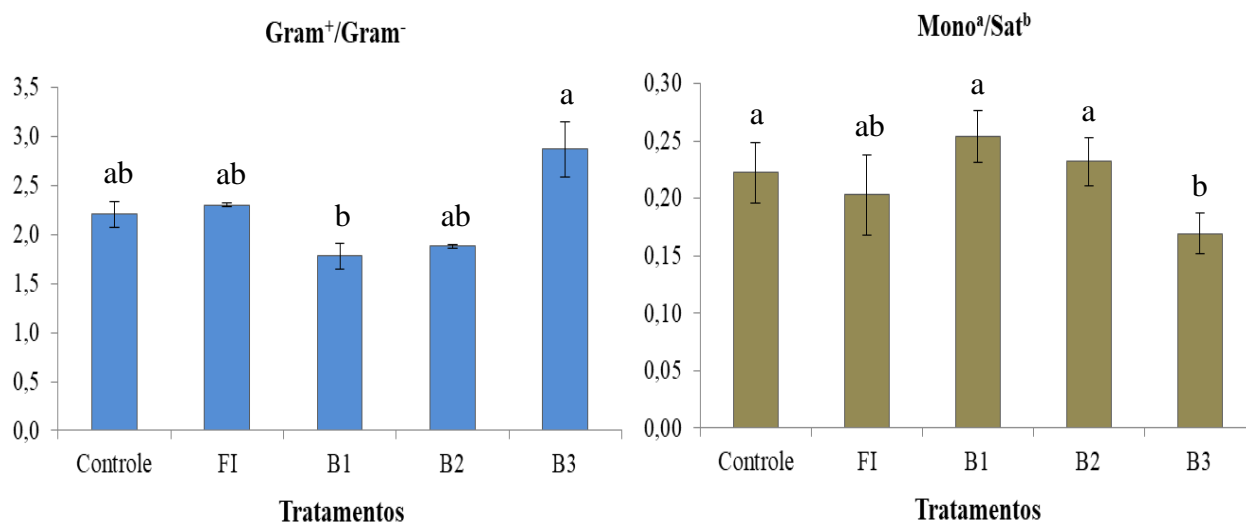


Figura 5. Razões de Gram + / Gram⁻ e ^aMonosaturados/ ^bSaturados de PLFAs em tratamentos de solo após 60 dias de incubação. Tratamentos: controle; FI: fertilizante solúvel convencional (FNPK 100% Dose Recomendada - DR); B1: 5 t ha⁻¹ bioprotetor (PNPK 50% DR); B2: bioprotetor 10 t ha⁻¹ (PNPK 100% DR); B3: 15 t ha⁻¹ bioprotetor (PNPK 150% DR). Para cada parâmetro, os dados seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey B ($p < 0,05$). Barras representam desvio padrão

Para estimar as mudanças na estrutura da comunidade microbiana foi processada a análise do componente principal para a abundância relativa de ácidos graxos após 60 dias de incubação. O Fator 1 explicou 48% da variância dos resultados e o Fator 2 explicou 26,6% (Figura 6). Observou-se diferença na estrutura da comunidade microbiana e, de acordo com o Fator 1, a estrutura da comunidade microbiana nos tratamentos B2 e B3 diferiu dos demais tratamentos. De acordo com o Fator 2, podem ser estabelecidos dois grupos: 1) tratamentos B1 e B2 e 2) tratamentos B3, FI e Controle. As bactérias Gram-positivas receberam um alto índice pelo Fator 1 (Figura 6).

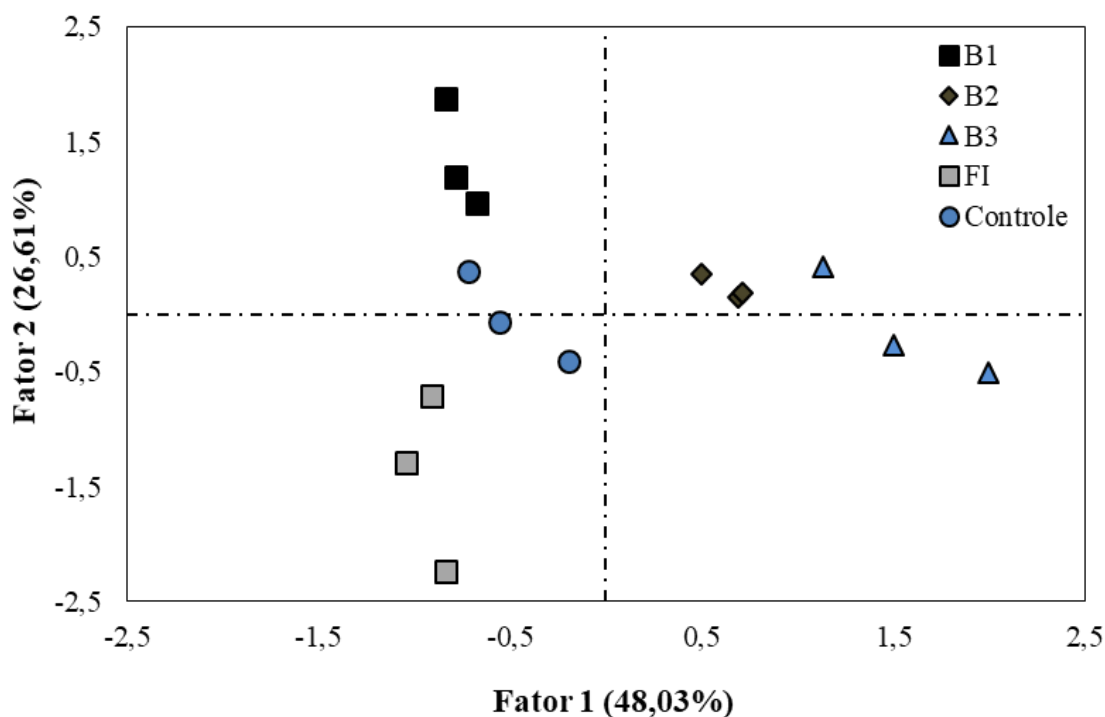


Figura 6. Análise de componentes principais para PLFAs em solo com diferentes tratamentos de fertilização (■) B1: 5 t ha⁻¹ de bioprotetor (PNPK 50%), (◆) B2: 10 t ha⁻¹ de bioprotetor (PNPK 100%), (▲) B3: 15 t ha⁻¹ de bioprotetor (PNPK 150%), (◻) FI: fertilizante solúvel convencional (FNPK 100%), (●) Controle, após 60 dias de incubação

3.4 Discussão

3.4.1 Efeitos da aplicação do biofertilizante nos atributos do solo

A aplicação do PNPK vem demonstrando sua eficiência agrônômica em diferentes culturas, melhorando as propriedades do solo como fixação de nitrogênio, solubilidade do fósforo e potássio, além disso, os microrganismos envolvidos na produção do PNPK melhoram o crescimento e o rendimento das culturas, aumentando a absorção de nutrientes na parte aérea da planta (LIMA et al., 2007, OLIVEIRA et al., 2014, STAMFORD et al., 2014, 2015, 2016,) e parâmetros fisiológicos (TURAN et al., 2014). Para ser usado como alternativa viável aos fertilizantes inorgânicos, o biofertilizante deve fornecer uma taxa de NPK disponível semelhante à fornecida por fertilização inorgânica. No entanto, é difícil estabelecer essas taxas para utilizá-lo como alternativa à fertilização inorgânica.

No presente estudo, o pH do solo foi afetado pela aplicação do biofertilizante e a redução foi mais evidente nas taxas mais elevadas, isso provavelmente é devido à presença do *Acidithiobacillus*, microrganismo solubilizador de fósforo e potássio na

produção do biofertilizante, que produzem ácido sulfúrico por via metabólica. Esse efeito foi explicado por Stamford et al. (2007, 2015) que observaram resultados semelhantes na redução do pH do solo quando aplicado enxofre inoculado com *Acidithiobacillus* em solos da região semiárida brasileira. Alguns autores concordam que a adição de microrganismos utilizados na solubilização de P e K reduz o pH do solo e, em algumas condições, pode ocorrer pela liberação de ácidos orgânicos (NAMLI et al., 2017).

O aumento no teor de N total do solo ao longo do tempo de incubação, também foi observado por Hernández et al. (2016) ao testar composto de esgoto e estrume como alternativa à fertilização inorgânico em alface. A mineralização do N orgânica, depende do tipo da matéria orgânica e de outros parâmetros bióticos e abióticos, como o tipo de solo, o teor de água do solo, o pH do solo e a temperatura (AGEHARA; WARNCKE, 2005), e não existe estimativas confiáveis de liberação de nitrogênio para fontes orgânicas.

O efeito do bioprotetor (PNPK) no N total e no P disponível e total no solo foram analisados, e os resultados indicaram aumento nas maiores doses e ao longo do tempo de incubação (30 e 60 dias) indicando efeitos positivos e significativos demonstrando um poder residual significativo.

Esses resultados corroboram com Stamford et al. (2014 e 2016) em uva (*Vitis labrusca*) e cana-de-açúcar, e com Oliveira et al. (2014) avaliando o P disponível no solo durante o crescimento do melão. Esses autores relataram que o efeito pode ocorrer devido ao incremento de matéria orgânica e da solubilização de nutrientes, resultando no aumento da disponibilidade de fosfato.

Lima et al. (2007) avaliou o desempenho dos biofertilizantes das rochas de P e K mais o enxofre elementar inoculado com *Acidithiobacillus* misturado com composto de minhoca, no rendimento de alface e absorção de nutrientes em dois ciclos consecutivos, em um Latossolo Vermelho Amarelo comparado com fertilizantes minerais. Os autores observaram um maior poder residual dos biofertilizantes na disponibilidade de P. Franco et al. (2011) relataram que o aumento no P disponível pode ser devido ao efeito interativo de fungos que produzem fosfatases e que contêm quitosana, e esses autores comprovam o aumento na disponibilidade de P e outros elementos contidos nas rochas. Kowalski et al. (2006) e Goy et al. (2009) propuseram que a quitosana pode incrementar o conteúdo de N, P e K no substrato.

3.4.2 Atividade enzimática e PLFA

Neste estudo, todas as enzimas apresentaram maior atividade nos solos tratados com biofertilizante por possui um teor de C orgânico maior do que nos solos tratados com FI e controle, exceto a atividade da fosfatase no início do tratamento e aos 30 dias de incubação. Isso implica que a aplicação do biofertilizante teria uma vantagem melhorando a fertilidade do solo, confirmando a hipótese de que o uso do biofertilizante como fertilizante e pode contribuir para melhorar a qualidade do solo, o que está de acordo com Garcia-Ruiz et al. (2012) e com Hernández et al. (2016).

A enzima β -glucosidase desempenha um importante papel na decomposição da matéria orgânica do solo, atuando sobre os dímeros de glicose. Observamos um efeito significativo dos tratamentos com biofertilizante (doses B1 e B3) na atividade da β -glucosidase aos 30 dias de incubação. Hernández et al. (2016) e Igalavithana et al. (2017) também observou aumento na atividade da β -glucosidase com a adição de fertilizantes orgânicos, em comparação com os fertilizantes inorgânicos. A mudança na atividade dessa enzima pode ser um ótimo indicador para determinar a abundância de C orgânico do solo (STOTT et al., 2010), uma vez que a celulose é o polissacarídeo mais abundante na biomassa vegetal presente na matéria orgânica do solo, e a β -glucosidase está envolvida no passo final da degradação da celulose (TORRES et al., 2016).

A fosfatase hidrolisa o P inorgânica e transforma em P disponível a planta (BOWLES et al., 2014). As fosfatases podem ser representadas como ácidas ou alcalinas e suas atividades dependem da acidez do solo (KRÄMER; GREEN, 2000). Os resultados obtidos concordam com de outros autores (RAMÍREZ et al., 2014; DINESH et al., 2013) e verificaram que a atividade da fosfatase é inversamente proporcional ao conteúdo de P disponível para a planta, confirmando a tese de que a produção e atividade das fosfatases do solo está relacionada com a demanda de P para microrganismos e plantas (BANERJEE; SANYAL; SEN, 2012). Hernández et al. (2016), observaram um efeito contrário após a segunda cultivo de alface, onde os solos tratados organicamente mostraram maiores valores de atividade da fosfatase que os solos tratados com fertilizante inorgânico, propondo que os compostos fornecem substratos, ativando os ciclos de nutrientes do solo (GARCIA-RUIZ et al., 2012).

Igalavithana et al. (2017) aplicando fertilizante orgânico pH neutro, também verificou que a atividade das fosfatases alcalinas era imperativa para os solos

tratados com fertilizantes orgânicos e relação ao fertilizante inorgânico. Uma explicação para esse comportamento seria que a adição de carbono ao solo leva a uma diminuição de outros nutrientes, como N ou P, estimulando a comunidade microbiana a produzir enzimas para mitigar essa redução (ALLISON; VITOUSEK, 2005; SINSABAUGH; SHAH, 2011).

Iões NH_4^+ são liberados como nutrientes prontamente disponíveis para as plantas através da hidrólise de ureia que é catalisada pela urease. Em geral, solos tratados com fertilizantes orgânicos ou compostos de estrume animal ocorrem alta atividade de urease (UZ; TAVALI, 2014), concordando com os resultados do presente estudo onde a atividade da urease foi aumentada no solo, quando adicionado biofertilizante na maior dose após 60 dias de incubação. A urease pode ser sintetizada em alguns organismos, contudo a expressão da urease está sob a regulação do N na maioria das vezes, sendo inibida na presença de uma fonte de N, tal como NH_4^+ (GEISSELER et al., 2010).

A atividade da desidrogenase reflete o estado global da atividade microbiana, portanto, a mudança na desidrogenase pode ser um indicador na determinação da fertilidade do solo (IGALAVITHANA et al., 2017), resultantes da decomposição biológica da matéria orgânica. Os resultados obtidos no presente trabalho sugeriram um efeito positivo da aplicação do biofertilizante na atividade da desidrogenase, com a aplicação da dose B2 após 60 dias de incubação em comparação com o fertilizante inorgânico, ratificado com os resultados de Hernández et al. (2016). Giacometti et al. (2013) sugeriram que a atividade da desidrogenase era altamente sensível aos efeitos inibitórios integrados às grandes adições de fertilizantes minerais.

Enzimas relacionadas ao ciclo do nitrogênio são dependentes da quantidade e qualidade de substratos (ENOWASHU et al., 2009). A fertilização com biofertilizante em solo levou a um aumento no teor de P do solo, que por sua vez estimulam a atividade enzimática da glicina aminopeptidase. Resultados semelhantes foram obtidos por Keuskamp et al. (2015) estudando atividade enzimática do solo em um experimento de fertilização em campo, onde observaram que a fertilização com P aumentou a atividade potencial da enzima glicina aminopeptidase. Existem também evidências de que a comunidade microbiana é sensível a fertilização por N, P e K, podendo exercer influência sobre a microbiota e atividades enzimáticas (GEISSELER; SCOW, 2014).

O teor de ácidos graxos, que é um indicador de biomassa microbiana, mostrou uma tendência paralela à das enzimas. Assim, a biomassa bacteriana e fúngica foi maior nos tratamentos B2 e B3. Da mesma forma, a atividade desidrogenase também foi maior em B2, correlacionando-se positivamente com a biomassa fúngica ($r = 0,61$, $p < 0,01$) (Tabela 5). Estes resultados indicam que as variações nas atividades enzimáticas são, em alguns casos, devido a mudanças na biomassa microbiana, bem como à disponibilidade de nutrientes. Além disso, a relação saturada e monoinsaturada foi maior em B1 que em B3. Alguns autores utilizaram essa relação como um indicador da disponibilidade de C no solo (BOSSIO; SCOW, 1998). Isso pode indicar que a disponibilidade de C é maior em B1 e está associada a uma variação na comunidade microbiana.

As mudanças nas atividades enzimáticas em B2 e B3 podem ser promovidas pelo aumento da disponibilidade de nutrientes e mudanças na biomassa microbiana. Além disso, essas mudanças também podem estar relacionadas a variações na estrutura da comunidade microbiana. De fato, a análise de componentes principais com os ácidos graxos indica que a estrutura da comunidade do solo tratada com B2 e B3 é diferente da comunidade do solo tratada com B1, controle e fertilizante (FI) (dados não mostrados). Alguns estudos mostraram que a adição de matéria orgânica pode envolver variações na estrutura da comunidade microbiana (BASTIDA et al., 2013, 2017; TORRES et al., 2015).

3.5 Conclusões

O biofertilizante nas doses mais altas (B2 e B3) apresentou efeito significativo sobre a disponibilidade de nutrientes no solo, principalmente para P e K, e confirmou que o biofertilizante incrementou os atributos químicos e microbiológicos do solo, o que afetou atividades enzimáticas inter-relacionadas com os ciclos P e N.

A adição de biofertilizante estimulou a atividade da β -glicosidase, Urease e Desidrogenase e diminuiu a atividade da Fosfatase, confirmando a hipótese de que a produção e atividade das fosfatases do solo está relacionada à demanda de P para os microrganismos.

A resposta da composição da comunidade microbiana do solo foi mais significativa para as adições de biofertilizantes em comparação ao FI e controle. As aplicações de biofertilizantes nos tratamentos B2 e B3 resultaram em aumento dos

PLFAs bacterianos e os PLFAs fúngicos foram cerca de 2 vezes maiores do que no controle.

A A β G e o AD foram correlacionados com diferentes PLFAs do solo, por isso seriam ferramentas úteis para avaliar a transformação biogeoquímica e a atividade metabólica de microrganismos do solo, uma vez que atividades microbianas são consideradas importantes componentes da atividade biológica do solo. Os resultados confirmam a hipótese de que o biofertilizante, quando aplicado em doses maiores (B2 e B3), pode ser uma alternativa viável para promover a fertilidade do solo.

Referências

AGEHARA, S.; WARNCKE, D. D. Soil moisture and temperature effects on nitrogen release from organic nitrogen sources. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 69, p. 1844-1855, 2005. Disponível em: <<https://doi:10.2136/sssaj2004.0361>>.

ALLISON, S. D.; VITOUSEK, P. M. Response of extracellular enzymes to simple and complex nutrient inputs. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 37, n. 5, p. 937-944, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.09.014>>.

BANERJEE, A.; SANYAL, S.; SEN, S. Soil phosphatase activity of agricultural land: A possible index of soil fertility. **Agricultural Science Research Journal**, Washington, v. 2, n. 7, p. 412-419, 2012.

BASTIDA, F.; TORRES, I. F.; ANDRÉS-ABELLÁN, M.; BALDRIAN, P.; LÓPEZ-MONDÉJAR, R.; VĚTROVSKÝ, T.; RICHNOW, H. H.; STARKE, R.; ODOÑO, S.; GARCÍA, C.; LÓPEZ-SERRANO, F. R.; JEHLICH, N. Differential sensitivity of total and active soil microbial communities to drought and forest management. **Global Change Biology**, Bethesda, v. 23, n. 10, p. 4185-4203, 2017. Disponível em: <<https://doi:10.1111/gcb.13790>>.

BASTIDA, F.; HERNÁNDEZ, T.; ALBALADEJO, J.; GARCÍA, C. Phylogenetic and functional changes in the microbial community of long-term restored soils under semiarid climate. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 65, p. 12-21, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.04.022>>.

BERGER, L. R.; STAMFORD, N. P.; 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**, Temuco, v. 13, n. 3, p. 592-603, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162013005000047>>.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959. Disponível em: <<https://doi.org/10.1139/o59-099>>.

BOSSIO, D. A.; SCOW, K. M. Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns. **Microbial Ecology**, Rockville, v. 35, n. 3-4, p. 265-278, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s002489900082>>.

BOWLES, T. M.; ACOSTA-MARTÍNEZ, V.; CALDERÓN, F.; JACKSON, L. E. Soil enzyme activities, microbial communities, and carbon and nitrogen availability in organic agroecosystems across an intensively-managed agricultural landscape. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 68, p. 252-262, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.10.004>>.

BRANT, J. B.; SULZMAN, E. W.; MYROLD, D. D. Microbial community utilization of added carbon substrates in response to long-term carbon input manipulation. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 38, n. 8, p. 2219-2232, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.01.022>>.

CUSACK, D. F. Soil nitrogen levels are linked to decomposition enzyme activities along an urban-remote tropical forest gradient. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 57, p. 192-203, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.07.012>>.

DG Env. **Working document Biological Treatment of Biowaste**, 2nd Draft. Directorate-General Environment, Directorate A - Sustainable Development and Policy Support, ENV.A.2 – Sustainable Resources, Brussels, European Union, 2001. p. 20.

DINESH, R.; ANANDARAJ, M.; KUMAR, A.; SRINIVASAN, V.; BINI, Y. K.; SUBILA, K. P.; ARAVIND, R.; HAMZA, S. Effects of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and NPK Fertilizers on Biochemical and Microbial Properties of Soils Under Ginger (*Zingiber officinale*) Cultivation. **Agricultural Research**, New Delhi, v. 2, n. 4, p. 346-353, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40003-013-0080-8>>.

DUNGAIT, J. A. J.; KEMMITT, S. J.; MICHALLON, L.; GUO, S.; WEN, Q.; BROOKES, P. C.; EVERSLED, R. P. Variable responses of the soil microbial biomass to trace concentrations of ¹³C-labelled glucose, using ¹³C-PLFA analysis. **European Journal of Soil Science**, Bedfordshire, v. 62, n. 1, p. 117-126, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2010.01321.x>>.

EIVAZI, F.; TABATABAI, M. A. Glucosidases and galactosidases in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 20, n. 5, p. 601-606, 1988. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(88\)90141-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(88)90141-1)>.

EL-TARABILY, K. A.; SOAUD, A. A.; SALEH, M. E.; MATSUMOTO, S. Isolation and characterization of sulfur bacteria, including strains of *Rhizobium* from calcareous soils and their effects on nutrient uptake and growth of maize (*Zea mays* L.) . **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 57, n. 1, p. 101-111, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1071/AR04237>>.

ENOWASHU, E.; POLL, C.; LAMERSDORF, N.; KANDELER, E. Microbial biomass and enzyme activities under reduced nitrogen deposition in a spruce forest soil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 43, n. 1, p. 11-21, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2009.05.003>>.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **World Reference Base for Soil Resources 2014**, update 2015 International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. World Soil Resources Reports 106. FAO, Rome, 2015.

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

FRANCO, L. O.; MAIA, R. C. C.; PORTO, A. L. F.; MESSIAS, A. S.; FUKUSHIMA, K.; TAKAKI, G. M. C. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 243-247, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822004000200013>>.

FROSTEGÅRD, A.; BÅÅTH, E.; TUNLID, A. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 25, n. 6, p. 723-730, 1993. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(93\)90113-P](https://doi.org/10.1016/0038-0717(93)90113-P)>.

GARCÍA, C.; HERNÁNDEZ, T.; COSTA, F. Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. **Communications Soil Science of Plant Analysis**, Londres, v. 28, p. 123-134, 1997. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00103629709369777>>.

GARCIA-RUÍZ, R.; OCHOA, M. V.; HINOJOSA, M. B.; GÓMEZ-MUÑOZ, B. Improved soil quality after 16 year of olive mil pomace application in olive oil groves. **Agronomy of Sustainable Development**, Dordrecht, v. 32, n. 3, p. 803-810, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13593-011-0080-7>>.

GEISSELER, D.; HORWATH, W. R.; JOERGENSEN, R. G.; LUDWIG, B. Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms - a review. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 42, n. 12, p. 2058-2067, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.08.021>>.

GEISSELER, D.; SCOW, K. M. Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms - A review. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 75, p. 54-63, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.03.023>>.

GIACOMETTI, C.; DEYMAN, M. S.; CAVANI, L.; MARZADORI, C.; CIAVATTA, C.; KANDELER, E. Chemical and biochemical soil quality indicators and their potential to differentiate fertilization regimes in temperate agroecosystems. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 64, p. 32-48, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.10.002>>.

GOY, R. C.; BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 19, n. 3, p. 241-247, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282009000300013>>.

GUCKERT, J. B.; ANTWORTH, C. P.; NICHOLS, P. D.; WHITE, D. C. Phospholipid, ester-linked fatty acids profiles as reproducible assays for changes in prokaryotic community structure of estuarine sediments. **FEMS Microbiology Ecology**, Delft, v. 1, n. 3, p. 147-158, 1985. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1985.tb01143.x>>.

HERNÁNDEZ, T.; CHOCANO, C.; MORENO, J. L.; GARCÍA, C. Use of compost as an alternative to conventional inorganic fertilizers in intensive lettuce (*Lactuca sativa* L.) crops - Effects on soil and plant. **Soil Tillage Research**, Amsterdam, v. 160, p. 14-22, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.still.2016.02.005>>.

IGALAVITHANA, A. D.; LEE, S. S.; NIAZI, N. K.; LEE, Y. H.; KIM, K. H.; PARK, J. H.; MOON, D. H.; OK, Y. S. Assessment of Soil Health in Urban Agriculture: Soil Enzymes and Microbial Properties. **Sustainability**, Basileia, v. 9, n. 2, p. 1-14, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/su9020310>>.

LAL, R. Beyond Copenhagen: mitigating climate change and achieving food security through soil carbon sequestration. **Food Security**, Dordrecht, v. 2, n. 2, p. 169-177, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12571-010-0060-9>>.

LIANG, B.; ZHAO, W.; YANG, X.; ZHOU, J. Fate of nitrogen-15 as influenced by soil and nutrient management history in a 19-year wheat–maize experiment. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 144, p. 126-134, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fcr.2012.12.007>>.

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 Journal of Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 26, n. 10, p. 1769-1775, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-010-0357-z>>.

LIMA, R. C. M.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S.; DIAS, S. H. L. Rendimento da alface e atributos químicos de um Latossolo em função da aplicação de biofertilizantes de rochas com fósforo e potássio. **Horticultura Brasileira**, Recife, v. 25, n. 2, p. 224-229, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362007000200019>>.

KANDELER, E.; GERBER, H. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. **Biology and Fertility of Soils**, Dordrecht, v. 6, n. 1, p. 68-72, 1988.

KELLY, D. P.; WOOD, A. P. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. **International Journal of Systematic and Evolutive Microbiology**, London, v. 50, p. 511-516, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/00207713-50-2-511>>.

KEUSKAMP, J. A.; FELLER, I. C.; LAANBROEK, H. J.; VERHOEVEN, J. T. A.; HEFTING, M. M. Short- and long-term effects of nutrient enrichment on microbial exoenzyme activity in mangrove peat. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 81, p. 38-47, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.11.003>>.

KOWALSKI, B.; TERRY, F. J.; HERRERA, L.; PEÑALVER, D. S. Application of soluble chitosan in vitro and in the greenhouse to increase yield and seed quality of potato minitubers. **Potato Research**, Dordrecht, v. 49, n. 3, p. 167-176, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11540-006-9015-0>>.

KRÄMER, S.; GREEN, D. M. Acid and alkaline phosphatase dynamics and their relationship to soil microclimate in a semiarid woodland. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 32, n. 2, p. 179-188, 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00140-6](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00140-6)>.

KÖRSCHENS, M. The importance of long-term field experiments for soil science and environmental research – a review. **Plant, Soil and Environment**, Prague, v. 52, p. 1-8, 2006.

MEENA, V. S.; MAURYA, B. R.; VERMAC, J. P.; AEROND, A.; KUMARA, A.; KIM, K.; BAJPAIF, V. K. Potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): isolation, identification, and K-release dynamics from waste mica. **Ecological Engineering**, Prague, v. 81, p. 340-347, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.04.065>>.

MONTEMURRO, F.; CIACCIA, C.; LEOGRANDE, R.; CEGLIE, F.; DIACONO, M. Suitability of different organic amendments from agro-industrial wastes in organic lettuce crops. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 102, n. 2, p. 243-252, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10705-015-9694-5>>.

NAMLI, A.; MAHMOOD, A.; SEVILIR, B.; ÖZKIR, E. Effect of phosphorus solubilizing bacteria on some soil properties, wheat yield and nutrient contents. **Eurasian Journal of Soil Science**, Samsun, v. 6, n. 3, p. 249-258, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.18393/ejss.293157>>.

NANNIPIERI, P. Role of stabilised enzymes in microbial ecology and enzyme extraction from soil with potential applications in soil proteomics. **Soil Biology**, Westerham, v. 8, p. 75-94, 2006.

OLIVEIRA, W. S.; STAMFORD, N. P.; SILVA, E. V. N.; SANTOS, C. E. R. S.; 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**, Brisbane, v. 8, n. 7, p. 1124-1131, 2014.

QIAN, X.; GU, J.; SUN, W.; LI, Y. D.; FU, Q. X.; WANG, X. J. Changes in the soil nutrient levels, enzyme activities, microbial community function, and structure during apple orchard maturation. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 77, p. 18-25, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.01.003>>.

RAMÍREZ, L. C. C.; GALVEZ, Z. Y. A.; BURBANO, V. E. M. Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. **NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas**, Bogotá, v. 12, n. 21, p. 68-79, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.22490/24629448.997>>.

RINNAN, R.; BÅÅTH, E. Differential utilization of carbon substrates by bacteria and fungi in tundra soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 11, p. 3611–3620, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02865-08>>.

SATYAPRAKASH, M.; NIKITHA, T.; REDDI, E. U. B.; SADHANA, B.; SATYA VANI, S. Phosphorous and Phosphate Solubilising Bacteria and their Role in Plant Nutrition. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Tamilnadu, v. 6, n. 4, p. 2133-2144, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2017.604.251>>.

SCHLOTTER, M.; DILLY, O.; MUNCH, J. C. Indicators for evaluating soil quality. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 98, n. 1-3, p. 255-262, 2003.

SILVA, É. M. J.; SILVA, T. P.; MATOS, T. E. S.; AMORIM, I. A.; AQUINO, A. L.; MELLO, A. H. **Análise das propriedades químicas de um solo em relação aos diferentes usos e manejos em uma propriedade rural familiar no sudeste do Pará**. Cadernos de Agroecologia, 2016, p. 10.

SINSABAUGH, R. L.; SHAH, J. F. Ecoenzymatic stoichiometry of recalcitrant organic matter decomposition: the growth rate hypothesis in reverse. **Biogeochemistry**, New York, v. 102, n. 1-3, p. 31-43, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10533-010-9482-x>>.

STAMFORD, N. P.; SILVA, E. V. N.; OLIVEIRA, W. S.; SILVA, M. C. F.; MARTINS, M. S.; SILVA, V. S. G. Organic matter inoculated with diazotrophic bacterium *Beijerinckia indica* and *Cunninghamella elegans* fungus containing chitosan on banana “Williams” in field. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 39, n. 1, p. 33-41, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v39i1.30857>>.

STAMFORD, N. P.; NETO, D. E. S.; FREITAS, A. D. S.; OLIVEIRA, E. C. A.; OLIVEIRA, W. S.; CRUZ, L. Rock biofertilizer and earthworm compost on sugarcane performance and soil attributes in two consecutive years. **Scientia Agricola**, São Paulo, v. 73, n. 1, p. 29-33, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0005>>.

STAMFORD, N. P.; FIGUEIREDO, M. V. B.; SILVA JUNIOR, S.; FREITAS, A. D. S.; SANTOS, C. E. R. S.; LIRA JUNIOR, M. A. Effect of gypsum and sulfur with *Acidithiobacillus* on soil salinity alleviation and on cowpea biomass and nutrient status as affected by PK rock biofertilizer. **Scientia Horticulture**, Amsterdam, v. 192, n. 31, p. 287-292, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.06.008>>.

STAMFORD, N. P.; SILVA JUNIOR, 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 biofertilizers with diazotrophic bacteria and fungi chitosan. **Australian Journal of Crop Science**, Brisbane, v. 8, n. 2, p. 301-306, 2014.

STAMFORD, N. P.; LIMA, R. A.; LIRA JUNIOR, M. A.; SANTOS, C. E. R. S. Effectiveness of phosphate and potash rocks with *Acidithiobacillus* on sugarcane yield and their effects in soil chemical attributes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 24, n. 10, p. 2061-2066, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-008-9710-x>>.

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

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 de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, n. 1, p. 75-83, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832004000100008>>.

STONE, M. M.; WEISS, M. S.; GOODALE, C. L.; ADAMS, M. B.; FERNANDEZ, I. J.; GERMAN, D. P.; ALLISON, S. D. Temperature sensitivity of soil enzyme kinetics under N fertilization in two temperate forests. **Global Change Biology**, Bethesda, v. 18, n. 3, p. 1173-1184, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2011.02545.x>>.

STOTT, D. E.; ANDREWS, S. S.; LIEBIG, M. A.; WIENHOLD, B. J.; KARLEN, D. L. Evaluation of β -glucosidase activity as a soil quality indicator for the soil management assessment framework. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 74, n. 1, p. 107-119, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.2136/sssaj2009.0029>>.

TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 1, n. 4, p. 301-307, 1969. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(69\)90012-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(69)90012-1)>.

TORRES, I. F.; GARCÍA, C.; RUIZ-NAVARRO, A.; HERNÁNDEZ, T.; BASTIDA, F. The enzymatic and physiological response of the microbial community in semiarid soil to carbon compounds from plants. **European Journal of Soil Science**, Reading, v. 67, n. 4, p. 456-469, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/ejss.12356>>.

TORRES, I. F.; BASTIDA, F.; HERNÁNDEZ, T.; GARCÍA, C. The effects of fresh and stabilized pruning wastes on the biomass, structure and activity of the soil microbial community in a semiarid climate. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 89, p. 1-9, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.12.009>>.

TURAN, M.; EKINCI, M.; YILDIRIM, E.; GÜNEŞ, A.; KARAGÖZ, K.; KOTAN, R.; DURSUN, A. Plant growth-promoting rhizobacteria improved growth, nutrient, and hormone content of cabbage (*Brassica oleracea*) seedlings. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Ankara, v. 38, n. 3, p. 327-333, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.3906/tar-1308-62>>.

UTOBO, E. B.; TEWARI, L. Soil enzymes as bioindicators of soil ecosystem status. **Applied Ecology and Environmental Research**, Buldapest, v.13, n. 1, p. 147-169, 2014. Disponível em: <http://doi.org/10.15666/aeer/1301_147169>.

UZ, I.; TAVALI, I. E. Short-Term Effect of Vermicompost Application on Biological Properties of an Alkaline Soil with High Lime Content from Mediterranean Region of Turkey. **The Scientific World Journal**, London, v. 2014, p. 1-11, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/395282>>.

VON MERSE, W. V.; SCHINNER, F. An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with iodinitrotetrazolium chloride. **Biology and Fertility of Soils**, Dordrecht, v. 11, n. 3, p. 216-220, 1991. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF00335770>>.

WAHSHA, M.; NADIMI-GOKI, M.; FORNASIER, F.; AL-JAWASREH, R.; HUSSEIN, E. I.; BINI, C. Microbial enzymes as an early warning management tool for monitoring mining site soils. **Catena**, Amsterdam, v. 148, p. 40-45, 2017.

WANG, C. Y.; HAN, G. M.; JIA, Y.; FENG, X. G.; GUO, P.; TIAN, X. J. Response of litter decomposition and related soil enzyme activities to different forms of nitrogen fertilization in a subtropical forest. **Ecological Research**, Tokyo, v. 26, n. 3, p. 505-513, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11284-011-0805-8>>.

WEAND, M. P.; ARTHUR, M. A.; LOVETT, G. M.; MCCULLEY, R. L.; WEATHERS, K. C. Effects of tree species and N additions on forest floor microbial communities and extracellular enzyme activities. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 42, n. 12, p. 2161-2173, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.08.012>>.

WINDING, A.; HUND-RINKE, K.; RUTGERS, M. The use of microorganism in ecological soil classification and assessment concepts. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Plymouth, v. 62, p.

CAPÍTULO 02

4 POTENCIAL DO FERTILIZANTE BIOLÓGICO NO CONTROLE E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA SOBRE *Meloidogyne incognita* EM CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.)

Potencial do fertilizante biológico no controle e indução de resistência sobre *Meloidogyne incognita* em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)

Resumo

A adoção de pesticidas químicos na agricultura ocasiona sérios riscos ambientais, razão pela qual, o controle biológico de doenças de plantas com biopesticidas é altamente recomendado. A quitosana é um agente de controle biológico, não-tóxica, biodegradável e biocompatíveis. No manejo integrado de nematoides parasitas da cana-de-açúcar, esse composto pode ser utilizado, ocasionando menores danos a natureza. O objetivo deste trabalho foi avaliar o controle de *Meloidogyne incognita* através da indução da atividade de enzimas antioxidantes em cana-de-açúcar (variedade RB92579) por meio do uso de fertilizante biológico em casa de vegetação; dessa feita foram utilizados 8 tratamentos, sendo quatro com fertilizante convencional na dose recomendada, em atuação isolada e em combinação com nematicidas (*Azadiractina*, *Bacillus* spp. e Benfuracarbe), mais três doses de fertilizante biológico ($2,5 \text{ t ha}^{-1}$, 5 t ha^{-1} e $7,5 \text{ t ha}^{-1}$), além do controle com torta de filtro 20 t ha^{-1} , inoculado e não-inoculado, em arranjo fatorial (8×2). Aos 60 dias após a inoculação foram avaliados o peso fresco da raiz e o fator de reprodução do nematoide; aos 20, 40 e 60 dias foram avaliados as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX). O fertilizante solúvel em combinação com nematicidas e o fertilizante biológico proporcionaram o decréscimo do fator de reprodução, reduzindo a população de *M. incognita* em cana-de-açúcar. A ativação da SOD, APX e CAT foram observadas aos 20 e 60 dias nos tratamentos com fertilizante biológico inoculados, resultando na ativação do sistema de defesa antioxidante enzimático, que influencia a resistência das plantas aos nematoides. Além disso, este estudo fornece uma nova alternativa que contribui para o manejo sustentável de culturas com bioagentes que possuem dupla ação, disponibilizando nutrientes e mitigando os nematoides parasitas de plantas.

Palavras-chave: Controle biológico. *Cunninghamella elegans*. Enzimas antioxidantes. Resistência sistêmica induzida.

Potential of biological fertilizer in the control and inducing resistance to *Meloidogyne incognita* on sugarcane (*Saccharum* spp.)

Abstract

Application of chemical pesticides in agricultural system may promote serious risks to the environment, and for this reason it is recommended for biological control of plant pathogens. Chitosan is a non-toxic, biodegradable and biocompatible agent biopolymer used in pathogenic control. In the integrated management of parasitic nematodes of sugarcane, this biopolymer can be used, without causing environmental damage. The aim of the study was to evaluate the control of *Meloidogyne incognita* through the induction of the activity of antioxidant enzymes in sugarcane (variety RB92579) using biological fertilizer in a greenhouse assay. The experiment was realized in a factorial arrangement (8x2), with 8 fertilization treatments, four with conventional fertilizer at the recommended dose, applied isolated action and in combination with nematicides (Azadirachtin, *Bacillus* spp. and Benfuracarbe), and with biological fertilizer applied in three doses (2.5 t ha⁻¹, 5.0 t ha⁻¹ and 7.5 t ha⁻¹), and added the control treatment with sugarcane mud cake (20 t ha⁻¹), with and without nematode inoculation. At 60 days of inoculation were evaluated: root fresh weight and the factor of nematode reproduction, and at 20, 40 and 60 days were evaluated the antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX). The conventional soluble fertilizer in combination with nematicides and the biological fertilizer promoted decrease of the factor of nematode reproduction, reducing the *M. incognita* population in sugarcane. The SOD, APX and CAT activation were observed at 20 and 60 days in the treatments with biological fertilizer inoculated with nematode and resulted in the activation of the enzymatic antioxidant defense system, that influence the plant defense to nematodes. The study provides a new alternative that contributes to the sustainable management of crops with dual acting bioagents, furnishing nutrients and mitigating plant parasitic nematodes.

Key-words: Antioxidant enzymes. Biological control. *Cunninghamella elegans*. Induction of sistematic resistance.

4.1 Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é uma cultura de grande expressão econômica no mundo; o Brasil é o maior produtor, tendo colhido 750 milhões de toneladas, em uma área plantada estimada em 8,7 milhões de hectares na safra 2017-2018 (CONAB, 2018). A expansão da cana-de-açúcar para novas fronteiras agrícolas para atender às demandas do mercado, permite que algumas doenças de plantas se tornem persistentes, dentre os quais se destaca a ação deletéria dos nematoides (DINARDO-MIRANDA, 2005; VIANNA; SENTELHAS, 2014).

No Brasil, três espécies de nematoides são conhecidas por serem importantes na cana-de-açúcar devido aos danos que causam, dentre elas os nematoides das galhas [*Meloidogyne incognita* (KOFROID; WHITE, 1919) Chitwood, 1949] e os nematoides das lesões radiculares *Pratylenchus zeae* Graham, 1951 (MOURA et al., 2000; DINARDO-MIRANDA, 2005; SEVERINO; DIAS-ARIEIRA; TESSMANN, 2010).

Os problemas causados pelos nematoides variam de acordo com a densidade populacional, tipo de solo, umidade e variedade de cana que é cultivada. Para variedades muito suscetíveis e alta densidade populacional de nematoides, as perdas causadas por nematoides pode chegar a 50% na cultura da cana-de-açúcar (DINARDO-MIRANDA et al., 2008), danos à colheita da soca também devem ser incluídos. No entanto, essas perdas podem variar dependendo das espécies de fitonematoides, seus níveis populacionais, suscetibilidade da variedade de cana-de-açúcar e período de crescimento (CHAVES et al., 2009).

A importância dos nematoides das galhas de cana-de-açúcar pode ser notada pela diminuição do rendimento em função das dificuldades de controle desses patógenos (BARROS et al., 2005; DINARDO-MIRANDA et al., 2008). Devido ao difícil controle, vários métodos de controle são recomendados para o manejo de fitonematoides em cana-de-açúcar (CHAVES et al., 2004, 2018). Contudo, a eficiência desses métodos isolados é frequentemente questionável e diversas pesquisas vem sendo realizadas, visando diminuir as populações de fitonematoides em canaviais para níveis abaixo do limite de dano econômico. A indução artificial de resistência em plantas tem sido explorada com uma ferramenta para o controle de doenças em várias culturas, e pode ser ativada através de mecanismos naturais de

defesa estimuladas por agentes bióticos, bem como a aplicação de diferentes agentes abióticos não sendo frequentemente descrito na literatura (JAGDALE; KAMOUN; GREWAL, 2009; KONE; CSINOS; JACKSON, 2009).

Os estresses (bióticos ou abióticos) impostos às plantas induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), funcionando como uma rede de sinalização a situações estressantes, caracterizado por mudanças na expressão de vários genes relacionados ao metabolismo e transdução de sinal. Estudos associaram o nível de EROs e a atividade de enzimas antioxidantes de defesa na resposta ao estresse abiótico e ao ataque de patógenos (BARBOSA et al., 2014; NIKOO et al., 2014). Organismos se protegem contra estresse oxidativo pela síntese ou indução de vários antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos (SAED-MOUCHESHI et al., 2014), que juntas funcionam para eliminar as EROs prevenindo ou reduzindo o dano oxidativo que envolve, entre outros processos.

As enzimas mais importantes envolvidas na desintoxicação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são: a atividade da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e peroxidases (POX) (MITTLER, 2002; KIM; KWAK, 2010; BHATT; TRIPATHI, 2011; SAED-MOUCHESHI et al., 2014; KESBA; EL-BELTAGI, 2012).

A prevenção e controle dessas pragas configuram como objetivo importante da maioria das pesquisas. Os fitonematoides são controlados por práticas culturais, nematicidas químicos ou utilizando cultivares resistentes (TALAVERA et al., 2012; BARKER; KOENNING, 1998; CURTO et al., 2006). O controle químico é caro e economicamente viável apenas para culturas de alto valor, mas cria um risco potencial ao meio ambiente e à saúde humana. Portanto, métodos alternativos menos tóxicos precisam ser desenvolvidos para o controle de nematoides (NOLING; BECKER, 1994; PLOEG, 2008; WIRATNO et al., 2009). Estudos relatam que a quitina e a quitosana têm atividade nematostática e nematicida útil para aplicações agrícolas pela mistura de quantidades eficazes a um meio de crescimento vegetal (CARDENAS-TRIVINO et al., 1989; VASYUKOVA et al., 2001; ABOUD et al., 2002; KALAIARASAN et al., 2006).

A aplicação de quitina no solo aumenta a população de microrganismos quitinolíticos que pode levar a supressão de fitonematoides no solo (CASTRO; FLORES; URIBE, 2011), podendo atuar como importante fonte de carbono e

sinalizar moléculas para regular a produção de quitinase (CHEN et al., 2015), no entanto, até o momento, informações sobre o mecanismo nematocida da quitinase são limitadas na literatura (YANG et al., 2013).

A quitosana é um derivado desacetilado de polissacarídeo da quitina, e pode ser encontrado em casca de crustáceos e nas paredes celulares de certos fungos (FRANCO et al., 2011; DIAS et al., 2013). Tem sido relatado que a quitosana apresentou atividade eliciadora induzindo mecanismos de resistência local e sistêmica de plantas de tomate contra o nematoide de galhas, *M. incognita* (RADWAN et al., 2012). Vários estudos mostraram que a quitosana pode induzir a resistência de plantas a vários patógenos, restringindo o crescimento do patógeno e/ou provocando vários mecanismos de defesa de plantas (CHITTENDEN; SINGH, 2009; LÓPEZ-MONDÉJAR et al., 2012), além de ser biodegradável e ambientalmente segura (KUMAR, 2000).

Segundo Khalil e Badawy (2012) a quitosana reduz a infecção por nematoide de galha e a gravidade da doença no tomate. O modo de ação da quitosana como indutor de resistência é atribuído a biossíntese de lignina e lignificação da parede celular, acúmulo de quitinases, além da síntese de moléculas envolvidas nos caminhos de sinalização intracelular que conduzem à ativação de outras respostas de defesa (BERGER et al., 2013; MELO et al., 2012). A companhia de enzimas quitinolíticas nesses organismos confirma algumas funções adicionais que vão da nutrição à defesa (HAMID et al., 2013).

O biofertilizante misto além de ser uma fonte alternativa de adição de nutrientes para as plantas, especialmente quando inoculado com o fungo *Cunninghamella elegans*, que contém quitina e quitosana em sua parede celular (FRANCO et al., 2011), mostrou potencial do produto (bioprotetor – PNPk) expressando propriedades antimicrobianas para proteção de plantas contra patógenos e aumentando a disponibilidade de nutrientes (BERGER et al., 2013; STAMFORD et al., 2014).

Este estudo teve como objetivo, investigar o efeito do fertilizante biológico produzido a partir de rochas com *Acidithiobacillus* sp., inoculado com *B. indica* e *C. elegans* no controle de nematoides, além de avaliar a ativação dos mecanismos de resistência em cana-de-açúcar (variedade RB92579) a *Meloidogyne incognita* empregando enzimas como marcadores de estresse oxidativo, considerando a hipótese de que a eficácia do controle biológico é equivalente ao controle químico.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Experimento em vasos com solo (mudas de cana-de-açúcar)

O experimento em casa de vegetação foi realizado na Estação Experimental de Cana-de-açúcar do Carpina (EECAC), no município de Carpina/Pernambuco. O município está localizado na Zona da Mata Norte do Estado, com altitude média de 180 m e coordenadas geográficas de 7°51'04" S e 35°14'27" W. O clima predominante na região é do tipo As', tropical chuvoso com verão seco e temperatura média anual de 24,2 °C (BELTÃO et al., 2005). Foram utilizados vasos de plástico com capacidade para 7 dm³, contendo solo coletado na área canavieira da EECAC, na profundidade de 0-40 cm. O solo foi inicialmente passado em peneira (4 mm), autoclavado (120 °C, pressão de 101 kPa), três vezes, durante 1 hora, com intervalo de 24 h, e utilizado 7 dias após a desinfestação.

A caracterização química e física do solo foi realizada em amostras compostas nas profundidades de 0-20 cm e 20-40 cm (Tabela 1). Para caracterização química se determinou o pH (H₂O), P, K⁺, Na⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺. O P, K⁺ e Na⁺ foram extraídos com Mehlich 1. O P determinado por espectrofotometria, o K⁺ e Na⁺ por fotometria de chama. O Ca²⁺ e Mg²⁺ foram extraídos com KCl 1,0 mol L⁻¹ e determinado por espectrofotometria de absorção atômica. Todas as análises foram realizadas conforme metodologias descritas pela Embrapa (2009). Com os resultados destas análises químicas, calculou-se a saturação por bases (V) e a capacidade de troca de cátions efetiva (CTC_{efetiva}).

Para as características físicas do solo foram realizadas as análises de granulometria do solo, quantificando as frações areia, silte e argila, definindo sua classe textural; densidade do solo; densidade das partículas pelo método do densímetro, segundo a metodologia da Embrapa (1997).

A variedade de cana-de-açúcar utilizada foi a RB 92579, indicada Estação Experimental de Cana-de-açúcar do Carpina (EECAC) e cedida pela Usina São José/Igarassu-PE. Após 10 dias de aclimatação em substrato, na casa de vegetação, as plantas foram transplantadas para os vasos contendo solo.

Os inóculos de *M. incognita* foram produzidos a partir de populações puras, mantidas em casa de vegetação, em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) 'Santa Cruz Kadá' durante três meses. Os ovos e juvenis foram extraídos pela metodologia proposta por Hussey e Barker (1973), adaptada por Boneti e Ferraz (1981), sendo a

suspensão calibrada para 1.000 ovos em 1 ml de água, com auxílio de lâmina de Peters e microscópio óptico. A inoculação das plantas de cana-de-açúcar foi realizada utilizando-se 2 ml da suspensão do inóculo dos respectivos nematoides, a qual foi uniformemente distribuída em quatro orifícios de aproximadamente 4 cm de profundidade, ao redor da planta.

Tabela 1. Atributos químicos e físicos do solo em diferentes profundidades na área do ensaio de campo no Engenho Água Branca, Usina São José S/A; Igarassu – PE

Atributos Químicos								
Prof. (cm)	pH H ₂ O (1:2,5)	P mg dm ⁻³	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	CTC _{efetiva}	V %
			-----Cmolc dm ⁻³ -----					
(0 - 20)	5,4	2,87	0,18	0,03	2,73	0,01	3,12	52,86
(20 - 40)	5,1	2,42	0,11	0,03	2,25	0,01	2,69	46,38

Atributos Físicos							
Prof. (cm)	Granulometria (%)				Ds ¹	Dp ²	Classe Textural
	Areia Grossa	Areia Fina	Silte	Argila			
(0 - 20)	56,40	17,90	6,50	19,20	1,40	2,47	Franco
(20 - 40)	53,16	14,74	10,90	21,20	1,36	2,53	arenosa

¹Densidade do solo; ²Densidade aparente.

O experimento foi conduzido no arranjo fatorial (8x2) em delineamento casualizado, com quatro repetições. Foram aplicados na variedade (RB 92579) os seguintes tratamentos de fertilização: (1) FC: Fertilizante Convencional - 100% da Dose Recomendada (DR - IPA, 2008); (2) FC + Az: FC 100% DR + Azadiractina (AZAMAX®); (3) FC + NE: FC 100% DR + *Bacillus* spp. (NEMIX®); (4) FC + PO: FC 100% DR + Benfuracarbe (POTTENTE®); (5) Biológico 50%: Fertilizante biológico 50% DR (2,5 t ha⁻¹); (6) Biológico 100%: Fertilizante biológico 100% DR (5 t ha⁻¹); (7) Biológico 150%: Fertilizante biológico 150% DR (7,5 t ha⁻¹); (8) Controle (20 t ha⁻¹ de torta de filtro). Sendo utilizados três níveis do fertilizante biológico, três tratamentos com fertilizante solúvel convencional em combinação com nematicidas comerciais (*Bacillus* spp. (NEMIX®), Azadiractina (AZAMAX®) e Benfuracarbe (POTTENTE®)), no nível 100 % da recomendação para a cultura da cana-de-açúcar de acordo com o Manual de Recomendação de Adubação do Estado de Pernambuco (IPA, 2008),

mais a adição de um tratamento controle (torta de filtro), todos os tratamentos inoculados e não-inoculados com o nematoide *Meloidogyne incognita*.

Antes do plantio, o bioprotetor e o fertilizante mineral foram misturados ao solo, na proporção especificada. As plantas foram obtidas de rebolos, em seguida foram transplantadas para os vasos plásticos contendo solo, coletadas na Estação Experimental de Cana-de-açúcar do Carpina (EECAC), logo após foram pulverizados com os nematicidas especificados acima em seus respectivos tratamentos. Nos tratamentos com nematoides, as plantas foram inoculadas artificialmente com *Meloidogyne incognita* (2.000 ovos por vaso).

A cana-de-açúcar foi cultivada por 60 dias após a inoculação, e na ocasião da colheita, foram feitas as seguintes avaliações: peso fresco da raiz, fator de reprodução (FR) do nematoide e na parte aérea foram realizadas determinações das atividades enzimáticas Superóxido dismutase (SOD), Ascorbato peroxidase (APX), Catalase (CAT) e proteínas totais foram realizadas aos 20, 40 e 60 dias após inoculação dos nematoides.

4.2.2 Produção do fertilizante biológico

Os biofertilizantes de rocha fosfática e potássica foram produzidos na horta da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, em canteiro com 10 m de comprimento, 1,0 m de largura e 0,50 m de profundidade. Como fonte de P e K foi utilizada apatita natural de Irecê (Bahia), com 24 % de P_2O_5 total e rocha potássica (Relinktum) oriunda de Minas Gerais, com 8 % de K_2O total. Foi adicionado enxofre elementar (S^0) na proporção de 1:10 (S: rocha) inoculado com as bactérias oxidante do enxofre *Acidithiobacillus thiooxidans* e *A. ferrooxidans* (STAMFORD et al., 2008).

O cultivo dos *A. thiooxidans* FG01 e *A. ferrooxidans* LR, foi realizado em meio específico 9K (SILVERMAN; LUNDGREN, 1959), esterilizado a 120°C a uma pressão de 101 KPa, por 20 minutos em autoclave vertical. Em Erlenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL de meio no qual foi inoculada a bactéria, sendo os Erlenmeyers colocados em agitação a 150 rpm, por 20 dias a 28-30°C.

Para a produção do biofertilizante misto, com a finalidade de obter um biofertilizante rico em nitrogênio, fósforo e potássio foi realizada a inoculação com a bactéria diazotrófica de vida livre *Beijerinckia indica* (NFB 10.001), isolada por Lima et al. (2010). A bactéria diazotrófica de vida livre foi selecionada e catalogada pelo

Núcleo de Fixação Biológica do N₂ nos Trópicos da UFRPE, através de ensaios no Laboratório de Microbiologia do Solo.

Na produção da biofertilizante misto, foi adicionada matéria orgânica (húmus de minhoca + Torta de filtro) aos biofertilizantes (BP+BK), na proporção 0,5: 0,5: 3,0 (BP: BK: M.O.) e inoculado a bactéria diazotrófica de vida livre. Na preparação do inóculo, a bactéria *B. indica* foi cultivada no meio de cultura (LG líquido) em fermentador de vidro com capacidade para 20 L, por 5 dias (\pm 28°C). Na inoculação utilizaremos 100 mL de inóculo com 5% de concentração para cada 4 dm³ de biofertilizante fosfatado e potássico (BP e BK) com matéria orgânica (MO). Como fonte de carbono facilmente disponível para proporcionar maior eficiência das bactérias diazotróficas de vida livre, foi adicionado ao canteiro 1,0 m³ de resíduo de sorvete, cedido pela indústria Unilever Recife (Sorvetes Kibon).

O bioprotetor (PNPK) foi produzido a partir do biofertilizante misto descrito acima, inoculado com massa micelial do fungo *Cunninghamella elegans* (UCP 542), cedido pelo Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP). Para a produção do bioprotetor, o fungo *C. elegans* foi purificado em placas de Petri (meio BDA) por 10 dias a 28 °C (FRANCO et al., 2011). A partir da cultura de *C. elegans*, o fungo da ordem Mucorales foi cultivado em meio Batata-Dextrose (BD) de acordo com Franco et al. (2005), em Erlenmeyers de 2000 mL, sob agitação a 180 rpm (28 °C), durante 96 h. A massa micelial do fungo foi aplicada numa concentração final de 10⁸ células viáveis mL⁻¹, diluindo-se 1,5 L de cultura em 10L de água destilada e em seguida realizando a aplicação manual com uso de regador, mantendo o material incubado por 30 dias.

4.2.3 Determinação da população de *M. incognita*

Após 60 dias as plantas foram retiradas dos vasos, coletando-se os sistemas radiculares, os quais foram cuidadosamente lavados. A estimativa da população final (Pf) foi realizada pelo somatório do número de nematoides no sistema radicular, determinado através da extração de ovos e juvenis de raízes seguindo a metodologia de Hussey e Barker (1973), adaptada por Boneti e Ferraz (1981). O material obtido foi avaliado sob microscópio óptico, em lâmina de Peters. Os valores foram utilizados, para calcular o Fator de Reprodução (FR) do nematoide através da equação $FR = (Pf / Pi)$, onde FR, Pf e Pi correspondem ao fator de reprodução,

população final e população inicial, respectivamente. Para o cálculo dos FRs foi considerada $P_i = 2.000$ (NASU et al., 2010).

4.2.4 Determinação da atividade enzimática

Atividades enzimáticas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT), e teor de proteína solúvel (PROT) foram determinadas nas folhas da cana-de-açúcar inoculadas e não-inoculadas, tratadas com fertilizante solúvel em combinação com nematicidas comerciais comparados com fertilizante biológico em três doses. Amostras de folhas foram coletadas aos 20, 40 e 60 dias após inoculação (DAI), enroladas em papel alumínio e acondicionadas em nitrogênio líquido, para análises bioquímicas. No laboratório, a determinação da atividade das enzimas foi realizada, utilizando 0,2 g de material vegetal macerados em almofariz com nitrogênio líquido em 2 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7.5) e polivinilpirrolidona (PVPP), centrifugado a 10.000g durante 15 min a 4°C. O sobrenadante obtido, fração contendo proteínas solúveis, foi armazenado a -20°C para posterior determinação das atividades enzimáticas antioxidativas; ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), de acordo com a metodologia descrita por Oliveira et al. (2010).

4.2.4.1 Atividade superóxido dismutase

A atividade da SOD foi determinada a partir da inibição da redução do nitrobluetetrazolium (NBT) pelo extrato enzimático, evitando assim a formação do cromóforo. A solução de reação (3 mL) foi constituída de 85 mM de tampão fosfato (pH 7.8), 75 μ M de NBT, 5 μ M riboflavina, 13 mM de metionina, 0,1 mM EDTA e 50 μ L de extrato enzimático. A solução foi adicionada em tubos de vidro e irradiada com luz branca (lâmpada fluorescente de 15 W) por 5 min. Após esse período de exposição, a solução foi analisada em espectrofotômetro a 560 nm (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977).

4.2.4.2 Atividade de ascorbato peroxidase

A determinação da atividade da APX foi realizada por meio de reação composta por 1.335 μ L de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7.5), 75 μ L de ascorbato 10 mM, 15 μ L H_2O_2 100 mM e 75 μ L do extrato. A atividade da APX foi determinada pelo monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato, em

espectrofotômetro a 290 nm, a 30 °C, durante 60 segundos (NAKANO; ASADA, 1981).

4.2.4.3 Atividade de catalase

A atividade da CAT foi determinada em solução contendo 1.390 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7.5) e 60 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 500 mM. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL do extrato proteico e a atividade determinada seguindo-se a decomposição do H₂O₂ por 60 segundos, em espectrofotômetro a 240 nm, sob temperatura de 30°C (HAVIR; MCHALE, 1987).

4.2.4.4 Determinação de proteínas totais

O teor de proteínas totais foi determinado usando o método de Bradford (1976), consistindo de 100 µL de preparação enzimática e 2 mL de reagente Bradford (250 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250, 125 mL etanol, 125 mL de ácido fosfórico (H₃PO₄) e 250 mL de água destilada). Após adicionar o reagente sob agitação suave e incubado por 5 minutos, foi efetuado a leitura no comprimento de onda 595 nm. A absorbância foi plotada em curva padrão ($y = 0,0008x + 0,0381$), onde y é a absorbância a 595 nm e x a concentração de proteína (µg).

4.2.5 Análise estatística

Para todas as variáveis estudadas, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias separadas através do teste t (LSD - Least Significant Difference (Diferença menos significativa)). Os dados relativos as atividades enzimáticas foram submetidos a análise de variância com medida repetida no tempo, utilizando o programa estatístico SAS (SAS Institute 2011) com níveis de significância de 5% de probabilidade (Tabelas S1, S2, S3, S4 e S5, informações de suporte).

4.3 Resultados

4.3.1 Potencial Nematicida do Biofertilizante

O efeito nematicida dos tratamentos de fertilização foi avaliado em relação ao peso fresco da raiz (PFR) e ao fator de reprodução (FR) do *Meloidogyne incognita*, com plantas de cana-de-açúcar cultivadas por 60 dias em casa de vegetação (Tabela 2).

Tabela 2. Peso fresco da raiz (PFR) e fator de reprodução (FR) nos diferentes tratamentos de fertilização em cana-de-açúcar inoculada e não-inoculada com *Meloidogyne incognita*

Tratamentos ¹	PFR (g)		FR
	Inoculado	Não-inoculado	Pf/Pi
FC	11,70 eB	20,30 bA	1,64
FC+Az	16,76 dB	25,40 aA	0,64
FC+NE	21,72 bcB	27,58 aA	0,20
FC+PO	19,38 cdB	25,06 aA	0,29
Bio 50%	21,90 bcA	24,98 abA	0,30
Bio 100%	25,28 abA	24,42 abA	0,28
Bio 150%	28,66 aA	26,28 aA	0,39
Controle	18,26 cdB	24,28 abA	0,70
C.V. (%)	16,63		

¹Tratamentos: FC: fertilizante solúvel convencional (FC 100% Dose Recomendada - DR); FC+Az: FC 100% (DR) + Azadiractina (AZAMAX®); FC + NE: FC 100% (DR) + *Bacillus* spp. (NEMIX®); FC + PO: FC 100% (DR) + Benfuracarbe (POTTENTE®); Bio 50%: Fertilizante biológico 50% DR (equivalente a 2,5 t ha⁻¹); Bio 100%: Fertilizante biológico 100% DR (equivalente a 5 t ha⁻¹); Bio 150%: Fertilizante biológico 150% DR (equivalente a 7,5 t ha⁻¹); Controle (20 t ha⁻¹ de torta de filtro). Letras maiúsculas iguais na linha (Nematoide) e minúsculas na coluna (Fertilizantes) não diferem pelo teste t ($p < 0,05$)

De um modo geral, os melhores resultados para o peso fresco da raiz foram encontrados nos tratamentos com fertilizante biológico nas diferentes doses. Para os tratamentos inoculados, o tratamento Bio 150% apresentou efeito positivo significativo em comparação com os demais resultando no maior PFR (28,66 g), enquanto que a menor massa fresca da raiz (11,70 g) foi encontrada no tratamento FC com fertilizante solúvel (Tabela 2). Nos tratamentos não-inoculados, as médias do PFR foram maiores em comparação aos inoculados diferindo significativamente

($p < 0,05$), contudo os tratamentos seguiram o mesmo comportamento anterior com o fertilizante biológico proporcionando os melhores resultados.

Com relação ao fator de reprodução (FR), também se observou que os tratamentos com fertilizante biológico em todas as doses, tiveram comportamento semelhante aos do fertilizante solúvel em combinação com nematicidas comercial variando de 0,20 a 0,64 apresentando baixos valores para os parâmetros em questão (Tabela 2). Para o FR, a maior redução ocorreu no tratamento FC+NE, seguido do FC+PO e dos fertilizantes biológicos, demonstrando claramente que esses tratamentos suprimiram a doença, e os maiores FR ocorreram nos tratamentos FC e controle com valores de 1,64 e 0,70 respectivamente. O FR abaixo de 1,0 indica que os tratamentos químicos e biológicos reduziram a população de nematoides no solo.

Os resultados positivos obtidos no FR pela aplicação do fertilizante biológico, são justificados pela presença da quitina e quitosana oriundas da biomassa do fungo *Cunninghamella elegans* utilizada no processo de produção do fertilizante.

4.3.2 Atividade enzimática e teor de proteína

Nas atividades enzimáticas e antioxidantes, verificou-se que houve interação significativa entre os fatores tempo, tratamento de fertilização e nematoide para a enzima superóxido dismutase (Figura 1 A, B).

A atividade da enzima SOD em plantas não-inoculadas com *Meloidogyne incognita* não seguiu a mesma tendência verificada nos tratamentos de fertilização, quando as plantas foram inoculadas com *M. incognita*. Um pico da atividade nos tratamentos não-inoculados foi observado em todos os tratamentos aos 20 dias, com exceção do FC+PO (N) e FC+NE (N). Após os 40 dias a maioria dos tratamentos apresentou um aumento da atividade que se manteve constante até os 60 dias de avaliação (Figura 1 A).

Os tratamentos inoculados com nematoide, demonstraram um aumento da atividade da SOD em todos os tratamentos, exceto o FC+Az após 20 dias, porém observou-se um aumento na expressão da atividade enzimática aos 60 dias, que variou com os tratamentos de fertilização (Figura 1 B).

A infecção por nematoides aumentou significativamente essa atividade enzimática, onde as maiores taxas crescentes de atividade antioxidante foram observadas nos tratamentos Bio 150%, FC+Az e FC+PO aos 60 dias com valores de

124,0, 120,97 e 119,69 U SOD mg⁻¹ Proteína, nesta ordem (Figura 1 B). Após 60 dias a menor taxa da enzima SOD em tratamentos inoculados com *M. incognita* foi observada no tratamento composto por fertilizante solúvel e nematicida biológico comercial (FC+NE); enquanto que a taxa mais elevada na mesma condição, foi alcançada pelo fertilizante biológico na maior dose (Bio 150%).

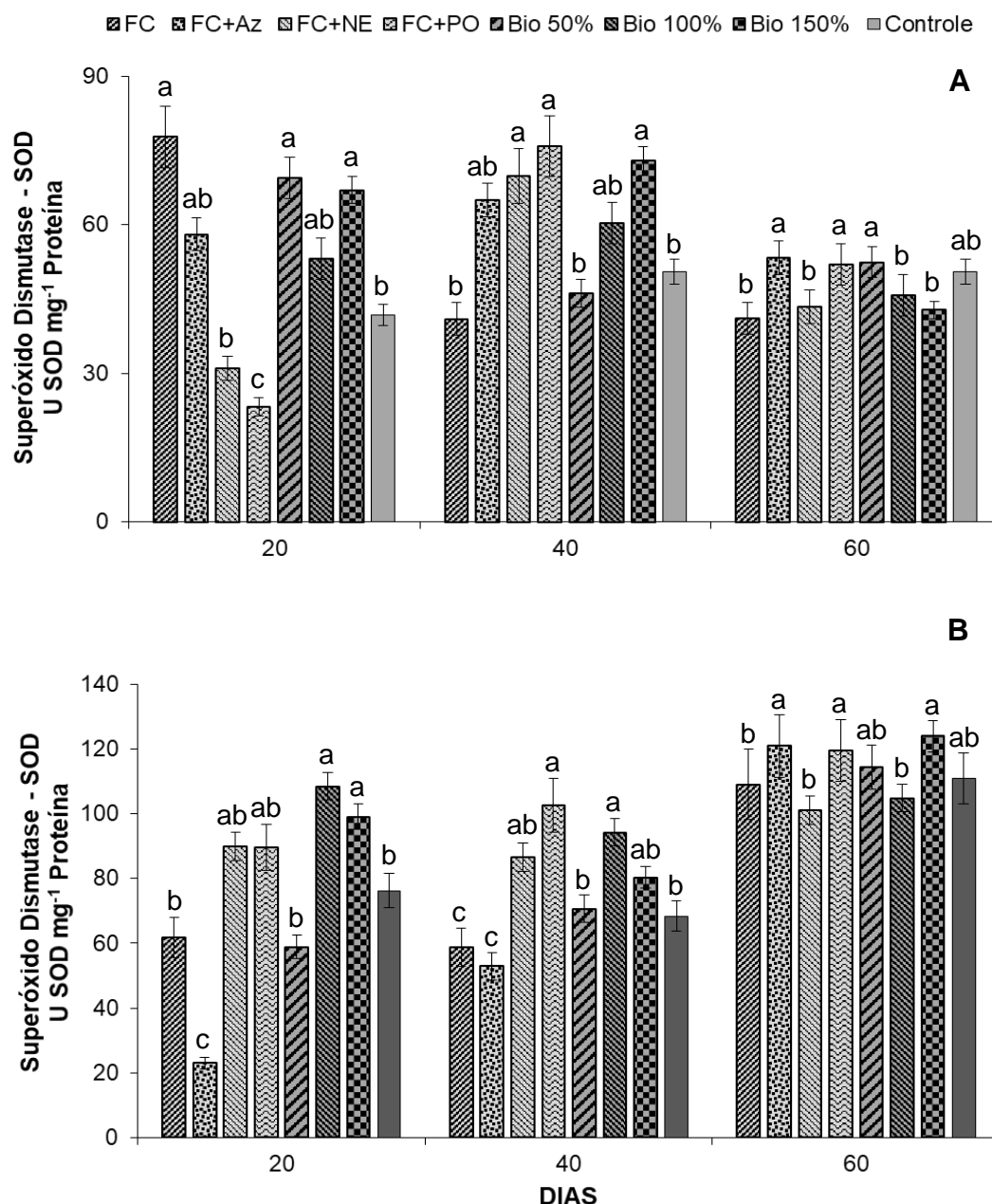


Figura 1. Atividade específica de superóxido dismutase (SOD) em folha de cana-de-açúcar variedade RB92579, em diferentes tempos de avaliação, associado a *Meloidogyne incognita* não-inoculado (A) e inoculado (B) e, sob diferentes tratamentos de fertilização: FC: fertilizante solúvel convencional (FC 100% Dose Recomendada - DR); FC+Az: FC 100% (DR) + Azadiractina (AZAMAX®); FC + NE: FC 100% (DR) + *Bacillus* spp. (NEMIX®); FC + PO: FC 100% (DR) + Benfuracarbe (POTTENTE®); Bio 50%: Fertilizante biológico 50% DR (equivalente a 2,5 t ha⁻¹); Bio 100%: Fertilizante biológico 100% DR (equivalente a 5 t ha⁻¹); Bio 150%: Fertilizante biológico 150% DR (equivalente a 7,5 t ha⁻¹); Controle (20 t ha⁻¹ de torta de filtro)

No presente estudo, não ocorreram interações significativas entre tempo, tratamento de fertilização e nematoide para as variáveis bioquímicas ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT), no entanto, interações significativas foram detectadas entre tempo e nematoide (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios das enzimas ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) em folha de cana-de-açúcar variedade RB92579, sob efeito da interação entre *Meloidogyne incognita* e tempo, independentemente do tratamento de fertilização

Nematoide	Ascorbato Peroxidase (APX) ($\mu\text{mol AsA mg}^{-1}\text{protein min}^{-1}$)			Catalase (CAT) ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{mg}^{-1}\text{protein min}^{-1}$)		
	Tempo (Dias)					
	20	40	60	20	40	60
Inoculado	24,62 aB	24,33 aB	129,39 aA	70,57 aA	55,27 aB	60,31 aAB
Não-inoculado	17,37 bB	16,38 bB	78,26 bA	57,64 aA	43,42 bAB	43,94 bAB
C.V. (%)	55,92	43,07	35,21	49,57	37,19	48,24

Letras maiúsculas iguais na linha (Tempo) e minúsculas na coluna (Nematoide) não diferem significativamente pelo teste t ($p < 0,05$)

A presença de *M. incognita* aumentou ao longo do tempo significativamente ($p < 0,05$) a atividade da enzima ascorbato peroxidase de 24,62 para 129,39 $\mu\text{mol AsA mg}^{-1}\text{protein min}^{-1}$, já a atividade da catalase permaneceu constante, havendo uma ligeira queda aos 40 dias e retornando ao patamar inicial aos 60 dias. No entanto, quando comparados tratamentos inoculados e não-inoculados tanto a APX, quanto a CAT se comportam de forma semelhante, com valores mais elevados ($p < 0,05$) nos tratamentos inoculados em todos os tempos de avaliação (Tabela 3). A CAT também apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) aos tratamentos de fertilização, sendo os maiores valores observados nos tratamentos com fertilizante biológico Bio 150% e Bio 100% (57,8 e 56,3 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{mg}^{-1}\text{protein min}^{-1}$) respectivamente (Figura 2).

Em relação ao teor de proteína, houve interação significativa ($p < 0,05$) entre tratamento de fertilização e nematoide, dentro de cada tempo de avaliação (20, 40 e 60 dias) de forma que aos 20 e 40 dias as plantas não-inoculadas demonstraram os maiores valores de proteína em comparação com as plantas inoculadas diferindo

significativamente nos tratamentos FC e Bio 150% aos 20 dias (Tabela 4). As plantas de cana-de-açúcar mantiveram os níveis de proteína constante aos 60 dias, nos tratamentos não-inoculados e inoculados com *M. incognita*. Contudo, nos tratamentos não-inoculados e inoculados com nematoide, os níveis de proteína aumentaram ao longo do tempo de avaliação em todos os tratamentos de fertilização (Tabela 4).

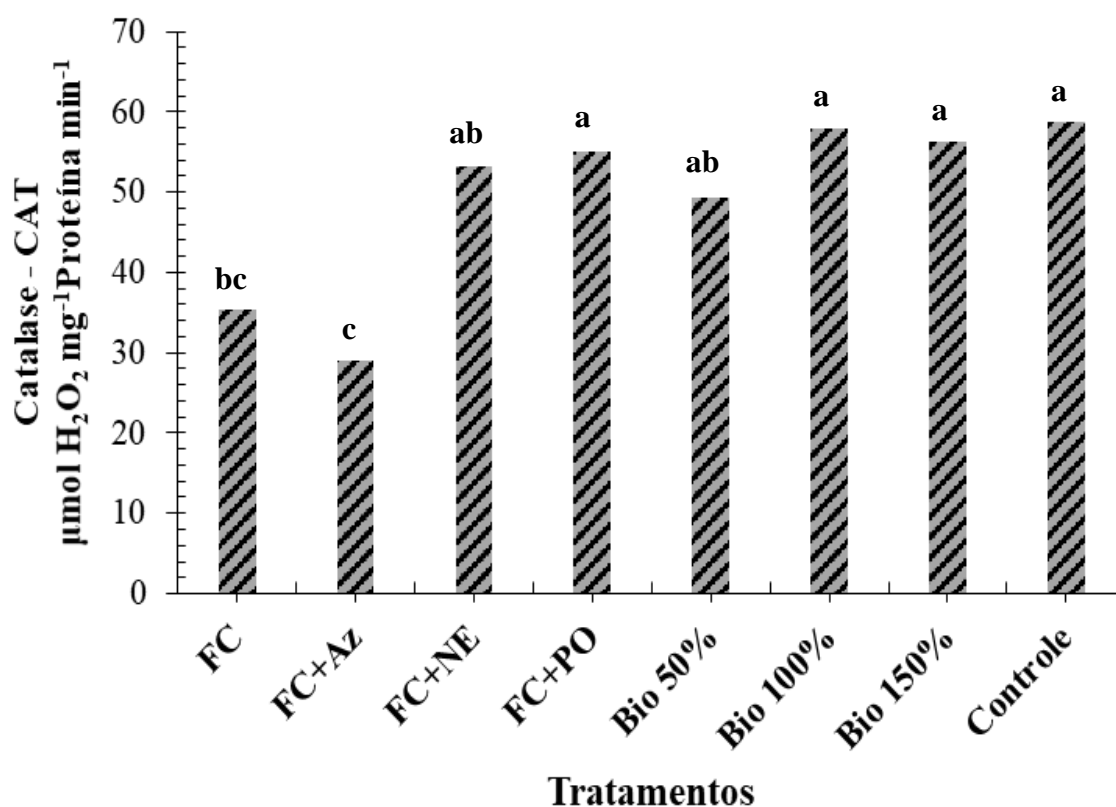


Figura 2. Efeito dos tratamentos de fertilização nos valores médios da enzima catalase (CAT) em folha de cana-de-açúcar variedade RB92579 em casa de vegetação, sob diferentes tratamentos de fertilização: FC: fertilizante solúvel convencional (FC 100% Dose Recomendada - DR); FC+Az: FC 100% (DR) + Azadiractina (AZAMAX®); FC + NE: FC 100% (DR) + *Bacillus* spp. (NEMIX®); FC + PO: FC 100% (DR) + Benfuracarbe (POTTENTE®); Bio 50%: Fertilizante biológico 50% DR (equivalente a 2,5 t ha⁻¹); Bio 100%: Fertilizante biológico 100% DR (equivalente a 5 t ha⁻¹); Bio 150%: Fertilizante biológico 150% DR (equivalente a 7,5 t ha⁻¹); Controle (20 t ha⁻¹ de torta de filtro)

Tabela 4. Valores médios de proteína total em folha de cana-de-açúcar variedade RB92579, sob efeito da interação entre tratamentos de fertilização e *Meloidogyne incognita* em casa de vegetação

Tratamentos ¹	Tempo (Dias)					
	20		40		60	
	Inoculado	Não-inoculado	Inoculado	Não-inoculado	Inoculado	Não-inoculado
FC	1,73 abB	2,95 aA	3,22 aB	5,52 aA	4,37 aA	4,90 aA
FC+Az	2,53 abA	2,95 aA	2,90 aA	3,80 bA	4,29 aA	4,22 aA
FC+NE	1,78 abA	1,87 bA	2,87 aA	3,23 bA	4,21 aA	4,50 aA
FC+PO	2,12 abA	2,23 abA	3,32 aA	2,53 bA	4,68 aA	4,40 aA
Bio 50%	1,54 bA	2,04 bA	2,91 aA	2,76 bA	3,76 aA	4,53 aA
Bio 100%	1,69 bB	2,54 abA	3,00 aA	2,36 bA	4,23 aA	4,18 aA
Bio 150%	2,56 aA	1,70 bB	3,02 aA	4,23 abA	4,12 aA	4,51 aA
Controle	1,83 abA	1,58 bA	2,78 aB	4,33 abA	4,07 aA	3,84 aA
C.V. (%)	28,57		31,50		20,22	

¹ Tratamentos: FC: fertilizante solúvel convencional (FC 100% Dose Recomendada - DR); FC+Az: FC 100% (DR) + Azadiractina (AZAMAX®); FC + NE: FC 100% (DR) + *Bacillus* spp. (NEMIX®); FC + PO: FC 100% (DR) + Benfuracarbe (POTTENTE®); Bio 50%: Fertilizante biológico 50% DR (equivalente a 2,5 t ha⁻¹); Bio 100%: Fertilizante biológico 100% DR (equivalente a 5 t ha⁻¹); Bio 150%: Fertilizante biológico 150% DR (equivalente a 7,5 t ha⁻¹); Controle (20 t ha⁻¹ de torta de filtro). Letras maiúsculas iguais na linha (Nematoide) e minúsculas na coluna (Fertilizantes) dentro de cada tempo, não diferem significativamente pelo teste t ($p < 0,05$)

4.4 Discussão

Os resultados do presente estudo demonstraram que os tratamentos com fertilizante biológico, proporcionou um maior peso fresco da raiz e suprimiu a infestação de *M. incognita* no sistema radicular em condições de casa de vegetação (Tabela 1). Os dados obtidos nas plantas inoculadas revelaram que os tratamentos com fertilizante biológico em todas as doses (Bio 50%, Bio 100% e Bio 150%), apresentou desempenho semelhante aos tratamentos com produtos comerciais (FC+NE e FC+PO) no controle do *M. incognita* na raiz. Outros tratamentos, FC+Az e Controle foram menos eficazes na redução da infestação de nematódeos na raiz.

Estes resultados complementam os de Castro, Flores e Uribe (2011) e Escudero et al. (2017) demonstrando que a adição de compostos orgânico e de quitosana no solo afetam a reprodução de nematoides e aumentam o crescimento e a produtividade das plantas. Serra, Silva e Ferreira (2008) estudando o efeito da quitosana no controle de *M. incognita* em cultivo orgânico de alface, observaram que

esse indutor foi eficiente na redução do fator de reprodução do patógeno. A adição de fertilizantes biológicos ao solo afeta a decomposição microbiana devido à liberação de vários compostos químicos que melhoram as propriedades químicas, biológicas e físicas além da qualidade do solo. Isso favorece a atividade rizosférica do solo e populações microbianas que, através de diferentes estratégias, como antibiose ou parasitismo, que podem prejudicar os agentes causadores de doenças das plantas, incluindo fungos, bactérias e nematoides (ASIF et al., 2017).

Diversos estudos relatam a eficácia do extrato de nim no controle de *Meloidogyne* spp. (OKA, 2010; MELO et al., 2012; YADAV; PATIL; KUMAR, 2018), que se atribui à presença de várias substâncias químicas como o azadiractina. Tais substâncias apresentam efeitos nematicidas, contudo, são apontadas também como elicitoras de resistência em plantas (SCHMUTTERER, 1995). A azadiractina, principal ingrediente ativo, tem sido estudada mais intensamente (NEVES; OLIVEIRA; NOGUEIRA, 2003). Chaves et al. (2012) avaliando alternativas para o manejo de fitonematoides em cana-de-açúcar, observaram que o extrato de nim foi eficiente quando usado em conjunto com aldicarbe e aldicarbe + torta de filtro, demonstrando que a combinação com nematicida foi mais efetiva na redução de populações de *Meloidogyne* spp. do que os tratamentos isoladamente.

Morgado et al. (2015), trabalharam no controle da população de *M. incognita* na cana-de-açúcar, submetida ao tratamento com antagonistas *Bacillus subtilis*, verificaram a redução da população parasitária em relação ao controle, mas não houve diminuição na população do parasita em o solo em quatro avaliações por 120 dias. O resultado confirma a eficácia da ação nematicida proporcionada pelo *B. subtilis*, descrito no controle do nematoide das galhas em tomateiro (ARAÚJO; MARCHESI, 2009). Estudos sugerem algumas indicações de mecanismos de controle fornecidos por *B. subtilis* sobre nematoides, que incluem a produção de metabólitos que reduzem a atração por exsudatos radiculares específicos do hospedeiro (ARAÚJO; SILVA; ARAÚJO, 2002); indução de resistência sistêmica mediada por bactérias no solo (ENEBAK; CAREY, 2000); produção de proteases que degradam a cutícula do nematoide e interferem no ciclo do parasita (LIAN et al., 2007), e que os nematoides e seus ovos podem servir como fonte de alimento para as bactérias (KHAN; KHAN; MOHIDE, 2005). Medeiros et al. (2009) e Pereira et al. (2016), ao estudarem rizobactérias do gênero *Bacillus*, para manejo de *M. incognita*, em meloeiro, relataram que a presença da bactéria afetou a reprodução do

nematoide, reduzindo o número de ovos por planta e a produção de galhas. Liu et al. (2012), verificaram que a associação com *Bacillus* spp. contribuiu para reduzir a reprodução de *M. incognita* representada pelo menor número de massas de ovos e de juvenis por grama de raiz em tomateiro.

Giraldeli et al. (2016) estudando a interação ocorrida entre herbicidas e nematicidas benfuracarbe e carbofuran no desenvolvimento inicial de três variedades de cana-de-açúcar, verificaram interação significativa para o herbicida sulfentrazone com os nematicidas benfuracarbe e carbofuran, causando sintomas mais leves de fitotoxicidade. Taira et al. (2017) avaliando a interação dos nematicidas com herbicida a durante o período de desenvolvimento inicial da cultura da cana-de-açúcar, relataram que o nematicida Benfuracarbe apresentou resultados superiores na redução da população de nematoides. Isto pode ser devido ao efeito direto do nematicida no nematoide e não ao efeito indireto através de alterações fisiológicas na planta hospedeira. No entanto, a presença de metabólitos tóxicos do nematicida em células vegetais pode ser a razão para o aumento do conteúdo de enzimas antioxidantes nas plantas (EL-BELTAGI et al., 2012).

A atividade nematicida da quitosana e seus derivados, não foi suficientemente estudada. Vários estudos sugeriram que a quitosana é eficaz no controle da população de nematoides patogênicos em plantas (HASSAN; CHANG, 2017; KALAIARASAN et al., 2006). A adição de quitosana no solo resulta em redução significativa na eclosão de ovos, na viabilidade de larvas e adultos das espécies de nematódeos patogênicos de plantas *Meloidogyne arenaria* (CHIRKOV, 2002), *Meloidogyne incognita* (KHALIL; BADAWY, 2012) e *Meloidogyne javanica* (EL-SAYED et al., 2015). A ação nematicida da quitosana depende a concentração e peso molecular de quitosana. Khalil e Badawy (2012), sugeriram que a quitosana com baixo peso molecular pode servir como um nematicida natural. Nunes da Silva et al. (2014), propuseram que a aplicação de todos os pesos moleculares de quitosana diminui a severidade da *Bursaphelenchus xylophilus* (nematoide do pinheiro). Berger et al. (2016) relataram que, o grupo amino na forma policatiônica em condições de pH baixo originam a atividade antimicrobiana da quitosana. Desse modo, esse biopolímero interage com as cargas negativas da membrana celular do fitonematoide e promove mudanças na permeabilidade da membrana plasmática, além da diminuição dos componentes intracelulares (YOUNES; RINAUDO, 2015).

Vale ressaltar, que no presente estudo ao aplicar os tratamentos com fertilizante biológico proporcionou condições ideais para esse processo.

A quitosana é uma substância biopesticida de ocorrência natural e ecologicamente correta que reduz as populações de nematódeos e nematoides das galhas nas várias culturas agrícolas e hortícolas. Asif et al, (2017) mostraram atividade nematostática e nematicida, avaliando o potencial da quitosana isolada e em combinação com vários resíduos agrícolas no manejo do nematoide *Meloidogyne incognita*. A quitosana apresenta algumas vantagens em relação a outros agentes de biocontrole, como seu potencial para controlar doenças de plantas, além de sua capacidade de induzir resistência nas plantas hospedeiras (YIN; ZHAO; DU, 2010) e aumentar a biodiversidade na rizosfera (PARK; CHANG, 2012).

As enzimas antioxidantes ascorbato peroxidase (APX) e a catalase (CAT), assim como (SOD), são responsáveis por eliminar o excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células vegetais. Nesse trabalho, em geral foram observados aumentos significativos na atividade da SOD, principalmente nos tratamentos Bio 150% (I), FC+Az (I) e FC+PO (I), um gerador de H₂O₂, que sugeriu a presença do radical superóxido (Figura 1). Esses picos de atividade enzimática, se justifica pela infecção ocasionada pelos fitonematoides, que desencadeiam uma série de sinais originando a Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) na planta, o que não ocorre em plantas não-inoculadas.

Paralelamente, ocorreu a manutenção ou aumento das atividades de APX e CAT. Os resultados obtidos nesse estudo, podem ser correlacionados com a redução do fator de reprodução obtido nos tratamentos com fertilizante biológico (Tabela 1), o que explica o fato de que as plantas de cana-de-açúcar ao serem expostas ao agente indutor quitosana presente no fertilizante biológico, expressando o mecanismo de resistência sistêmica induzida (RSI), apresentando sistema de defesa contra o fitonematoide (ARYAL et al., 2011) através do aumento da atividade enzimática. Os dados obtidos, enfatizaram o papel dos fertilizantes biológicos na melhoria do desenvolvimento das plantas e indução de resistência contra o nematoide das galhas que resultou na proteção das plantas contra a infecção por nematoides, obtendo resultados similares aos do fertilizante solúvel em conjunto com nematicidas comerciais.

Avaliando a ativação da resistência de *Meloidogyne incognita* em cana-de-açúcar tratada com piraclostrobina, Chaves et al. (2016) relataram respostas semelhantes, onde aos 20 dias mostraram as maiores atividades nas plantas tratadas com uma combinação de piraclostrobina e carbofurano resultaram em aumentos nas atividades de APX e CAT, indicando uma resposta positiva ao estresse causado por nematoides parasitas de plantas.

É importante observar que a atividade de SOD está associada às atividades de APX e/ou CAT. A catalase e a ascorbato peroxidase desempenham um papel essencial na eliminação da toxicidade do H_2O_2 , produto da dismutação de SOD que é desintoxicado por APX e CAT (MORAIS et al., 2018). A ação combinada de CAT e SOD converte o radical superóxido tóxico (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular (O_2), evitando assim o dano celular sob infecção por nematoides (BARBOSA et al., 2014; SHARMA et al., 2012). O aumento ou a manutenção das atividades de APX e CAT indicam a importância dessas enzimas na desintoxicação de H_2O_2 e na proteção contra danos oxidativos (CIA et al., 2012).

O estudo de alternativas de controle biológico que proporcionam mais de um benefício para o desenvolvimento das plantas é importante (LI et al., 2015). Nesse sentido, a atividade dupla registrada para o fertilizante biológico testado em nosso estudo representa uma estratégia ecologicamente segura para melhorar o suprimento nutricional e o controle de nematoides parasitas de plantas, e poderiam ser integrados a práticas agrícolas sustentáveis.

4.5 Conclusão

Os estudos mostraram que o controle eficiente dos fitonematoides em cana-de-açúcar pode ser feito usando o fertilizante biológico, além de fornece evidências da indução de defesas naturais de plantas. A adição do fertilizante biológico em todas as proporções promoveu decréscimo no fator de reprodução do *Meloidogyne incognita*, reduzindo a população de nematoides no solo.

O fertilizante biológico aumentou a atividade das enzimas antioxidantes SOD, APX e CAT, resposta característica da ativação dos mecanismos de resistência, observada aos 20 e 60 dias após a inoculação com *M. incognita* em plantas de cana-de-açúcar. A atividade sincronizada de SOD, CAT e APX sugere proteção metabólica e pode indicar tolerância ao patógeno. Este método pode mitigar a

toxicidade e a natureza perigosa dos nematicidas químicos no ambiente. Contudo, outros estudos são necessários para afirmar os resultados em condições de campo, bem como caracterizar e identificar o envolvimento de substâncias químicas e populações microbianas benéficas. As interações entre os vários componentes e mecanismos sinérgicos envolvidos devem ser adequadamente compreendidas.

Referências

- ABOUD, H. M.; FATTAH, F. A.; AL-HEETI, A. A.; SALEH, H. M. Efficiency of chitosan in inducing systemic acquired resistance against the root-knot nematode (*Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood) on tomato. **Arab Journal of Plant Protection**, Beirut, v. 20, p. 93-98, 2002.
- ARAÚJO, F. F.; MARCHESI, G. P. M. Aplicação de *Bacillus subtilis* no controle da meloidoginose em tomateiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1558-1561, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782009000500039>>.
- ARAÚJO F. F.; SILVA, J. F. V.; ARAÚJO, A. S. F. Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 2, p. 197-202, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782002000200003>>.
- ARYAL, S. K.; DAVIS, R. F.; STEVENSON, K. L.; TIMPER, P.; PINGSHENG, J. *Meloidogyne incognita* enzymes involved in systemic acquired resistance. **Journal of Nematology**, New Mexico, v. 43, p. 152-159, 2011.
- ASIF, M.; AHMAD, F.; TARIQ, M.; KHAN, A.; ANSARI, T.; KHAN, F.; SIDDIQUI, A. M. Potential of chitosan alone and in combination with agricultural wastes against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* infesting eggplant. **Journal of Plant Protection Research**, Poznań, v. 15, n. 3, p. 288-295, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1515/jppr-2017-0041>>.
- BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de Oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, p. 453-460, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782014000300011>>.
- BARKER, K. R.; KOENNING, S. R. Developing sustainable systems for nematode management. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 165-205, 1998. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.165>>.
- BARROS, A. C. B.; MOURA, R. M.; PEDROSA, E. M. R. Estudo de interação variedade-nematicida em cana-de-açúcar em solo naturalmente infestado por *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *Pratylenchus zae*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 29, n. 1, p. 39-46, 2005.

BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, n. 3, p. 553, 1981.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p.248-254, 1976.

BELTÃO, E. A.; MASCARENHAS, J. C.; MIRANDA, J. L. F.; SOUZA JUNIOR, L. C.; GALVÃO, M. J. T. G.; PEREIRA, S. N. Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea – **Estado de Pernambuco: Diagnóstico do município de Carpina**. [s.1.] CPRM – Serviço Geológico do Brasil. Recife. 2005, p. 11.

BERGER, L. R. R.; STAMFORD, N. P.; WILADINO, 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 crustacean chitosan and by biomass and chitosan obtained from *Cunninghamella elegans*. **Biological Control**, Amsterdam, v. 92, p. 45-54, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.09.006>>.

BERGER, L. R. R.; STAMFORD, N. P.; 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**, Temuco, v.13, n. 3, p. 592-603, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162013005000047>>.

BHATT, I.; TRIPATHI, B. N. Plant peroxiredoxins: catalytic mechanisms, functional significance and future perspectives. **Biotechnology Advances**, Rehovot, v. 29, p. 850-859, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.002>>.

CARDENAS-TRIVINO, G.; RODRIGUEZ-KABANA, R. Chitin and chitosan derivatives as potential nematocides. In: **Workshop on Chemical Interactions between Organisms**, Santiago, 12–17, 1989.

CASTRO, L.; FLORES, L.; URIBE, L. Efecto del vermicompost y quitina sobre el control de *Meloidogyne incognita* en tomate a nivel de invernadero. **Agronomía Costarricense**, San Pedro de Montes de Oca, v. 35, n. 2, p. 21-32, 2011.

CHAVES, A.; PEDROSA, E. M. R.; GUIMARÃES, L. M. P.; MARANHÃO, S. R. V. L.; CARDOSO, M. S. O.; Management of plant parasitic nematodes on Sugarcane under tropical conditions. In: PRIYANKA, S.; TIWARI, A. K. (Org.). Sustainable Sugarcane Production. 1. ed. Oakville: Apple Academic Press, 2018. p. 271-286.

CHAVES, A.; PEDROSA, E. M. R.; WILADINO, L. G.; CARDOSO, M. S. O. Activation of resistance to *Meloidogyne incognita* in sugarcane treated with pyraclostrobin. **Nematoda**, Piracicaba, v.3, n.1, p. 1-7. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4322/nematoda.00516>>.

CHAVES, A.; PEDROSA, E. M. R.; COELHO, R. S. B.; GUIMARÃES, L. M. P.; MARANHÃO, S. R. V. L.; GAMA, M. A. S. Alternativas para o manejo integrado de fitonematoides em cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.7, n.1, p.73-80, 2012.

CHAVES, A.; MARANHÃO, R. V. L.; PEDROSA, E. M. R.; GUIMARÃES, L. M. P.; OLIVEIRA, M. K. R. Incidência de *Meloidogyne spp.* e *Pratylenchus sp.* em cana-de-açúcar no Estado de Pernambuco, Brasil. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.33, n. 4, p. 278-280, 2009.

CHAVES, A.; PEDROSA, E. M. R.; MELO, L. J. O. Efeito de carbofuran, torta de filtro e variedades sobre a densidade populacional de fitonematoides em áreas com mau desenvolvimento da cana-de-açúcar. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 28, p. 101-103, 2004.

CHEN, L., JIANG, H., CHENG, Q., CHEN, J., WU, G., KUMAR, A., SUN, M., LIU, Z. Enhanced nematicidal potential of the chitinase pachi from *Pseudomonas aeruginosa* in association with Cry21Aa. **Scientific Reports**, Bethesda, v. 5, 1-11; 2015. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/srep14395>>.

CHIRKOV, S. N. The antiviral activity of chitosan (review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, Moscow, v. 38, n. 1, p. 1-8, 2002. Disponível em: < <https://doi.org/10.1023/A:1013206517442>>.

CHITTENDEN, C.; SINGH, T. In vitro evaluation of combination of *Trichoderma harzianum* and chitosan for the control of sapstain fungi. **Biological Control**, Amsterdam, v. 50, n. 3, p. 262-266, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.04.015>>.

CIA, M. C.; GUIMARÃES, A. C. R.; MEDICI, L. O.; CHABREGAS, S. M.; AZEVEDO, R. A. Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and-sensitive sugarcane varieties. **Annals of Applied Biology**, Newport, v.161, n. 3, p.313-324, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2012.00575.x>>.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, safra 2017/2018**, quarto levantamento, abril/2018. Brasília, CONAB, 2018. v. 4, n. 4, 73 p. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 10 ago. 2018.

CURTO, G.; LAZZERI, L.; DALLAVALLE, E.; SANTI, R.; MALAGUTI, L. Effectiveness of crop rotation with Brassicaceae species for the management of the southern root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. In: **Abstracts of the second international biofumigation symposium**. Moscow, Idaho. 2006, p. 51.

DIAS, K. B.; SILVA, D. P.; FERREIRA, L. A.; FIDELIS, R. R.; COSTA, J. L.; SILVA, A. L. L.; SCHEIDT, G. N. Chitin and chitosan: Characteristics, uses and production current perspectives. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 4, p. 184-191, 2013.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; PIVETTA, J. P.; FRACASSO, J. V. Influência da época de aplicação de nematicidas em soqueiras sobre as populações de nematoides e a produtividade da cana-de-açúcar. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 1, p.179-190, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052008000100022>>.

DINARDO-MIRANDA, L. L. **Nematoides e pragas de solo em cana-de-açúcar**. Centro de Cana do Instituto Agrônomo, Ribeirão Preto, v. 110, 2005, p. 25-32.

EL-BELTAGI, H. S.; FARAHAT, A. A.; ALSAYED, A. A.; MAHFOUD, N. A. Response of antioxidant substances and enzymes activities as a defense mechanism against root-knot nematode infection. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici**, Cluj-Napoca, v. 40, n. 1, p. 132-142, 2012.

EL-SAYED, S. M.; MAHDY, M. E. Effect of chitosan on root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* on tomato plants. **International Journal of ChemTech Research**, Mumbai, v. 7, p. 1985-1992, 2015.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de Análises Químicas de Solo, Plantas e Fertilizantes**. 2ª ed., Brasília: Embrapa - Informações Tecnológicas, 2009. p. 627.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed., Rio de Janeiro: Embrapa, 1997. p. 212.

ENEBAK, S. A; CAREY, W. A Evidence for induced systemic protection to fusiform rust in loblolly pine by plant growth-promoting rhizobacteria. **Plant Disease**, Moscow, v. 84, n. 3, p. 306-308, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.3.306>>.

ESCUADERO, N.; LOPEZ-MOYA, F.; GHAREMANI, Z.; ZAVALA-GONZALEZ, E. A.; ALAGUERO-CORDOVILLA, A.; ROS-IBÁÑEZ, C.; LACASA, A.; SORRIBAS, F. J.; LOPEZ-LLORCA, L. V. Chitosan Increases Tomato Root Colonization by *Pochonia chlamydosporia* and Their Combination Reduces Root-Knot Nematode Damage. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v.8, p 1-10, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2017.01415>>.

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**, São Paulo, v. 54, p. 70-78, 2011.

FRANCO, L. O.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, N. P.; TAKAKI, G. M. C. *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. **Analytica**, São Paulo, v. 4, p. 40-44, 2005.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

GIRALDELI, A. L.; MONQUERO, P. A.; MALARDO, M. R.; RAMOS, S. K.; TORRES, B. A.; GOMES, R. R.; SILVA, P. V. Herbicide and nematicide interaction in sugarcane crops. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Londrina, v.15, n.4, p.341-352, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.7824/rbh.v15i4.462>>.

HAMID, R.; KHAN, M. A.; AHMAD, M.; AHMAD, M. M.; ABDIN, M. Z.; MUSARRAT, J.; JAVED, S. Chitinases: an update. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, New Delhi, v. 5, n.1, p. 21-29, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4103/0975-7406.106559>>.

HASSAN, O.; CHANG, T. Chitosan for eco-friendly control of plant disease. **Asian Journal of Plant Pathology**, Dubai, v. 11, p. 53-70, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3923/ajppaj.2017.53.70>>.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v.84, p.450-455, 1987.

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v.57, p. 1025-1028, 1973.

IPA - Instituto Pernambucano de Pesquisa Agropecuária. **Recomendações de adubação para o Estado de Pernambuco: 2ª aproximação**. 3 ed. revisado/coordenado por Francisco José de Albuquerque Cavalcanti. Recife: Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA. 2008. p. 212.

JAGDALE, G. B.; KAMOUN, S.; GREWAL, P. S. Entomopathogenic nematodes induce components of systemic resistance in plants: biochemical and molecular evidence. **Biological Control**, Amsterdam, v. 51, n. 1, p. 102-109, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.06.009>>.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal – flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Report**, St. Paul, v. 48, p. 692, 1964.

KALAIARASAN, P.; LAKSHMANAN, P.; RAJENDRAN, G.; SAMIYAPPAN, R. Chitin and chitinolytic biocontrol agents for the management of root knot nematode, *Meloidogyne arenaria* in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) cv. Co3. **Indian Journal of Nematology**, New Delhi, v. 36, n. 2, p. 181-186, 2006.

KHALIL, M. S.; BADAWY, M. E. I. Nematicidal activity of a biopolymer chitosan at different molecular weights against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Plant Protection Science**, Olomouc, 48: 170-178, 2012.

KHAN, M. R.; KHAN, S. M.; MOHIDE, F. Root-knot nematode problem of some winter ornamental plants and its biomanagement. **Journal of Nematology**, Orlando, v. 37, p. 198-206, 2005.

KESBA, H. H.; EL-BELTAGI, H. E. S. Biochemical changes in grape rootstocks resulted from humic acid treatments in relation to nematode infection. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Haikou, v. 2, n. 4, p. 287-293, 2012. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60024-0](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60024-0)>.

KIM, Y. H.; KWAK, S. S. The role of antioxidant enzymes during leaf development. In: Gupta SD (ed.). **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield, Science Publishers, 2010, p. 129-150.

KONE, D.; CSINOS, A. S.; JACKSON, K. L.; JI, P. Evaluation of systemic acquired resistance inducers for control of *Phytophthora capsici* on squash. **Crop Protection**, Lincoln, v. 28 n. 6, p. 533-538, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.02.005>>.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, Meguro-Ku, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1381-5148\(00\)00038-9](https://doi.org/10.1016/S1381-5148(00)00038-9)>.

LIAN, L. H.; TIAN, B. Y.; XIONG, R.; ZHU, M. Z.; XU, J.; ZHANG, K. Q. Proteases from *Bacillus*: a new insight into the mechanism of action for rhizobacterial suppression of nematode populations. **Letters in Applied Microbiology**, London, v. 45, n. 3, p. 262-269, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02184.x>>.

LI, J.; ZOU, C.; XU, J.; JI, X.; NIU, X.; YANG, J.; HUANG, X.; ZHANG, K. Q. Molecular mechanisms of nematode-nematophagous microber interactions: basis for biological control of plant parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 53, p. 67-95, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120336>>.

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 Journal of Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 27, p. 1769-1775, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-010-0357-z>>.

LIU, R., DAI, M., WU, X., LI, M.; LIU, X. Suppression of the root-knot nematode [*Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood] on tomato by dual inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and plant growthpromoting rhizobacteria. **Mycorrhiza**, Diepenbeek, v. 22, p. 289-296, 2012.

LÓPEZ-MONDÉJAR, R.; BLAYA, J.; OBIOL, M.; ROS, M.; PASCUAL, J. A. Evaluation of the effect of chitin-rich residues on the chitinolytic activity of *Trichoderma harzianum*: in vitro and greenhouse nursery experiments. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Amherst, v. 103, n. 1, p. 1-8, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.02.001>>.

MEDEIROS, J. E., SILVEIRA, E. B., MARIANO, R. L. R.; PEDROSA, E. M. R. Inconsistency of the biological control of *Meloidogyne incognita* race 2 in melon by endophytic and rhizosphere bacteria. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 319-324, 2009.

MELO, T. A.; SERRA, I. M. R. S.; SILVA, G. S.; SOUSA, R. M. S. Produtos naturais aplicados para manejo de *Meloidogyne incognita* em tomateiros. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.38, n.3, p.223-227, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052012000300007>>.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Maryland Heights, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)>.

MORAIS, M. B.; CAMARA, T. R.; ULISSES, C.; CARVALHO FILHO, J. L. S.; WILLADINO, L. Multiple stresses on the oxidative metabolism of sugarcane varieties. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 48, n. 04, p. 1-8, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20141487>>.

MORGADO, T. D. T.; GUERRA, J. T.; ARAUJO, F. F.; MAZZUCHELLI, R. C. L. Effectiveness and persistence of biological control of nematodes in sugarcane. *African Journal of Agricultural Research*, Nairobi, v. 10, n. 49, p. 4490-4495, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5897/AJAR2015.10344>>.

MOURA, R. M.; PEDROSA, E. M. R.; MARANHÃO, S. R. V. L.; MACEDO, M. E. A.; MOURA, A. M.; SILVA, E. G.; LIMA, R. F. Ocorrência dos nematoides *Pratylenchus zae* e *Meloidogyne* spp. em cana-de-açúcar no Nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 101-103, 2000.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast. **Plant and Cell Physiology**, Nagoya, v.22, n. 5, p.867-880, 1981. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>>.

NASU, E. G. C.; PIRES, E.; FERMENTINI, H. N.; FURLANETTO, C. Efeito de manipueira sobre *Meloidogyne incognita* em ensaios in vitro e em tomateiros em casa de vegetação. **Tropical Plants Pathology**, Brasília, v.35, n. 1, p.32-36, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762010000100005>>.

NEVES, B. P.; OLIVEIRA, I. P.; NOGUEIRA, J. C. M. **Cultivo e Utilização do Nim Indiano (Circular técnica, 62)**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Goiânia (GO), 2003. 12 p.

NIKOO, F.S., SAHEBANI, N., AMINIAN, H., MOKHTARNEJAD, L., GHADERI, R. Induction of systemic resistance and defense-related enzymes in tomato plants using *Pseudomonas fluorescens* CHAO and salicylic acid against root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. **Journal of Plant Protection Research**, Poznań, v. 54, n. 4, p. 383-389, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.2478/jppr-2014-0057>>.

NOLING, J. W.; BECKER, J. O. The challenge of research and extension to define and implement alternatives to methyl bromide. **Journal of Nematology**, New Mexico, v. 26, n. 4, p. 573-586, 1994.

NUNES DA SILVA, M.; CARDOSO, A. R.; FERREIRA, D.; BRITO, M.; PINTADO, M. E.; VASCONCELOS, M. W. Chitosan as a biocontrol agent against the pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Forest Pathology**, Aberdeen, v. 44, p. 420-423, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/efp.12136>>.

OKA, Y. Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendment – A Review. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 44, p. 101-115, 2010.

OLIVEIRA, J. T. A.; GONDIM, D. M. F.; VASCONCELOS, I. M. Ensaio enzimáticos de proteínas e inibidores de proteases envolvidos com a defesa de plantas a patógenos. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; OLIVEIRA, J. P. O.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P. **Biociencia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais**. Brasília: Embrapa Agrobiologia. Parte 2, Cap. 1, 2010, p. 61-92.

PARK, K. C.; CHANG, T. H. Effect of chitosan on microbial community in soils planted with cucumber under protected cultivation. **Korean Journal of Horticultural Science and Technology**, Wanju-gun, v. 30, n. 3, p. 261-269, 2012.

PEREIRA, C. C. M. S.; PEDROSA, E. M. R.; ROLIM, M. M.; SILVA, E. F. F.; PEREIRA FILHO, J. V. Componentes bioquímicos e crescimento de meloeiro sob estresse hídrico associado à *Meloidogyne Incognita* e *Bacillus* spp. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, Fortaleza, v. 10, n. 4, p. 739-749, 2016.

PLOEG, A. Biofumigation To Manage Plant-Parasitic Nematodes. In: CIANCIO, A.; MUKERJI, K. G. (eds) Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes. **Integrated Management of Plant Pests and Diseases**. vol 2. Springer, Dordrecht. Capítulo 12, 2008, p. 239–248. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6063-2_12>.

RADWAN, M. A.; FARRAG, S. A. A.; ABU-ELAMAYEM, M. M.; AHMED, N. S. Extraction, characterization, and nematicidal activity of chitin and chitosan derived from shrimp shell wastes. **Biology and Fertility of Soils**, Florence, v. 48, n. 4, p. 463-468, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00374-011-0632-7>>.

SAED-MOUCHESHI, A.; PAKNIYAT, H.; PIRASTEH-ANOSHEH, H.; AZOOZ, M. M. Role of ROS as signaling molecules in plants. p. 585–626. In: **Reactive Oxygen Species, Antioxidant Network and Signaling in Plants** (AHMAD, P. ed.). Springer Publication, New York, 2014, p. 635.

SAS INSTITUTE. The SAS 9.2 software. System for Windows. CD – ROM for Windows. 2011.

SCHMUTTERER, H. **The Neem Tree, source of unique products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes**. Cambridge: VCH, 1995. 696p.

SERRA, I. M. R. S.; SILVA, G. S.; FERREIRA, I. C. M. Efeito de indutores naturais de resistência sobre *Meloidogyne incognita* em alface cultivada em sistema orgânico. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, p.S112, 2008. Suplemento.

SEVERINO, J. J.; DIAS-ARIEIRA, C. R.; TESSMANN, D. J. Nematodes associated with sugarcane (*Saccharum* spp.) in sandy soils in Parana, Brazil. **Nematropica**, Florida, v. 40, p. 111-119, 2010.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, Cairo, v. 2012, p. 1-26, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2012/217037>>.

SILVERMAN, M. P.; LUNDGREN, D. G. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Bacteriology**, Princeton, v. 77, p. 642-647, 1959.

STAMFORD, N. P.; SILVA JUNIOR, 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 biofertilizers with diazotrophic bacteria and fungi chitosan. **Australian Journal of Crop Science**, Brisbane, v. 8, n. 2, p. 301-306, 2014.

STAMFORD, N. P.; LIMA, R. A.; LIRA JUNIOR, M. A.; SANTOS, C. E. R. S. Effectiveness of phosphate and potash rocks with *Acidithiobacillus* on sugarcane yield and their effects in soil chemical attributes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 24, n. 10, p. 2061-2066, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-008-9710-x>>.

TAIRA, F. A.; CARRASCHI, J. V.; QUINAIA, A. C.; IZIDORO JUNIOR, A.; SILVA, E. J. da; SCHWENGBER, R. P.; LOPES, A. D.; VALLE, J. S. do; GOMES, S. de M. S. Interação entre nematicidas e herbicidas pré-emergentes no desenvolvimento inicial da cultura da cana-de-açúcar. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 20, n. 2, p. 57-63, 2017.

TALAVERA, M.; SAYADI, S.; CHIROSA-RÍOS, M.; SALMERÓN, T.; FLOR-PEREGRÍN, E.; VERDEJO-LUCAS, S. Perception of the impact of root-knot nematode-induced diseases in horticultural protected crops of south-eastern Spain. **Nematology**, Leiden, v. 14, p. 517-527, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1163/156854112X635850>>.

VASYUKOVA, N. I.; ZINOV'EVA, S. V.; IL'INSKAYA, L. I.; PEREKHOD, E. A.; CHALENKO, G. I.; GERASIMOVA, N. G.; IL'INA, A. V.; VARLAMO, V. P.; OZERETSKOVSKAYA, O. L. Modulation of plant resistance to diseases by watersoluble chitosan. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Moscow, 37: 103-109, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1023/A:1002865029994>>.

VIANNA, M. S.; SENTELHAS, P. C. Simulação do risco de déficit hídrico em regiões de expansão do cultivo de cana-de-açúcar no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 49, n. 4, p. 237-246, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2014000400001>>.

WIRATNO, D. T.; BERG, H. V. D.; RIKSEN, J. A. G.; RIETJENS, I. M. C. M.; DJIWANTI, S. R.; KAMMENGA, J. E.; MURK, A. J. Nematicidal activity of plant extracts against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **The Open Natural Products Journal**, Sharjah, v. 2, p. 77-85, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.2174/1874848100902010077>>.

YADAV, S.; PATIL, J.; KUMAR, A. Bio-nematicidal effect of *Azadirachta indica*, against *Meloidogyne incognita* in tomato. **International Journal of Chemical Studies**, New Delhi, v. 6, n. 3, p. 2757-2761, 2018.

YANG, J.; LIANG, L.; LI, J.; ZHANG, K. Nematicidal enzymes from microorganisms and their applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Münster, v. 97, p. 7081-7095, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-013-5045-0>>.

YIN, H.; ZHAO, X.; DU, Y. Oligochitosan: A plant diseases vaccine-a review. **Carbohydrate Polymers**, Tenbury Wells, v. 82, n. 1, p. 1-8, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.03.066>>.

YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. **Marine Drugs**, Basel, v. 13, p. 1133-1174, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/md13031133>>.

CAPÍTULO 3

5 FERTILIZANTE BIOLÓGICO NA NUTRIÇÃO, PRODUTIVIDADE E QUALIDADES TECNOLÓGICAS DA CANA-DE-AÇÚCAR E EM ATRIBUTOS QUÍMICOS DO SOLO EM CULTIVOS CONSECUTIVOS

Fertilizante biológico na nutrição, produtividade e qualidades tecnológicas da cana-de-açúcar e em atributos químicos do solo em cultivos consecutivos

Resumo

O uso de processos microbiológicos para a produção de biofertilizantes de rochas fosfatadas e potássicas inoculadas com *Acidithiobacillus*, em mistura com matéria orgânica inoculada com *Beijerinckia indica* e com *Cunninghamella elegans*, tem mostrado bons resultados como alternativa viável, aumentando a disponibilidade de nutrientes, sendo um processo prático e econômico. O objetivo da pesquisa foi avaliar a eficácia do fertilizante biológico, produzido a partir do biofertilizante de rochas mais matéria orgânica inoculada com o fungo *C. elegans*, em atributos químicos do solo, absorção de nutrientes, no rendimento e em características tecnológicas em diferentes variedades de cana-de-açúcar cultivada em dois ciclos consecutivos. Em experimento em campo foram cultivadas duas variedades (RB92579 e RB867515) submetidas a 5 tratamentos de fertilização, sendo um com fertilizante convencional na dose recomendada, três doses de fertilizante biológico (2,5 t ha⁻¹, 5 t ha⁻¹ e 7,5 t ha⁻¹), além do controle com torta de filtro 20 t ha⁻¹, em arranjo fatorial (5x2). Aos 30 e 480 dias após o plantio (DAP) na cana planta e aos 30 e 360 (DAP) na cana soca, foram avaliados os atributos químicos no solo nas profundidades de 0 a 20 cm e 20 a 40 cm. Na cana planta, aos 150 DAP também se avaliou o estado nutricional, a altura da planta e o diâmetro do colmo. Aos 360 e 480 DAP avaliou-se: produtividade de colmos por hectare (TCH), pol por hectare (TPH), pureza, sólidos solúveis, Pol, fibra, PC e ATR. O fertilizante biológico mostrou efeito nas propriedades químicas do solo (P e K disponível), especialmente aplicando na dose mais elevada, nas duas profundidades. Os melhores resultados na absorção de nutrientes foram com o fertilizante biológico (7,5 t ha⁻¹), e na biometria o mesmo mostrou-se similar ao fertilizante convencional. O fertilizante biológico afetou positivamente o rendimento e as características tecnológicas nas duas variedades. Na cana planta obteve-se rendimento normal quando aplicado o fertilizante biológico (7,5 t ha⁻¹) e o fertilizante convencional na dose recomendada. Na cana soca o fertilizante biológico (7,5 t ha⁻¹) incrementou a produtividade, e também aumentou o P e K disponível no solo, mostrando efeito residual. Conclui-se que o fertilizante biológico tem potencial para aumentar as características da cana-de-açúcar e melhorar as propriedades químicas do solo, sendo alternativa viável a fertilizantes solúveis.

Palavras-chave: *Cunninghamella elegans*. *Saccharum* spp. Atributos tecnológicos. Biofertilizante organomineral. Bactéria diazotrófica de vida livre.

Biological fertilizer on sugarcane nutrition, productivity and technological qualities and chemical attributes of soil in consecutive crops

Abstract

The use of microbiological processes for the production of biofertilizers with phosphate and potassium rocks inoculated with *Acidithiobacillus* bacteria mixed with organic matter inoculated with the fungi *Cunninghamella elegans*, has shown good results as alternative fertilization, increasing the nutrients availability and it is shown as a practical and economical process. The objective of the research was to evaluate the efficacy of the biological fertilizer, produced from the biofertilizer of rocks plus organic matter inoculated with the fungus *C. elegans*, on soil chemical attributes, nutrient absorption, yield and technological characteristics in different varieties of sugarcane cultivated in two consecutive cycles. In the field experiment, two varieties (RB92579 and RB867515) were submitted to 5 fertilization treatments, one with conventional fertilizer at the recommended dose, three doses of biological fertilizer (2.5 t ha^{-1} , 5 t ha^{-1} and 7.5 t ha^{-1}), in addition to the control with filter cake 20 t ha^{-1} , in a factorial arrangement (5x2). At 30 and 480 days after planting (DAP) in the plant cane and at 30 and 360 (DAP) in the consecutive crop, the chemical attributes were evaluated in the soil at depths of 0 to 20 cm and 20 to 40 cm. In the first sugarcane crop, to 150 DAP also evaluated the nutritional status, the height of the plant and the diameter of the stem. At 360 and 480 DAP were evaluated: yield per hectare (YPH), pol per hectare (PPH), purity, soluble solids, Pol, fiber, PC and ATR. The biological fertilizer showed effect on the soil chemical attributes (available P and K), especially when applied at the highest dose, at both depths. The best results on nutrient absorption were observed with the biological fertilizer (dose 7.5 t ha^{-1}), and in the biometric values the results were similar with application of conventional fertilizer. The biological fertilizer affected positively the yield and the technological characteristics in both sugarcane varieties. In the first sugarcane crop, normal yield was obtained when applied the biological fertilizer (7.5 t ha^{-1}) and conventional fertilizer at the recommended dose. In the second crop the biological fertilizer (7.5 t ha^{-1}) increased the productivity and incremented the P and K available in the soil, showing significant residual effect. We may conclude that the biological fertilizer increase the sugarcane characteristics and the soil nutrients in soil, and may be viable alternative for replacement of conventional soluble fertilizers.

Keywords: *Cunninghamella elegans*; *Saccharum* spp.; biofertilizers; free-living diazotrophic bacteria; technological attributes.

5.1 Introdução

A nível mundial o Brasil é atualmente o maior produtor de cana-de-açúcar (CONAB, 2018). No Brasil a produção é estimada em mais de 750 milhões de toneladas, e no Nordeste o estado de Pernambuco é um importante centro de cana-de-açúcar para a produção de etanol e açúcar, com área total cultivada de aproximadamente 223 mil ha, mas tem baixa produtividade ($48,5 \text{ t ha}^{-1}$) contra uma média nacional de $72,5 \text{ t ha}^{-1}$ (CONAB, 2018). A baixa produtividade é promovida principalmente pela fertilização inadequada em relação às exigências da cultura (SOUSA JUNIOR et al., 2017; SILVA et al., 2017). Para aumento da produtividade da cana-de-açúcar, são utilizados os fertilizantes convencionais com NPK, no entanto, estes apresentam alto custo e problemas ambientais devido à lixiviação de nutrientes para as camadas mais profundas do solo (LIANG et al., 2013; STAMFORD et al., 2014).

Nesse contexto, a busca por práticas agrícolas sustentáveis é fundamental para atender às demandas agrícolas, para a sustentabilidade ambiental e econômica, com uso consciente dos recursos naturais não renováveis (BAREA, 2015). Uma prática recomendada é a exploração das comunidades microbianas do solo para uma produção agrícola sustentável, visando melhorar a nutrição das plantas e a qualidade do solo (MEENA et al., 2015; SATYAPRAKASH et al., 2017).

Os solos tropicais geralmente contêm baixo teor de nutrientes disponíveis para as plantas, sendo a aplicação de fontes renováveis de produtos naturais necessária para o uso racional de fertilizantes na agricultura e, especificamente, para minimizar problemas ambientais (ELSAYED et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2016). Uma alternativa viável aos fertilizantes solúveis P e K é o uso de fertilizantes biológicos (organomineral), produzidos a partir de rochas fosfatadas e potássicas em mistura com enxofre elementar inoculado com *Acidithiobacillus* (STAMFORD et al., 2014). Esta bactéria oxidativa do enxofre libera nutrientes de minerais em função do ácido sulfúrico produzido na reação metabólica, e são importantes na reciclagem de nutrientes (EL-TARABILY et al., 2006; STAMFORD et al., 2008; VAN STRAATEN, 2007).

Todavia, os fertilizantes de rochas P e K não contêm N para as plantas e para os organismos microbianos no solo. Para produzir um fertilizante biológico completo, o biofertilizante de rochas deve ser misturado com matéria orgânica visando

neutralizar a acidez promovida pelo ácido sulfúrico e o enriquecido em N por inoculação com bactéria diazotrófica de vida livre, como descrito por Lima et al. (2010).

Entretanto, se faz necessário avaliar a absorção de nutrientes em diferentes compartimentos da planta para entender os mecanismos que afetam a produtividade em diferentes ambientes (OLIVEIRA et al., 2017; STAMFORD et al., 2016), sendo uma estratégia eficiente para manejo em ciclos subsequentes (SEDIYAMA et al., 2009).

Outro fator muito importante, que causa grande prejuízo na cultura da cana-de-açúcar é o estresse biótico promovido pelo parasitismo por nematoides, visto que o hábito semi-perene da cultura proporciona diferentes formas de estresses no campo, principalmente quando estes organismos estão em populações elevadas e podem reduzir a produção drasticamente (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011; CHAVES et al., 2009; NOVARETTI; REIS, 2009). As plantas atacadas por nematoides ficam raquíticas, cloróticas e com baixa produtividade, incapazes de absorver a água e nutrientes em quantidade necessária para o adequado desenvolvimento (ASSUNÇÃO et al., 2010). O problema pode ocasionar perdas de produtividade em torno de 50 %, e os danos não se limitam à cana planta, afetando inclusive as produtividades das socas, e em consequência, a longevidade do canavial (DINARDO-MIRANDA et al., 2008). Nos últimos anos as pesquisas voltadas para buscar métodos de controle de nematoides têm sido realizadas, na tentativa de diminuir as populações abaixo do nível de dano econômico (CHAVES et al., 2016; DINARDO-MIRANDA et al., 2010).

A aplicação de quitina no solo aumenta a população de microrganismos quitinolíticos, que levaram a suprimir fitonematoides no solo (CASTRO; FLORES; URIBE, 2011). O efeito de quitinases vegetais e microbianas nos ovos e juvenis de *Meloidogyne hapla* (Chitwood) foi estudado por Mercer et al. (1992), que observou o aumento das taxas de eclosão de ovos de nematoides pela quitinase, causando a morte de juvenis. Contudo, as informações sobre o mecanismo nematicida da quitinase são limitadas na literatura (YANG et al., 2013), tendo em vista a complexidade da estrutura, e que o sistema multicomponente da quitina dificulta a compreensão e do mecanismo de ação da quitinase que é diferente em fungos, insetos e nematoides (CHEN et al., 2017).

A quitosana parece apresentar indução de mecanismos de resistência de plantas de tomate contra o nematoide de galhas, *M. incognita* (RADWAN et al., 2012), além de reduzir o fator de reprodução do patógeno e do número de ovos, em todas as doses aplicadas (MELO et al., 2012). O modo de ação da quitosana como indutor de resistência é atribuído a biossíntese de lignina e lignificação da parede celular, acúmulo de quitinases, além da síntese de moléculas envolvidas nos caminhos de sinalização intracelular que ativa outras respostas de defesa (BERGER et al., 2013; MELO et al., 2012).

De acordo com Berger et al. (2016), além de favorecer o crescimento e a produtividade, a quitosana também apresenta proteção contra o ataque por patógenos, tendo em vista que ativa a defesa do tecido vegetal. De acordo com Franco et al. (2011), o fungo *C. elegans*, contém quitina e quitosana em sua parede celular e, portanto, com a inoculação do fungo da Ordem Mucorales o fertilizante biológico pode ser uma fonte alternativa de adição de nutrientes e de proteção para as plantas contra patógenos. Trabalhos desenvolvidos por Stamford et al. (2014) e Oliveira et al. (2014, 2015), nas culturas da uva, melão e cana-de-açúcar, respectivamente, confirmaram a eficiência do fertilizante biológico produzido a partir da adição de quitosana fúngica através da inoculação com o fungo *C. elegans* que fornece nutrientes e aumenta o potencial como alternativa para substituição de fertilizantes solúveis convencionais.

Assim, no presente trabalho objetivou-se avaliar o efeito do fertilizante biológico com quitosana de *C. elegans*, nas propriedades químicas do solo, no estado nutricional, características de crescimento e produtividade e seus impactos nas características agroindustriais, cultivando duas variedades de cana-de-açúcar, em dois ciclos consecutivos da cultura (cana planta e cana soca).

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Experimento em campo

O experimento em campo foi conduzido em área de solo arenoso com alta infestação de *Pratylenchus zeae* Graham (1.050/20g de raiz) determinada em cultivos anteriores, no Engenho Água Branca da Usina São José S/A, no município de Igarassu (Latitude 7°42'27,3" S e Longitude 34°27'23,7" W) região do litoral norte do Estado de Pernambuco, com uma altitude de 128 m, em um Latossolo Amarelo

(ARAÚJO FILHO et al., 2000), de julho de 2016 a outubro de 2017 para cana planta e de outubro de 2017 a setembro de 2018 para cana soca.

O clima de acordo com a classificação de Koppen, é do tipo Am's (tropical úmida), com transição para o tipo As' ou pseudo-tropical, com temperaturas médias anuais de 24° C e precipitação média em torno de 1.634,2 mm (CPRM, 2005). A figura 1 apresenta as temperaturas máxima, média e mínima e a precipitação, observadas no período de duração do experimento (julho de 2016 a outubro de 2018). Os dados pluviométricos foram cedidos pelo Setor agrícola da Usina São José S/A, local onde foi conduzido o experimento. Os dados de temperatura foram coletados pelo site do INMET (Instituto Nacional Meteorológico) e utilizadas médias diárias.

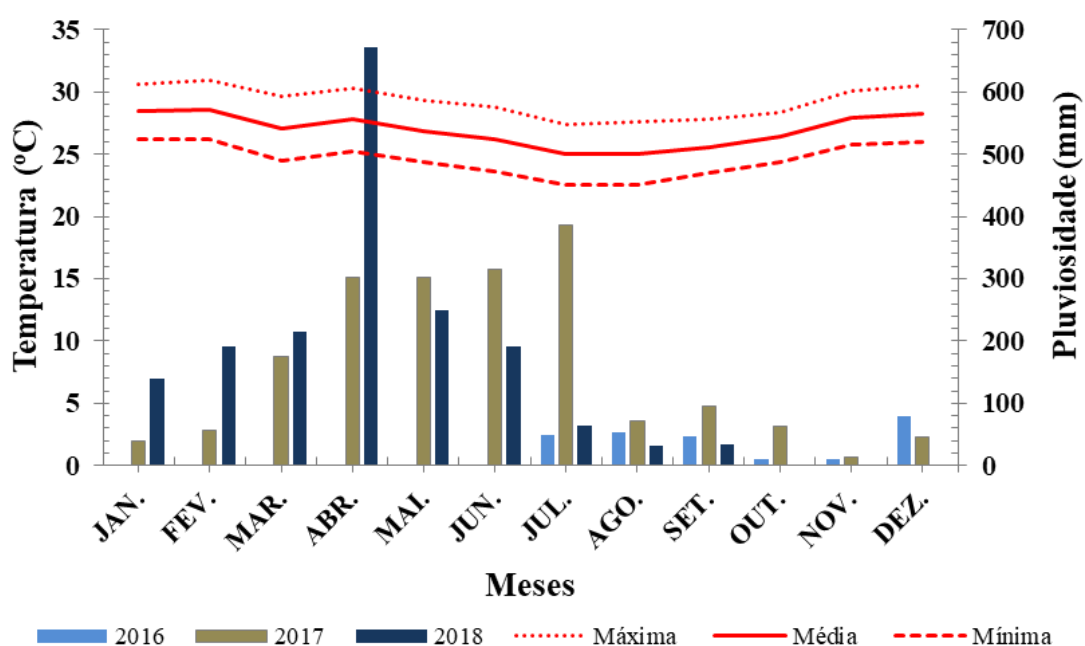


Figura 1. Temperatura (°C) e Precipitação (mm) registradas durante o período de condução do experimento na Usina São José, em Igarassu - PE

A caracterização química e física do solo foi realizada em duas profundidades, 0-20 cm e 20-40 cm (Tabela 1), em amostras compostas provenientes da coleta de 15 amostras simples coletadas aleatoriamente. Para caracterização química se determinou o pH (H₂O), P, K⁺, Na⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺. O P, K⁺ e Na⁺ foram extraídos com Mehlich 1. O P determinado por espectrofotometria, o K⁺ e Na⁺ por fotometria de chama. O Ca²⁺ e Mg²⁺ foram extraídos com KCl 1,0 mol L⁻¹ e

determinado por espectrofotometria de absorção atômica. Todas as análises foram realizadas conforme metodologias descritas pela Embrapa (2009). Com os resultados destas análises químicas, calculou-se a saturação por bases (V) e a capacidade de troca de cátions efetiva (CTC_{efetiva}).

Para as características físicas do solo foram realizadas a análises de granulometria do solo, quantificando as frações areia, silte e argila, definindo sua classe textural; densidade do solo; densidade das partículas pelo método do densímetro, segundo a metodologia da Embrapa (1997).

Tabela 1. Atributos químicos e físicos do solo em diferentes profundidades na área do ensaio de campo no Engenho Água Branca, Usina São José S/A; Igarassu – PE

Atributos Químicos						
Prof. (cm)	pH	P	K	Na	Ca	Mg
	H ₂ O (1:2,5)	mg dm ⁻³	-----Cmolc dm ⁻³ -----			
(0 - 20)	6,5	5,00	0,07	0,04	1,55	0,95
(20 - 40)	6,2	5,00	0,06	0,04	1,35	0,65

Atributos Físicos							
Prof. (cm)	Granulometria (%)				Ds ¹	Dp ²	Classe Textural
	Areia Grossa	Areia Fina	Silte	Argila	g cm ⁻³		
(0 - 20)	45,00	37,00	4,00	14,00	1,39	2,60	Franco
(20 - 40)	45,00	36,00	5,00	14,00	1,40	2,60	arenoso

¹Densidade do solo; ²Densidade aparente.

5.2.2 Produção do Fertilizante Biológico

Os biofertilizantes de rochas fosfáticas e potássicas foram produzidos na Universidade Federal Rural de Pernambuco, utilizando apatita natural de Irecê-BA (24% P₂O₅ total) e rocha potássica de Relinktum-Minas Gerais (8% total de K₂O). Foi misturado com enxofre elementar na proporção (1:10) referente a (S: rocha) inoculados com bactéria oxidante *Acidithiobacillus* de acordo com (STAMFORD et al., 2007).

Os biofertilizantes de rocha foram misturados com matéria orgânica (composto de minhoca + Torta de filtro) em proporção (BP + BK + M.O.) equivalente a 0,5: 0,5: 3,0. A matéria orgânica foi enriquecida em N por inoculação com *Beijerinckia indica* (NFB 10001) diazotrófica de vida livre, de acordo com Lima et al. (2010). Para produzir o biofertilizante misto, o material foi incubado por 30 dias,

mantendo a umidade próxima a máxima capacidade de campo, diariamente. O bioprotetor representa o biofertilizante misto inoculado com o fungo *Cunninghamella elegans* (UCP 542), que contém nas paredes celulares (7-8%) da quitosana (Franco et al., 2011), processado de forma semelhante, para o biofertilizante misto, e também mantido por 30 dias em incubação. As características dos biofertilizantes são mostradas na tabela 2 (capítulo 1).

5.2.3 Delineamento experimental

Foram utilizados um tratamento com fertilizante convencional (100% da dose recomendada - DR), mais o fertilizante biológico em 3 doses (2,5; 5,0 e 7,5 t ha⁻¹) calculadas com base no teor de fósforo, e uma dose controle (20 t ha⁻¹ de torta de filtro de cana-de-açúcar), com base em estudo desenvolvido anteriormente com cana-de-açúcar. Os tratamentos de fertilização foram aplicados em fundação, no plantio da cana-de-açúcar.

O experimento foi conduzido no esquema fatorial (5x2), no delineamento experimental em blocos ao acaso, com quatro repetições. Foram aplicados em duas variedades (RB 92579 e RB 867515), os tratamentos de fertilização: (1) FC: Fertilizante Convencional - 100% da Dose Recomendada (DR - IPA, 2008); (2) Biológico 50%: Fertilizante biológico 50% DR (2,5 t ha⁻¹); (3) Biológico 100%: Fertilizante biológico 100% DR (5 t ha⁻¹); (4) Biológico 150%: Fertilizante biológico 150% DR (7,5 t ha⁻¹); (5) Controle (20 t ha⁻¹ de torta de filtro).

A área experimental foi constituída por 40 parcelas, sendo cada parcela composta por cinco sulcos de 10,0 m de comprimento, espaçados em 1,10 m, totalizando cada parcela 55,0 m², perfazendo o experimento uma área de 2.200 m². Como área útil foi considerada 26,4 m², compreendendo os três sulcos centrais de cada parcela.

5.2.4 Preparo da área experimental

Foram utilizadas as variedades de cana-de-açúcar RB92579 e RB867515, por serem muito cultivadas no Nordeste e no Brasil, respectivamente (CHAPOLA et al., 2013). O plantio foi realizado em sulcos de aproximadamente 0,2 m de profundidade, utilizando colmos com sete meses de idade, dispostos em corrente dupla, de modo que a ponta de um coincida com a base do outro. Posteriormente,

os colmos foram seccionados em toletes, havendo uma densidade 18 gemas por metro (Figura 2).



Figura 2. Plantio da cana-de-açúcar. A e B: Cana semente; C: Sulcos de plantio; D: Distribuição da cana semente; E: Plantio em corrente dupla; F: Secção de colmos

5.2.5 Fertilização

Para o cálculo da aplicação do fertilizante convencional foi considerado a recomendação para P e K (superfosfato simples – 20% P_2O_5 e sulfato de potássio – 50% K_2O). O fertilizante biológico foi produzido na proporção MO: BP: BK = (4,0: 0,5: 0,5), com relação ao N considerou-se 1% determinado na análise do biofertilizante organomineral. As quantidades de N, P e K, para os tratamentos com fertilizante convencional (07-25-24 + Micro), foram calculadas em função da análise do solo e da necessidade da cultura (IPA, 2008). A aplicação dos tratamentos no solo foi realizada no fundo dos sulcos de 10 m de comprimento, no dia do plantio dos rebolos (Figura 3).



Figura 3. Aplicação de fertilizantes no experimento. A: Distribuição do fertilizante solúvel; B: Distribuição do fertilizante biológico; C e D: Distribuição da torta de filtro; E: fertilizante biológico

5.2.6 Determinações no solo

Amostras de solo, de cada parcela, foram coletadas após a aplicação dos tratamentos aos 30 e 480 dias após plantio (DAP) na cana planta e na cana soca foram aos 30 e 360 DAP, nas profundidades de 0-20 cm e 20-40 cm para realização de análises químicas: pH determinado em água (1:2,5); Ca^{2+} e Mg^{2+} trocável, extraídos com KCl 1 mol L^{-1} e determinados por espectrofotometria de absorção atômica; P e K disponível, extraídos com o extrator Mehlich1 e determinados por

espectrofotometria e fotometria de chama respectivamente, cujas análises foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Agronomia da UFRPE, Recife, Pernambuco.

As amostras de solo foram secas ao ar e passadas em peneira de 2 mm, obtendo-se a terra fina seca ao ar (TFSA) utilizada para as determinações químicas, de acordo com a metodologia da Embrapa (2009).

5.2.7 Análise Biométrica

A obtenção dos dados para avaliar a análise biométrica com medição da altura da planta e diâmetro do colmo foram realizadas aos 150 dias após plantio (DAP). Na análise biométrica utilizou-se duas plantas por fileira, totalizando seis plantas por parcela, avaliação feita com auxílio de fita métrica e paquímetro digital (Figura 4).

5.2.8 Determinações na parte aérea

As determinações na parte aérea foram realizadas coletando a folha +3, aos 150 DAP, para determinação de (N, P, K⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺) de acordo com as recomendações da Embrapa (2009), sendo as folhas secas em estufa com circulação forçada de ar a 65°C, até atingir peso constante (72 horas). Posteriormente, o material foi moído e submetido à digestão nitroperclórica de acordo com a metodologia da Embrapa (2009). Nos extratos determinou-se P total (amarelo de vanadato), pelo método colorimétrico; K total por fotometria de chama. A análise de Ca²⁺ e Mg²⁺ foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica e o N total da parte aérea, pelo método de Kjeldhal, por digestão com ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio (H₂SO₄+H₂O₂). As análises foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Ambiental - Departamento de Agronomia da UFRPE.

Aos 480 DAP (cana planta) e aos 360 DAP (cana soca), realizou-se o corte das canas e a avaliação da produtividade de colmos por hectare (TCH). A variável TCH foi estimada tomando-se como base a produção de colmos na parcela útil (26,4 m²), sendo aferida pela pesagem com dinamômetro, em campo. Após a pesagem, foram tomados aleatoriamente 10 colmos, enviados ao laboratório da Usina São José S/A, para avaliação das variáveis agroindustriais.



Figura 4. Avaliação biométrica aos 150 DAP. A: Avaliação de altura da planta; B e C: Avaliação de diâmetro de colmo

No colmo foi determinado: a percentagem de fibras; a percentagem de sacarose no colmo (PC); e o açúcar teórico recuperável (ATR). As variáveis fibras, Pol, pureza e ATR foram estimadas segundo a metodologia descrita pelo CONSECANA (2006). A produtividade de Pol ou tonelada de Pol por hectare (TPH) foi estimada pela equação: $TPH = TCH \times PC/100$, conforme Lima Neto et al. (2013). Posteriormente, amostras foram trituradas em forrageira e submetidas à prensa hidráulica por um minuto, sob pressão de 250 kg cm^{-2} , coletando-se o caldo (CONSECANA (2006). No caldo determinou: pureza; teores de sólidos solúveis totais ($^{\circ}\text{Brix}$) com refratômetro digital; e a percentagem de sacarose aparente no caldo (Pol), com uso de sacarímetro automático.

5.2.9 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados pelo programa estatístico SAS (SAS Institute 2011). O pH e os teores de P, K⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺ nas duas profundidades foram avaliadas considerando as variedades de cana, e os tratamentos de fertilização, como medidas repetidas no tempo. Utilizou-se o pacote estatístico SAS Learning 2.0, seguindo o procedimento para modelo misto, sendo selecionado o teste de covariância [AR(1), Ante (1), ARH (1), ARMA (1), CS, CSH, HF, TOEP, Lin (1), UN] que apresentou o menor valor do critério de Akaike (WOLFINGER & CHANG, 1995). Nas variáveis em que se observaram efeito significativo ($p < 0,05$) foi realizada análise da variância (ANOVA), selecionando a significância dos parâmetros até 5% pelo teste de F.

A avaliação nutricional e biométrica da planta, a produtividade de colmos e as variáveis agroindustriais foram avaliadas em função das variedades e dos tratamentos de fertilização. Esses dados foram submetidos à análise da variância (ANOVA) pelo teste F ($p \leq 0,05$). Nas variáveis cujos efeitos principais e/ou interação foram significativos, aplicou-se o teste de comparação de médias de Tukey ($p \leq 0,05$).

5.3 Resultados

5.3.1 Atributos do solo

Os efeitos dos tratamentos de adubação nos atributos químicos do solo na camada superficial (0-20 cm de profundidade) para duas variedades de cana-de-açúcar (RB92579 e RB867515) são mostrados nas (Tabelas 2 e 3).

Os dados da análise do pH na camada superficial do solo onde se cultivaram as variedades de cana-de-açúcar sob diferentes tratamentos de fertilização, apresentou efeito significativo para a interação entre os tratamentos de fertilização e tempo de coleta (30 e 480 DAP), onde os tratamentos com fertilizante biológico nas diferentes doses afetou o pH do solo, apresentando valores médios entre 5,50 e 5,69 quando comparados os tratamentos com fertilizante solúvel e controle (6,57 e 6,49) respectivamente, em ambas as variedades (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Valores de acidez ativa (pH) e dos teores de P e K disponível, Ca e Mg trocável do solo na profundidade de 0 - 20 cm, afetados por diferentes tratamentos de fertilização cultivado com a variedade RB 92579, ao ciclo de cana planta

Tratamentos ¹	Tempo de Coleta		Tempo de Coleta		Tempo de Coleta		Tempo de Coleta		Tempo de Coleta							
	30 DAP	480 DAP	30 DAP	480 DAP	30 DAP	480 DAP	30 DAP	480 DAP	30 DAP	480 DAP						
	pH	Média	P	Média	K ⁺	Média	Ca ²⁺	Média	Mg ²⁺	Média						
	----- 1:2,5H ₂ O -----		----- mg dm ⁻³ -----		----- cmolc dm ⁻³ -----											
FC	6,65 Aa	6,49 Aa	6,57	14,07	25,04	19,55 B	0,09	0,10	0,10 AB	1,90 Bb	3,85 Aa	2,87	0,46	0,41	0,43	
Biológico 50%	6,04 ABa	5,34 Ba	5,69	12,51	37,47	24,99 B	0,05	0,09	0,07 B	3,43 Aa	4,12 Aa	3,78	0,60	0,44	0,52	
Biológico 100%	5,57 Ba	5,42 Ba	5,50	18,79	46,65	32,72 AB	0,04	0,09	0,07 B	1,97 Bb	3,67 Aa	2,82	0,40	0,34	0,37	
Biológico 150%	5,44 Ba	5,67 Ba	5,56	32,34	70,47	51,40 A	0,06	0,16	0,11 AB	3,72 Aa	4,30 Aa	4,01	0,61	0,72	0,66	
Controle	6,72 Aa	6,26 Aa	6,49	11,15	45,89	28,52 B	0,08	0,13	0,11 AB	1,77 Bb	4,18 Aa	2,97	0,40	0,50	0,45	
Média	6,25	6,07		15,47 b	41,14 a		0,07 b	0,12 a		2,20	4,10		0,51	0,51		
Fertilizante	F		F		F		F		F		F		F		F	
	14,71***		5,56***		3,29**		9,23***		1,95 ^{ns}							
Tempo	5,56**		102,93***		37,43***		324,01***		0,0 ^{ns}							
Fert*Tempo	2,71**		2,04 ^{ns}		1,75 ^{ns}		8,25***		0,86 ^{ns}							
CV (%)	5,27		37,09		31,71		13,62		39,36							

¹ Tratamentos: FC: fertilizante solúvel convencional (FC 100% Dose Recomendada - DR); Biológico 50%: Fertilizante biológico 50% DR (equivalente a 2,5 t ha⁻¹); Biológico 100%: Fertilizante biológico 100% DR (equivalente a 5 t ha⁻¹); Biológico 150%: Fertilizante biológico 150% DR (equivalente a 7,5 t ha⁻¹); Controle (20 t ha⁻¹ de torta de filtro). Letras maiúsculas iguais na coluna (Fertilizantes) e minúsculas na linha (Tempo) não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{ns} não significativo; *, **, *** significativos, respectivamente, aos níveis de 5%, 1% e < 0,1%, de probabilidade

Este efeito se justifica devido ao ácido sulfúrico metabolizado pela bactéria oxidativa *Acidithiobacillus*, utilizada na produção do fertilizante biológico especialmente quando aplicados em altas doses, que pode proporcionar a disponibilidade de nutrientes ao longo do tempo.

Para os teores de fósforo disponível no solo observa-se que, de uma maneira geral, os valores foram estatisticamente superiores na área em que houve aplicação do fertilizante biológico (Tabelas 2 e 3). A disponibilidade de P foi maior nos tratamentos com fertilizante biológico, principalmente quando comparados com os tratamentos com fertilizante solúvel, sendo observado um aumento no teor de P disponível no solo ao longo do tempo de cultivo. Estes resultados confirmam, portanto, os efeitos do biofertilizante inoculado com *A. thiooxidans* na liberação de nutrientes contidos na rocha utilizada.

Nas variedades RB92579 e RB867515, os efeitos do fertilizante biológico foram evidentes, com influência nos nutrientes do solo. Os dados mostram que nas três doses o fertilizante biológico promoveu aumento significativo, comparado com o fertilizante solúvel convencional e o tratamento controle.

Com base na Tabela 2, que mostra o solo cultivado com a variedade RB92579 observa-se que o fertilizante biológico na dose 150% da recomendação, apresentou o maior valor de P disponível no solo ($70,47 \text{ mg dm}^{-3}$) no tempo 480 DAP, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos, e os tratamentos com fertilizante solúvel apresentaram os menores valores ($25,04 \text{ mg dm}^{-3}$). Os resultados mostram que o fertilizante biológico se torna uma alternativa ao fertilizante convencional no fornecimento de fósforo. Na área cultivada com a variedade RB867515 houve o mesmo comportamento estatístico observado para a variedade RB92579, porém os teores de fósforo disponível no tratamento com fertilizante biológico no nível 150% da dose recomendada foi maior e proporcionou o maior valor de P disponível aos 480 DAP ($72,86 \text{ mg dm}^{-3}$).

Os teores de P disponível na camada superficial do solo onde se cultivaram os genótipos de cana-de-açúcar se elevaram com a aplicação do fertilizante biológico aos 480 DAP, independentemente da dose utilizada (50%, 100% e 150%) como mostram as tabelas 2 e 3. O incremento na concentração de P após 480 DAP foi de aproximadamente 120% quando as variedades RB92579 e RB867515 foram cultivadas com adubo fertilizante biológico com 150% da dose recomendada.

Tabela 3. Valores de acidez ativa (pH) e dos teores de P e K disponível, Ca e Mg trocável do solo na profundidade de 0 - 20 cm, afetados por diferentes tratamentos de fertilização cultivado com a variedade RB 867515, ao ciclo de cana planta

Tratamentos ¹	Tempo de Coleta		Tempo de Coleta		Tempo de Coleta		Tempo de Coleta		Tempo de Coleta							
	30 DAP	480 DAP	30 DAP	480 DAP	30 DAP	480 DAP	30 DAP	480 DAP	30 DAP	480 DAP						
	pH		P		K ⁺		Ca ²⁺		Mg ²⁺							
	----- 1:2,5H ₂ O -----		----- mg dm ⁻³ -----		----- cmol _c dm ⁻³ -----											
FC	6,49 Aa	6,17 ABa	6,33	11,07	22,07	16,57 B	0,09 ABa	0,11 Aa	0,10	1,74 Bb	4,05 Aa	2,89	0,47	0,42	0,44	
Biológico 50%	5,43 Ba	5,58 Ba	5,50	16,58	31,54	24,06 B	0,05 Ca	0,08 Aa	0,06	3,24 ABa	4,05 Aa	3,65	0,53	0,46	0,49	
Biológico 100%	5,49 Ba	5,25 Ba	5,37	22,00	56,02	39,01 AB	0,04 Cb	0,13 Aa	0,08	1,79 Bb	4,01 Aa	2,90	0,38	0,57	0,48	
Biológico 150%	5,70 Ba	5,13 Ba	5,42	32,83	72,86	52,84 A	0,06 BCb	0,16 Aa	0,11	3,77 Aa	4,58 Aa	4,18	0,66	0,80	0,73	
Controle	6,54 Aa	6,53 Aa	6,53	9,05	42,16	25,60 B	0,08 Ba	0,13 Aa	0,11	1,91 Bb	4,32 Aa	3,12	0,43	0,56	0,49	
Média	6,19	6,02		15,54 b	39,65 a		0,08	0,12		2,21	4,14		0,51	0,55		
Fertilizante	F		F		F		F		F		F		F		F	
Tempo	42,34***		9,68***		2,90*		10,81***		1,35 ^{ns}		7,52*		84,11***		36,82***	
Fert*Tempo	2,80*		1,99 ^{ns}		4,30**		3,31*		0,75 ^{ns}		195,92***		3,31*		10,81***	
CV (%)	3,94		39,64		28,05		15,75		39,04							

¹ Tratamentos: FC: fertilizante solúvel convencional (FC 100% Dose Recomendada - DR); Biológico 50%: Fertilizante biológico 50% DR (equivalente a 2,5 t ha⁻¹); Biológico 100%: Fertilizante biológico 100% DR (equivalente a 5 t ha⁻¹); Biológico 150%: Fertilizante biológico 150% DR (equivalente a 7,5 t ha⁻¹); Controle (20 t ha⁻¹ de torta de filtro). Letras maiúsculas iguais na coluna (Fertilizantes) e minúsculas na linha (Tempo) não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{ns} não significativo; *, **, *** significativos, respectivamente, aos níveis de 5%, 1% e < 0,1%, de probabilidade

Quando comparado o fertilizante biológico a 150%, com o fertilizante convencional o incremento foi de 119,1% e 154,4% nas áreas de cultivo das variedades RB92579 e RB867515 respectivamente. Quando comparado com o controle os incrementos foram de 53,6% e 72,8%, respectivamente.

O K disponível no solo demonstra o efeito do fertilizante biológico, que mostrou a tendência de aumentar a quantidade de K no solo ao longo do tempo de cultivo, independente da variedade utilizada (Tabelas 2 e 3). Além disso, os melhores valores de K disponível no solo foram observados quando o fertilizante biológico foi aplicado em taxas mais elevadas, e foram superiores aos do fertilizante solúvel convencional, principalmente aos 480 DAP.

Para a variedade RB92579 o K disponível no solo mostrou um efeito significativo entre os tratamentos, sendo o fertilizante biológico na menor dose (50% da dose recomendada) obtido $0,07 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ e para o fertilizante solúvel $0,10 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ (Tabela 2). É importante descrever o efeito do fertilizante biológico, aplicado na maior dose (150%), que resultou em aumento significativo de K disponível ($0,11 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$) após a colheita da cana-de-açúcar. Na variedade RB867515 o K disponível no solo aumentou quando os fertilizantes solúveis foram aplicados, provavelmente devido à maior concentração de K no fertilizante solúvel. Contudo após 480 DAP, os tratamentos com fertilizante biológico na dose 150% da recomendação, observa-se um incremento significativo de $0,16 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ como demonstrado na tabela 3, e também no controle ($0,13 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$), visto que a torta de filtro é um composto orgânico rico em potássio.

Os teores de P e K disponíveis no presente estudo foram devido ao uso dos biofertilizantes de rocha fosfata e potássica, respectivamente, que fazem parte do processo de produção do fertilizante biológico utilizado, e que são fontes de P e K, e são extraídos por reação de acidólise, através de bactérias acidificantes, que na presença de enxofre, produzem ácido sulfúrico.

No que se refere aos teores de cálcio e magnésio trocável na camada superficial do solo, com base nas Tabelas 2 e 3, pode-se constatar que houve tendência de aumento, para os dois nutrientes, quando foi aplicado o fertilizante biológico na maior dose (150% dose recomendada).

Constata-se que, para o Ca^{2+} trocável no solo, os tratamentos com fertilizante biológico apresentaram valores superiores ao tratamento com fertilizante convencional na dose recomendada, após 30 DAP, diferindo estatisticamente, tanto

na área com RB92579 quanto na área com RB867515 apresentando valores de 3,77 $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$. Apesar de não se observar efeito significativo entre os tratamentos de fertilização após 480 DAP, os tratamentos com fertilizante biológico apresentaram maiores valores 4,58 ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$), quando comparados com o fertilizante solúvel (4,05 $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$) e controle (4,18 $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$). Confirmando a efeito positivo do fertilizante biológico na disponibilidade de determinado elemento (Tabelas 2 e 3).

Não houve diferença significativa entre os tratamentos de fertilização, em relação aos teores de Mg^{2+} trocável no solo (Tabelas 2 e 3). No entanto, os níveis médios de Mg^{2+} trocável, onde o fertilizante biológico foi aplicado, foi maior do que o fertilizante convencional. A média de Mg^{2+} no solo para as duas variedades foi de 0,73 $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ com fertilizante biológico (150% da dose recomendada) e 0,44 $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ para o fertilizante convencional e para o controle.

Na camada subsuperficial (20 a 40 cm de profundidade), o comportamento dos tratamentos de fertilização nos atributos químicos do solo foi semelhante ao da camada superficial, com incrementos após a adubação com fertilizante biológico, enquanto que para o fertilizante convencional e o tratamento controle foram observados os menores teores, principalmente de P e K, durante o ciclo de cana planta (Tabela 4).

No cultivo da RB92579 e RB867515 o tratamento com fertilizante biológico 150%, proporcionou incremento nos teores de P e K do solo de 86,74 mg dm^{-3} e 0,17 $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ em média (Tabela 4), já para a camada superficial na variedade RB92579, esses valores foram de 51,40 mg dm^{-3} e 0,11 $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ (Tabela 2) e na variedade RB867515 de 52,84 mg dm^{-3} e 0,11 $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ (Tabela 3). Os maiores incrementos de P e K na camada subsuperficial provavelmente aconteceram devido ao modo de aplicação dos tratamentos de fertilização, no fundo do sulco, ou seja, aproximadamente a 20 cm de profundidade.

Em ambas as variedades adubadas com fertilizante biológico na maior dose, após 480 DAP incrementou os teores de P e K disponível na ordem de 100% e 130% respectivamente, quando comparado com o fertilizante solúvel. Os teores de P, K e Mg^{+2} do solo na camada subsuperficial foram mais elevados em função da fertilização, onde os tratamentos com fertilizante biológico apresentaram os maiores valores independentemente da dose aplicação e da variedade cultivada.

Tabela 4. Valores de acidez ativa (pH) e dos teores de P e K disponível, Ca e Mg trocável do solo na profundidade de 20 - 40 cm, afetados por diferentes tratamentos de fertilização cultivado com as variedades RB 92579 e RB 867515, ao ciclo de cana planta

Tratamentos ¹	Tempo de Coleta		Tempo de Coleta		Tempo de Coleta		Tempo de Coleta		Tempo de Coleta							
	30 DAP 480 DAP		30 DAP 480 DAP		30 DAP 480 DAP		30 DAP 480 DAP		30 DAP 480 DAP							
	pH	Média	P	Média	K ⁺	Média	Ca ²⁺	Média	Mg ²⁺	Média						
	----- 1:2,5H ₂ O -----		----- mg dm ⁻³ -----		----- Cmol _c dm ⁻³ -----											
FC	6,39	6,66	6,53 A	19,13	60,33	39,73 B	0,06 Aa	0,08 BCa	0,07	2,10	4,16	3,13	0,39	0,60	0,49 AB	
Biológico 50%	5,88	5,56	5,72 B	24,39	86,63	55,51 B	0,04 Ab	0,14 ABa	0,09	2,51	4,15	3,33	0,55	0,60	0,57 AB	
Biológico 100%	5,36	5,51	5,43 B	40,91	78,31	59,61 B	0,04 Ab	0,16 Aa	0,10	2,15	3,93	3,04	0,47	0,96	0,72 A	
Biológico 150%	5,62	5,54	5,58 B	51,65	121,82	86,74 A	0,07 Ab	0,17 Aa	0,12	2,78	4,20	3,49	0,58	0,87	0,72 A	
Controle	6,38	6,23	6,30 A	22,01	73,43	47,72 B	0,05 Ab	0,12 Ba	0,08	2,34	4,08	3,21	0,43	0,56	0,49AB	
Média	6,16	6,11		28,12 b	72,46 a		0,05	0,11		2,34 b	3,95 a		0,46 b	0,64 a		
Fertilizante	F		F		F		F		F		F		F		F	
Tempo	17,13 ^{***}		11,33 ^{***}		13,92 ^{***}		2,44 ^{ns}		4,24 ^{**}		0,49 ^{ns}		73,46 ^{***}		146,28 ^{***}	
Fert*Tempo	1,03 ^{ns}		1,70 ^{ns}		9,00 ^{***}		0,47 ^{ns}		0,82 ^{ns}							
CV (%)	5,25		35,84		25,74		16,18		38,09							

¹ Tratamentos: FC: fertilizante solúvel convencional (FC 100% Dose Recomendada - DR); Biológico 50%: Fertilizante biológico 50% DR (equivalente a 2,5 t ha⁻¹); Biológico 100%: Fertilizante biológico 100% DR (equivalente a 5 t ha⁻¹); Biológico 150%: Fertilizante biológico 150% DR (equivalente a 7,5 t ha⁻¹); Controle (20 t ha⁻¹ de torta de filtro). Letras maiúsculas iguais na coluna (Fertilizantes) e minúsculas na linha (Tempo) não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{ns} não significativo; *, **, *** significativos, respectivamente, aos níveis de 5%, 1% e < 0,1%, de probabilidade

No segundo ciclo da cana-de-açúcar (cana soca), em relação ao P e K disponível no solo, um efeito significativo foi identificado quando comparamos o fertilizante biológico (independente da dose) ao fertilizante solúvel mineral e ao controle (Tabela 5). É importante descrever o efeito residual do fertilizante biológico, que apresentou maiores quantidades de P e K disponíveis nas duas safras consecutivas.

A Tabela 5, mostra o solo cultivado com as variedades RB867515 e RB92579 observa-se que o fertilizante biológico no nível 150% da recomendação apresentou os maiores valores de P e K disponível no solo ($112,30 \text{ mg dm}^{-3}$ e $0,17 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$) aos 360 DAP, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos, sendo que os tratamentos com fertilizante solúvel apresentaram os menores valores em média ($26,06 \text{ mg dm}^{-3}$ e $0,10 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$). Isto demonstra o efeito residual do fertilizante biológico torna-se uma alternativa viável ao fertilizante comercial no fornecimento de fósforo a cultura, principalmente se compararmos aos dados da cana planta (Tabelas 2, 3 e 4).

O incremento nas concentrações de P e K, aos 360 DAP foram de aproximadamente 300% e 70% respectivamente, quando as variedades RB92579 e RB867515 foram cultivadas com o fertilizante biológico na dose 150%, comparado com o fertilizante convencional.

Para o Ca^{2+} e Mg^{2+} trocável no solo, os tratamentos com fertilizante biológico apresentaram valores superiores ao tratamento com fertilizante solúvel na dose recomendada, 360 DAP, diferindo estatisticamente, para ambas as variedades apresentando os maiores valores para o fertilizante biológico na dose 150% ($6,53 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ e $2,59 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$) respectivamente, quando comparados com o fertilizante solúvel convencional ($5,21 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ e $1,32 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$). Confirmando o potencial positivo do fertilizante biológico na disponibilidade dos nutrientes (Tabela 5).

Tabela 5. Valores de acidez ativa (pH) e dos teores de P e K disponível, Ca e Mg trocável do solo, afetados por diferentes tratamentos de fertilização cultivado com as variedades RB 92579 e RB 867515, ao ciclo de cana soca

Tratamentos ¹	Tempo de Coleta		Tempo de Coleta		Tempo de Coleta		Tempo de Coleta		Tempo de Coleta						
	30 DAP	360 DAP	30 DAP	360 DAP	30 DAP	360 DAP	30 DAP	360 DAP	30 DAP	360 DAP					
	pH	Média	P	Média	K ⁺	Média	Ca ²⁺	Média	Mg ²⁺	Média					
	----- 1:2,5H ₂ O -----		----- mg dm ⁻³ -----		----- Cmol _c dm ⁻³ -----										
FC	6,49	6,52	6,50 A	25,04 Ba	27,08 Ca	26,06	0,10 Aa	0,09 Ba	0,10	3,85 Ab	5,21 Ba	4,53	0,41 Ab	1,32 Ba	0,86
Biológico 50%	5,34	5,40	5,37 B	37,47 Bb	62,28 Ba	49,87	0,09 Aa	0,11 Ba	0,10	4,12 Ab	6,18 ABa	5,15	0,44 Ab	2,12 ABa	1,28
Biológico 100%	5,42	5,42	5,42 B	46,65 ABb	80,01 Ba	63,33	0,09 Aa	0,12 ABa	0,11	3,67 Ab	5,87 ABa	4,77	0,34 Ab	1,78 Ba	1,06
Biológico 150%	5,67	5,59	5,63 B	70,47 Ab	112,30 Aa	91,39	0,16 Aa	0,17 Aa	0,16	4,30 Ab	6,53 Aa	5,42	0,72 Ab	2,59 Aa	1,65
Controle	6,26	6,30	6,28 A	45,89 ABa	58,04 BCa	51,96	0,13 Aa	0,14 ABa	0,13	4,18 Ab	5,82 ABa	5,00	0,50 Ab	1,62 Ba	1,06
Média	6,07	6,09		39,27	52,75		0,12	0,12		4,10	5,76		0,51	1,71	
		F		F		F		F		F		F		F	
Fertilizante		20,56***		33,51***		2,61*		2,92*		807,01***		5,21***		1.110,34***	
Tempo		0,37 ^{ns}		61,01***		0,02 ^{ns}		7,35***							
Fert*Tempo		0,37 ^{ns}		13,59***		2,83*									
CV (%)		4,02		20,05		25,35		7,03						21,72	

¹ Tratamentos: FC: fertilizante solúvel convencional (FC 100% Dose Recomendada - DR); Biológico 50%: Fertilizante biológico 50% DR (equivalente a 2,5 t ha⁻¹); Biológico 100%: Fertilizante biológico 100% DR (equivalente a 5 t ha⁻¹); Biológico 150%: Fertilizante biológico 150% DR (equivalente a 7,5 t ha⁻¹); Controle (20 t ha⁻¹ de torta de filtro). Letras maiúsculas iguais na coluna (Fertilizantes) e minúsculas na linha (Tempo) não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{ns} não significativo; *, **, *** significativos, respectivamente, aos níveis de 5%, 1% e < 0,1%, de probabilidade

5.3.2 Avaliação nutricional (cana planta)

5.3.2.1 Teores de N, P e K na folha +3

Os resultados do teor de nutrientes na folha (+3) das variedades de cana-de-açúcar RB92579 e RB867515 aos 150 DAP, submetidos a diferentes tratamentos de fertilização são mostrados na tabela 6. Os dados de N total apresentados estão de acordo com os efeitos nas plantas obtidas pelo fertilizante biológico aplicado a uma taxa equivalente a 150% da dose recomendada, que aumentou o teor total de N em relação à aplicação de fertilizante solúvel e ao controle. Observa-se influência dos tratamentos de adubação quando comparados com o controle com torta de filtro (20 t ha⁻¹) não enriquecido em N por inoculação com bactérias diazotróficas (Tabela 6). Os resultados apresentaram resposta positiva e significativa, mostrando valores mais elevados no tratamento com fertilizante biológico na dose 150% (9,69 g kg⁻¹) em comparação com o fertilizante convencional e com o controle (8,43 e 7,12 g kg⁻¹), respectivamente.

Os resultados da absorção total de P na parte aérea da cana-de-açúcar são apresentados na Tabela 6. O fertilizante biológico nas maiores doses apresentou resultados superiores aos tratamentos com fertilizante solúvel. Pode-se observar que com a aplicação do fertilizante biológico, os melhores resultados de P total foram obtidos, especialmente quando aplicada a dose 150%, e os resultados não são diferentes daqueles com o com fertilizante convencional solúvel (5,93 g kg⁻¹ e 4,58 g kg⁻¹) respectivamente, diferindo estatisticamente do tratamento controle (4,29 g kg⁻¹).

Os resultados do K total na parte aérea, com aplicação dos diferentes tratamentos de fertilização são mostrados na tabela 6. A absorção total de K na folha da cana-de-açúcar indica os efeitos do fertilizante biológico em comparação com o tratamento controle (46,08 cmol_c dm⁻³ e 31,44 cmol_c dm⁻³), com diferença significativa. O efeito do fertilizante biológico nas doses mais altas (100% e 150%) foram similares aos do fertilizante solúvel, e o melhor resultado foi obtido quando aplicado o fertilizante biológico na dose 150% da recomendação (46,08 cmol_c dm⁻³) apresentado na tabela 6. Esse comportamento foi devido a atuação do fertilizante biológico que potencializou a disponibilidade dos nutrientes no solo (Tabelas 2, 3 e 4), com maior acúmulo de P e K.

Tabela 6. Teores de N total, P total, K total, Ca total e Mg total em folhas de variedades de cana-de-açúcar submetidas a tratamentos de fertilização aos 150 dias após o plantio (DAP) no ciclo da cana planta

Tratamentos ¹	RB 92579 RB 867515		RB 92579 RB 867515		RB 92579 RB 867515		RB 92579 RB 867515		RB 92579 RB 867515							
	N total		Média	P total		Média	K total		Média	Ca total		Média	Mg total		Média	
	g kg ⁻¹		g kg ⁻¹		g kg ⁻¹		g kg ⁻¹		g kg ⁻¹		g kg ⁻¹		g kg ⁻¹		g kg ⁻¹	
FC	8,19	8,68	8,43 b	4,33	4,83	4,58 b	38,78	44,88	41,83 ab	20,23	23,49	21,86 b	8,84	12,59	10,71 b	
Biológico 50%	8,36	8,43	8,40 b	4,86	4,82	4,84 b	41,52	42,40	41,96 ab	22,71	25,79	24,25 b	9,12	11,56	10,34 b	
Biológico 100%	8,82	9,24	9,03 ab	5,64	5,48	5,56 ab	40,08	40,08	40,08 ab	24,70	29,77	27,23 ab	11,03	14,77	12,90 a	
Biológico 150%	9,97	9,41	9,69 a	5,84	6,02	5,93 a	45,84	46,32	46,08 a	31,30	31,80	31,55 a	13,50	16,10	12,67 ab	
Controle	7,59	6,65	7,12 c	4,18	4,40	4,29 b	30,48	32,40	31,44 b	20,30	17,65	18,97 b	7,77	8,25	8,01 b	
Média	8,84	8,47		5,04	5,15		40,14	41,26		23,45 B	26,76 A		10,09 B	13,00 A		
		F		F		F		F		F		F		F		F
Fertilizante		7,41 ^{***}		7,19 ^{***}		9,74 ^{***}		7,94 ^{***}		12,37 ^{***}		6,33 ^{***}		25,84 ^{***}		0,52 ^{ns}
Tempo		3,55 ^{ns}		0,6 ^{ns}		1,15 ^{ns}		0,92 ^{ns}		1,77 ^{ns}		1,77 ^{ns}		1,77 ^{ns}		1,77 ^{ns}
Fert*Tempo		1,64 ^{ns}		0,47 ^{ns}		0,47 ^{ns}		0,47 ^{ns}		0,47 ^{ns}		0,47 ^{ns}		0,47 ^{ns}		0,47 ^{ns}
CV (%)		8,90		11,00		10,22		14,97		14,97		19,84		19,84		19,84

¹ Tratamentos: FC: fertilizante solúvel convencional (FC 100% Dose Recomendada - DR); Biológico 50%: Fertilizante biológico 50% DR (equivalente a 2,5 t ha⁻¹); Biológico 100%: Fertilizante biológico 100% DR (equivalente a 5 t ha⁻¹); Biológico 150%: Fertilizante biológico 150% DR (equivalente a 7,5 t ha⁻¹); Controle (20 t ha⁻¹ de torta de filtro). Letras maiúsculas iguais na coluna (Fertilizantes) e minúsculas na linha (Variedade) não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{ns} não significativo; *, **, *** significativos, respectivamente, aos níveis de 5%, 1% e < 0,1%, de probabilidade

5.3.2.2 Teores de Ca e Mg nas folhas

A resposta da absorção de Ca e Mg nas folhas da cana-de-açúcar são apresentadas na Tabela 6, também reflete os dados de macro elementos acumulados. Observa-se diferença significativa para ambos os elementos quando comparado os teores de Ca e Mg das variedades, a variedade RB867515 apresentaram as maiores quantidades de Ca ($26,76 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$) e Mg ($13,00 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$) em comparação com a variedade RB92579 para os teores de Ca e Mg ($23,45$ e $10,09 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$), esse comportamento levanta a hipótese de que os genótipos de cana-de-açúcar se apresentaram diferentes quanto aos tratamentos de fertilização.

Em relação ao teor de Ca nas folhas de cana-de-açúcar, a eficácia do fertilizante biológico pode ser observada, especialmente quando aplicado na dose mais alta (Biológico 150%) alcançando o maior teor ($31,55 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$). O fertilizante biológico apresentou um aumento significativo em comparação os tratamentos com fertilizante convencional e o controle (Tabela 6). Os resultados indicam uma maior eficácia do fertilizante biológico em comparação com o fertilizante solúvel na liberação de Ca para as plantas. Assim como observado no Ca, os melhores resultados apresentados para a absorção de Mg são proporcionados quando o fertilizante biológico foi aplicado nas maiores doses (100% e 150%).

O acúmulo máximo de Mg foi observado no tratamento com fertilizante biológico na dose 100% ($12,90 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$), diferindo estatisticamente do controle que apresentou o menor valor $8,01 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ (Tabela 6). Estes resultados provavelmente se devem à acidez promovida pelo ácido sulfúrico em decorrência da inoculação da bactéria oxidativa *A. thiooxidans*, utilizada na produção do biofertilizante de rocha PK, que aumenta a liberação de nutrientes contidos nas rochas.

5.3.3 Avaliação biométrica

Os dados biométricos aos 150 DAP da cana-de-açúcar, submetidas aos diferentes tratamentos de fertilização são mostradas na tabela 7. Em geral, nos parâmetros biométricos verifica-se diferença significativa entre as variedades, não observando efeitos significativo da adubação da cana-de-açúcar, contudo os resultados foram semelhantes ao do fertilizante comercial especialmente em plantas

que receberam aplicações de biofertilizante em taxas maiores. Após 150 DAP a altura máxima alcançada pela variedade RB867515 quando adubado com fertilizante biológico na dose 150% foi de (84,25 cm) e para a variedade RB92579 com o mesmo tratamento o resultado foi bem menor (56,62 cm). Para o diâmetro do colmo foi observada baixa resposta dos tratamentos de fertilização. O diâmetro máximo foi alcançado na variedade RB867515 (22,21 mm), quando foram aplicados o fertilizante convencional e o fertilizante biológico nas maiores doses.

Tabela 7. Altura de planta e diâmetro de colmo de variedades de cana submetidas a tratamentos de fertilização aos 150 dias após o plantio (DAP) no ciclo cana planta

Tratamentos ¹	RB 92579		RB 867515		Média	
	Altura da planta		Diâmetro de colmo		Média	
	----- cm -----		----- mm -----			
FC	66,00	86,12	76,06	20,05	22,21	21,13
Biológico 50%	56,12	77,12	66,62	19,49	20,98	20,23
Biológico 100%	51,37	81,50	66,44	17,84	20,48	19,16
Biológico 150%	56,62	84,25	70,44	19,47	22,03	20,75
Controle	77,12	85,12	81,12	20,26	21,65	20,95
Média	63,36 B	82,61 A		19,68 B	21,69 A	
		F		F		
Fertilizante		1,81 ^{ns}		1,95 ^{ns}		
Tempo		38,32 ^{***}		13,90 ^{***}		
Fert*Tempo		0,66 ^{ns}		0,90 ^{ns}		
CV (%)		17,04		10,42		

¹ Tratamentos: FC: fertilizante solúvel convencional (FC 100% Dose Recomendada - DR); Biológico 50%: Fertilizante biológico 50% DR (equivalente a 2,5 t ha⁻¹); Biológico 100%: Fertilizante biológico 100% DR (equivalente a 5 t ha⁻¹); Biológico 150%: Fertilizante biológico 150% DR (equivalente a 7,5 t ha⁻¹); Controle (20 t ha⁻¹ de torta de filtro). Letras maiúsculas iguais na coluna (Fertilizantes) e minúsculas na linha (Variedade) não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{ns} não significativo; *, **, *** significativos, respectivamente, nos níveis 5%, 1% e < 0,1%, de probabilidade

5.3.4 Produtividade e características tecnológicas (cana planta)

Por ser uma cultura destinada principalmente ao processamento industrial, é importante avaliar a qualidade das variáveis tecnológicas da cana-de-açúcar, cujos resultados são apresentados nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8. Produtividade de colmos (TCH), de Pol (TPH), sólidos solúveis e percentagem de sacarose aparente no caldo (Pol) de diferentes variedades de cana-de-açúcar submetidas a tratamentos de fertilização aos 480 dias após o plantio (DAP), no ciclo cana planta

Tratamentos ¹	RB 92579 RB 867515		RB 92579 RB 867515		RB 92579 RB 867515		RB 92579 RB 867515					
	TCH		TPH		Sólidos Solúveis		Pol					
	t ha ⁻¹				°Brix		%					
FC	66,82	66,36	66,59 ab	9,60	9,77	9,69	18,92	19,13	19,03 ab	16,55	16,87	16,71
Biológico 50%	61,82	63,18	62,50 b	8,87	9,19	9,03	19,14	19,04	19,09 ab	16,60	16,74	16,67
Biológico 100%	70,00	65,00	67,50 ab	10,12	9,13	9,63	19,23	19,02	19,13 a	16,71	16,44	16,57
Biológico 150%	72,73	71,36	72,04 a	10,14	10,58	10,36	19,10	19,36	19,23 a	16,56	17,30	16,93
Controle	58,18	60,00	59,09 b	8,28	8,29	8,28	18,36	18,05	18,21 ab	16,03	15,63	15,83
Média	66,82	66,53		9,43	9,34		18,64	18,88		16,23	16,69	
Fertilizante	F		F		F		F					
	4,01 ^{***}		1,42 ^{ns}		2,55 [*]		1,53 ^{ns}					
Tempo	0,04 ^{ns}		0,05 ^{ns}		1,41 ^{ns}		0,28 ^{ns}					
Fert*Tempo	0,52 ^{ns}		0,25 ^{ns}		1,08 ^{ns}		0,35 ^{ns}					
CV (%)	8,63		15,70		4,26		7,18					

¹ Tratamentos: FC: fertilizante solúvel convencional (FC 100% Dose Recomendada - DR); Biológico 50%: Fertilizante biológico 50% DR (equivalente a 2,5 t ha⁻¹); Biológico 100%: Fertilizante biológico 100% DR (equivalente a 5 t ha⁻¹); Biológico 150%: Fertilizante biológico 150% DR (equivalente a 7,5 t ha⁻¹); Controle (20 t ha⁻¹ de torta de filtro). Letras minúsculas iguais na coluna (Fertilizantes) e maiúsculas na linha (Variedade) não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{ns} não significativo; *, **, *** significativos, respectivamente, aos níveis de 5%, 1% e < 0,1%, de probabilidade

Tabela 9. Pol na cana (PC), pureza, fibra e açúcar total recuperável (ATR) no colmo de diferentes variedades de cana-de-açúcar submetidas a aplicação de tratamentos de fertilização aos 480 dias após o plantio (DAP), no ciclo cana planta

Tratamentos ¹	RB 92579	RB 867515	RB 92579	RB 867515	RB 92579	RB 867515	RB 92579	RB 867515				
	PC	Média	Pureza	Média	Fibra	Média	ATR	Média				
	----- % -----						----- kg t ⁻¹ -----					
FC	14,37	14,72	14,54	87,47	88,19	87,83	13,40	13,67	13,54	141,48	144,40	142,94
Biológico 50%	14,27	14,52	14,40	86,73	87,91	87,32	13,49	13,72	13,60	140,98	142,66	141,82
Biológico 100%	14,47	14,00	14,23	86,91	86,40	86,66	13,19	13,80	13,50	142,72	138,56	140,64
Biológico 150%	13,96	14,85	14,40	86,71	89,37	88,04	13,08	13,57	13,33	141,44	149,30	145,37
Controle	14,13	13,77	13,95	87,31	86,59	86,95	13,92	13,90	13,91	135,85	131,94	133,89
Média	14,08	14,04	86,98	86,79	13,28 B	13,76 A	139,05	138,71				
Fertilizante	F		F		F		F					
	0,68 ^{ns}		0,50 ^{ns}		0,75 ^{ns}		1,21 ^{ns}					
Tempo	0,01 ^{ns}		0,04 ^{ns}		10,41 ^{***}		0,01 ^{ns}					
Fert*Tempo	0,33 ^{ns}		0,60 ^{ns}		0,69 ^{ns}		0,38 ^{ns}					
CV (%)	11,20		4,54		4,41		8,94					

¹ Tratamentos: FC: fertilizante solúvel convencional (FC 100% Dose Recomendada - DR); Biológico 50%: Fertilizante biológico 50% DR (equivalente a 2,5 t ha⁻¹); Biológico 100%: Fertilizante biológico 100% DR (equivalente a 5 t ha⁻¹); Biológico 150%: Fertilizante biológico 150% DR (equivalente a 7,5 t ha⁻¹); Controle (20 t ha⁻¹ de torta de filtro). Letras minúsculas iguais na coluna (Fertilizantes) e maiúsculas na linha (Variedade) não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{ns} não significativo; *, **, *** significativos, respectivamente, aos níveis de 5%, 1% e < 0,1%, de probabilidade

A produtividade de colmos (TCH) e sólidos solúveis pelos genótipos de cana mostrou dependência dos tratamentos de fertilização, tendo o mesmo comportamento nas duas variáveis (Tabela 8). Para os efeitos do fertilizante, observar-se efeito significativo com relação a fontes e doses. O fertilizante biológico na dose 150% apresentou os maiores resultados na produtividade e no teor de sólidos solúveis, comparado com o fertilizante convencional e o controle, promovendo os melhores resultados (72,04 t ha⁻¹ e 19,23 °Brix), sendo superiores ao fertilizante convencional (69,59 t ha⁻¹ e 19,03 °Brix).

O fertilizante biológico na dose 150% apresentou diferença significativa no rendimento de cana, o que promoveu grande diferença, comparando com o tratamento controle (59,09 t ha⁻¹), sendo observado incremento no valor de TCH da ordem de 22%. Assim, os efeitos do fertilizante biológico foram evidentes no rendimento de cana-de-açúcar, com resposta positiva e significativa para os diferentes tratamentos de fertilização.

Os tratamentos de fertilização não influenciaram a produtividade de Pol (TPH) e o Pol das variedades RB92579 e RB867515 (Tabela 8). O TPH possui relação com a produtividade, sendo os fatores de crescimento e desenvolvimento determinantes na produção de açúcar. O TPH foi menor nos tratamentos de fertilizante solúvel convencional e no tratamento controle, comparados com o fertilizante biológico na dose 150%, entretanto mesmo não sendo significativo destaca-se porque produziu o maior resultado (10,36 t ha⁻¹).

O fertilizante biológico de uma maneira geral exibiu melhores parâmetros na planta, provavelmente devido aos efeitos da disponibilidade de nutrientes no solo (Tabelas 2, 3 e 4) que proporciona maior incremento de nutrientes (Tabela 6). O fertilizante biológico e o fertilizante solúvel convencional forneceram melhores resultados, comparando com o tratamento controle.

Os resultados para as variáveis PC, pureza, fibra e ATR, foram semelhantes independente da fertilização e da variedade, exceto a fibra, que apresentou diferença significativa entre as variedades (Tabela 9). Não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos para PC, pureza e ATR. Neste trabalho, para a variedade RB92579 os teores variaram de 13,06 a 14,70% para PC, de 84,27 a 88,41% para pureza e de 130,90 a 144,40% para ATR, para a variedade RB867515 os valores variaram de 13,15 a 14,85% para PC, de 84,13 a 89,37% para pureza e de 131,64 a 149,30% para ATR (Tabela 9).

Para o efeito do fertilizante biológico em cada variedade, observa-se que a variedade RB867515 reflete os melhores resultados nos tratamentos com fertilizante biológico, enquanto que a RB92579 apresenta os maiores valores de PC, pureza e ATR nos tratamentos com o fertilizante solúvel convencional, embora não significativo. O percentual de fibra entre os genótipos apresentou efeito significativo, e o menor percentual foi na variedade RB92579 com valor médio de 13,28% e o maior para a variedade RB867515 com valor médio de 13,76% (Tabela 9).

As condições climáticas adversas foram determinantes na produtividade no segundo ciclo, como observado nos parâmetros TCH e TPH (Tabela 10). Em confronto com os dados meteorológicos (Figura 4), na cana soca houve menor precipitação no início do ciclo prejudicando o desenvolvimento inicial da cultura.

Tabela 10. Produtividade de colmos (TCH) e de Pol (TPH) nas variedades de cana-de-açúcar submetidas a tratamentos de fertilização aos 360 dias após o plantio (DAP), no ciclo cana soca

Tratamentos ¹	RB 92579 RB 867515		RB 92579 RB 867515		Média	
	TCH	Média	TPH	Média		
----- t ha ⁻¹ -----						
FC	24,54	29,54	27,04 c	3,53	4,39	3,96 c
Biológico 50%	33,64	43,18	38,41 b	5,11	6,32	5,72 b
Biológico 100%	40,45	50,91	45,68 ab	6,11	7,48	6,80 ab
Biológico 150%	51,36	50,91	51,14 a	7,47	7,48	7,47 a
Controle	19,54	37,27	28,41 bc	2,88	5,56	4,22 bc
Média	30,91 B	37,50 A		4,63 B	5,50 A	
		F			F	
Fertilizante		18,69***			16,24***	
Tempo		17,32***			12,09***	
Fert*Tempo		1,96 ^{ns}			1,90 ^{ns}	
CV (%)		18,52			19,64	

¹ Tratamentos: FC: fertilizante solúvel convencional (FC 100% Dose Recomendada - DR); Biológico 50%: Fertilizante biológico 50% DR (equivalente a 2,5 t ha⁻¹); Biológico 100%: Fertilizante biológico 100% DR (equivalente a 5 t ha⁻¹); Biológico 150%: Fertilizante biológico 150% DR (equivalente a 7,5 t ha⁻¹); Controle (20 t ha⁻¹ de torta de filtro). Letras minúsculas iguais na coluna (Fertilizantes) e maiúsculas na linha (Variedade) não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{ns} não significativo; *, **, *** significativos, respectivamente, aos níveis de 5%, 1% e < 0,1%, de probabilidade

Contudo, para TCH e TPH observa-se que foram menores as perdas nos tratamentos com fertilizante biológico nas duas variedades. O fertilizante biológico na dose 150% apresentou os maiores resultados na produtividade de colmo (TCH) e de Pol (TPH), quando comparado com os tratamentos com o fertilizante

convencional e o controle, com os melhores resultados para as variedades RB867515 e RB92579 observados no fertilizante biológico 150% (51,00 t ha⁻¹ e 7,50 t ha⁻¹), enquanto que com o fertilizante convencional obteve-se 27,04 t ha⁻¹ e 3,96 t ha⁻¹.

5.4 Discussão

5.4.1 Atributos químicos do solo

O pH do solo apresentou efeitos significativos após a aplicação dos tratamentos de fertilização, havendo redução do pH quando aplicado o fertilizante biológico. Diferentes trabalhos mostraram os efeitos dos biofertilizantes de rocha com PK no pH do solo, sobretudo quando aplicados em altas doses. Efeitos do biofertilizante orgânico na redução do pH do solo, na cana-de-açúcar e na uva, foram observados por Stamford et al. (2006, 2009).

Oliveira et al. (2010), avaliando a eficácia agronômica de resíduos de mamona em atributos do solo, observaram redução linear no pH do solo, e de acordo com as doses de matéria orgânica houve variação no pH de 6,0 para 5,0. Os autores consideraram que os efeitos foram devido ao ácido sulfúrico, produzido pela bactéria oxidativa (*Acidithiobacillus*), e por este motivo o biofertilizante de rochas tem um pH baixo (3,0-3,5). Stamford et al. (2016, 2011), avaliando o efeito do biofertilizante de rochas com P e K, misturado com matéria orgânica, na produtividade da cana-de-açúcar e na uva, em duas safras consecutivas, apresentaram valores de pH do solo similares aos obtidos no presente trabalho, apesar de não haver efeito dos tratamentos de fertilização no pH do solo. Stamford et al. (2017), em trabalho comparando o fertilizante biológico com o fertilizante solúvel convencional e com composto de minhoca, no rendimento da banana e em atributos químicos do solo, verificaram variação no pH de 5,2 a 5,5.

Efeitos diferenciados foram obtidos por Oliveira et al. (2014) e por Berger et al. (2013) com aplicação de biofertilizante de rochas em mistura com matéria orgânica em melão e em caupi, respectivamente. Os autores concluíram que o efeito no aumento da acidez do solo pode ser explicado pelo uso de grande quantidade de matéria orgânica para a produção dos fertilizantes biológicos.

O fertilizante biológico aplicado na cana-de-açúcar promoveu efeitos positivos, especialmente quando aplicadas doses mais elevadas, o que resultou em quantidades significativas de P e K disponíveis no solo, após a colheita da cana-de-açúcar. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Oliveira et al. (2014; 2017), Stamford et al. (2016) em melão e cana-de-açúcar, respectivamente, e sugerem que a bactéria oxidativa *A. thiooxidans* misturada com o húmus de minhoca pode ser alternativa viável de liberação de nutrientes das rochas com P e K, fornecendo P e K disponíveis no solo.

O uso de microrganismos é importante para a agricultura sustentável, pois proporcionam aumento na disponibilidade e absorção de nutrientes, reduzindo a dependência da aplicação de fertilizantes solúveis convencionais (BANERJEE; BAREH; JOSHI, 2017; HASSAN et al., 2015).

Estes resultados concordam com Stamford et al. (2014) na uva, e mostraram efeito significativo da aplicação de biofertilizante misto e de fertilizante biológico com quitosana devido a inoculação com *C. elegans*, no P disponível no solo, no Vale do São Francisco cultivado com uva (*Vitis labrusca*). Oliveira et al. (2010) avaliando níveis crescentes de fertilizante orgânico na presença de fertilizante solúvel, verificaram incremento no P disponível no solo durante o crescimento do melão, e consideraram que o efeito observado pode ser devido ao aumento da quantidade de matéria orgânica na solubilização de nutrientes, que promove equilíbrio entre K e Ca e resulta em aumento na disponibilidade de fósforo.

O efeito do fertilizante biológico no P disponível no solo também pode ser atribuído a outras bactérias nativas existentes no solo, além do *Acidithiobacillus* inoculado. O efeito pode estar associado a fungos que produzem fosfatases e quitosana (FRANCO et al., 2011), que podem participar na solubilização de P e de outros nutrientes em minerais do solo e nas rochas fosfatada e potássica. Kowalski et al. (2006) e Goy et al. (2009) propuseram que a quitosana incrementa o teor de N, P e K.

O potássio disponível no solo aumenta quando os fertilizantes convencionais solúveis são aplicados, da mesma forma descrita para fósforo, provavelmente devido à maior concentração de K solúvel no fertilizante convencional. Os resultados com o fertilizante biológico demonstram que o aumento ocorre em função e ao longo do tempo de cultivo, quando aplicado na maior dose.

Em solos da região do planalto costeiro do estado de Pernambuco, cultivados com cana-de-açúcar, Oliveira et al. (2017) e Stamford et al. (2016) observaram aumento no K disponível no solo com cana-de-açúcar quando aplicado biofertilizante de rocha potássica mais enxofre inoculado com *Acidithiobacillus*, como relatado no presente trabalho. Resultados semelhantes foram relatados por Oliveira et al. (2014) no cultivo do melão, ao aplicar biofertilizantes de rocha com P e K em mistura com húmus de minhoca, e também por Stamford et al. (2017) no cultivo da banana na Estação Experimental de Cana-de-açúcar do Carpina, região da zona da mata pernambucana. Os resultados confirmam que *A. thiooxidans* é importante para liberar K disponível proveniente das rochas.

O efeito sobre o Ca^{2+} trocável foi maior e evidente, principalmente quando aplicado o fertilizante biológico a (150% da dose recomendada). O fertilizante mineral solúvel (FNPK) e o tratamento controle apresentaram menores efeitos, e o Ca^{2+} trocável no solo aumentou consideravelmente em comparação com os valores da análise antes do início do experimento. O efeito da fertilização prévia foi provavelmente devido à solubilização de Ca^{2+} contido na rocha fosfática usada na produção do fertilizante biológico.

Os resultados obtidos são similares aos encontrados por Stamford et al. (2017) em um solo da zona da mata do estado de Pernambuco, Brasil, cultivado com banana, que encontraram maiores valores de Ca^{2+} trocável quando aplicado o biofertilizante de rocha com PK e o fertilizante biológico. Oliveira et al. (2014) e Stamford et al. (2014) também observaram aumento de Ca^{2+} trocável no solo, quando aplicado fertilizante biológico em melão e uva (*Vitis labrusca*), em solo do Vale do São Francisco.

Apesar de o efeito dos tratamentos de fertilização não terem sido estatisticamente significativos, observa-se que o Mg^{2+} trocável mostrou considerável aumento em relação ao teor de Mg^{2+} trocável antes da aplicação dos fertilizantes. Oliveira et al. (2014) também encontraram efeito similar ao do presente trabalho, quando aplicados fertilizantes biológicos no cultivo de melão em solo da região semiárida. Stamford et al. (2017) mostraram efeito significativo na disponibilidade de Mg^{2+} trocável quando aplicados fertilizantes biológicos em solo da zona da mata Pernambuco, cultivado com banana. Os autores também mostraram quantidade elevada de Mg^{2+} trocável no solo quando aplicados biofertilizantes de rochas com P e K.

A obtenção de valores de Ca^{2+} e Mg^{2+} trocável no solo mais elevados quando utilizados fertilizantes biológicos produzidos a partir de rochas com P e K podem ser explicados pela solubilização de nutrientes contidos nas rochas (Apatita e Relinktum) que foram usadas para produzir os biofertilizantes de rochas (BP e BK), solubilizados pela bactéria oxidativa. O aumento foi provavelmente promovido pelo efeito do ácido sulfúrico biológico metabolizado pelo *Acidithiobacillus* na presença de enxofre elementar. Os resultados mostram o efeito das bactérias oxidativas do enxofre *Acidithiobacillus* na solubilização de minerais contidos nas rochas com P e K, como descrito por Stamford et al. (2011) e El-Tarabily et al. (2006).

5.4.4 Avaliação nutricional (cana planta)

Oliveira et al. (2017), avaliando a atuação do fertilizante biológico produzido com torta de filtro, mostraram resultados semelhantes ao obtido no presente trabalho, para absorção de N total nas folhas da cana-de-açúcar. Os autores relataram que o fertilizante biológico com torta de filtro aumenta o teor de N total, mais do que a aplicação de fertilizante solúvel aplicado na mesma dose. Oliveira et al. (2016), na cultura do melão encontraram efeitos positivos e significativos do fertilizante biológico produzido a partir de rochas fosfatadas e potássicas, em comparação com o fertilizante convencional, com incremento significativo no N total na parte aérea. Os autores sugerem que a matéria orgânica aumenta a absorção de nutrientes e promove efeitos significativos na absorção do N total.

Borges et al. (2015) também encontraram maior concentração de N nas folhas de cana-de-açúcar, nos tratamentos com baixa dose de matéria orgânica, possivelmente devido ao efeito da concentração. Silva Júnior et al. (2018), avaliando biofertilizante aplicado em diferentes profundidades na cultura da uva, verificaram maior concentração de N total quando aplicado em maior dose (150%). Também mostraram diferença significativa quando comparado com o tratamento controle e com aplicação de fertilizante convencional solúvel (na dose recomendada). Os autores descreveram os efeitos positivos do fertilizante biológico produzido com composto de minhoca, enriquecido em N pela adição de bactérias diazotróficas de vida livre, que pelo efeito na fixação do N justifica o aumento no N total.

Para o P total na folha de cana os maiores valores foram observados quando aplicados os tratamentos com fertilizante biológico (150%) e o fertilizante convencional solúvel. Os resultados estão de acordo com os de Oliveira et al.

(2017), que observaram aumento na absorção P quando aplicado biofertilizante com torta de filtro, que proporcionou o maior acúmulo de P total nas folhas da cana-de-açúcar em solo de tabuleiro da Zona da Mata do estado de Pernambuco. O aumento na absorção de P total pode ser explicado pela presença do fungo *C. elegans*, utilizado na produção do fertilizante biológico, que promove aumento na solubilidade de P produzindo fosfatos inorgânicos (FRANCO et al., 2011).

Stamford et al. (2008), também encontraram efeitos significativos do biofertilizante de rocha com enxofre inoculado com *Acidithiobacillus* na absorção de P na cana-de-açúcar em um experimento em casa de vegetação. Efeitos significativos da aplicação de torta de filtro no P total na parte aérea também foram relatados por Caione et al. (2015). Silva Júnior et al. (2018) não observaram efeito significativo da fertilização, contudo os maiores valores foram obtidos nas lâminas foliares das plantas fertilizadas com fertilizante biológico aplicado na maior dose (150%), e os menores valores com aplicação do fertilizante convencional (dose recomendada) e no tratamento controle. Andrade et al. (2013) descreveram resultados semelhantes com feijão caupi em casa de vegetação e em experimentos de campo, porém, os autores observaram um efeito positivo pela inoculação com fungos micorrízicos arbusculares.

A eficácia do fertilizante biológico na absorção de K em comparação com o fertilizante convencional solúvel na cana-de-açúcar, cultivada em solo do tabuleiro costeiro brasileiro, foi demonstrada por Oliveira et al. (2017). Em trabalhos com melão (Oliveira et al., 2016) no semiárido brasileiro e em banana por Stamford et al. (2017) em solo da Zona da Mata de Pernambuco, foram obtidos resultados similares em comparação com a aplicação de fertilizante convencional solúvel. Stamford et al. (2011) também relataram a eficácia do fertilizante biológico produzido com rochas fosfatada e potássica em mistura com húmus de minhoca, na uva (*Vitis vinifera*) cultivada em solo da região semiárida do vale do São Francisco. Silva Júnior et al. (2018) observaram efeitos variáveis na absorção de K em folhas de uva (*Vitis labrusca* - cv. Isabel) em um solo alcalino da região semiárida do Vale do São Francisco, e o fertilizante biológico aplicado na maior dose (150%) apresentou resultados semelhantes ao da aplicação de fertilizante convencional. Santana et al. (2014) descreveram aumento na disponibilidade de P e K no solo e em plantas de pimentão usando fertilizante de rochas PK em mistura com húmus de minhoca.

O efeito positivo do fertilizante biológico, provavelmente é devido ao incremento da disponibilidade de P e K contidos nas rochas (fosfatada e potássica), através da aplicação da bactéria *Acidithiobacillus* com enxofre elementar.

Em relação ao Ca absorvido pela planta, Silva Júnior et al. (2018) realizando trabalho com biofertilizante de rocha aplicado em duas profundidades na cultura da uva em solo do vale do São Francisco, observaram que não houve efeito no teor de Ca total nas folhas quando aplicado tratamentos com fertilizantes orgânicos, mas observaram diferença significativa quando o fertilizante foi aplicado na dose 200%, comparando com o tratamento controle.

O fertilizante biológico apresentou o melhor resultado para Ca^{+2} ($31,55 \text{ mg kg}^{-1}$) e o controle os menores valores ($18,97 \text{ mg kg}^{-1}$). O aumento na absorção de Ca foi provavelmente devido ao aumento na disponibilidade de Ca proporcionado pelo ácido sulfúrico produzido pela bactéria oxidativa *A. thiooxidans* inoculada no enxofre elementar na produção do biofertilizante de rochas com P e K. Este comportamento também foi relatado por Oliveira et al. (2017) avaliando a eficácia do biofertilizante de rocha PK, com e sem adição de torta de filtro, na cultura da cana-de-açúcar e por Stamford et al. (2011) com aplicação do mesmo biofertilizante em uva na região do vale do São Francisco. Almeida Júnior et al. (2011) observaram a eficácia do biofertilizante com torta de filtro, e relataram maiores quantidades de Ca trocável no solo.

Aumento na absorção de Mg em folhas de cana-de-açúcar em condições de casa de vegetação foi descrito por Stamford et al. (2006) em solo costeiro da Zona da Mata de Pernambuco, com aplicação de biofertilizante de rocha fosfatada e potássica em mistura com húmus de minhoca. Resultados semelhantes foram obtidos por Stamford et al. (2011) em uva (*Vitis vinifera*) em solo da região semiárida do vale do São Francisco.

Oliveira et al. (2016) também encontraram maiores quantidades de Mg^{+2} em melão quando o biofertilizante de rochas com P e K mais enxofre elementar inoculado com *A. thiooxidans* em comparação com o fertilizante convencional solúvel. Resultados similares foram descritos por Oliveira et al. (2017), quando aplicado fertilizante biológico na dose recomendada, e mostraram efeitos interativos com torta de filtro. Nas folhas, o tratamento com torta de filtro apresentou resultados mais elevados, quando aplicado na dose 150%. Os autores sugerem que a

tendência para o aumento dos valores de Mg nas diferentes partes da cana-de-açúcar é observada quando o fertilizante biológico é aplicado com torta de filtro.

5.4.5 Biometria

Os efeitos dos tratamentos indicaram que o fertilizante biológico apresentou resultados similares no tamanho e diâmetro de colmo da cana-de-açúcar em comparação com o fertilizante convencional solúvel. Os resultados obtidos estão de acordo com Oliveira et al. (2015) que relataram efeitos significativos pela aplicação de resíduos de cana-de-açúcar em conjunto com biofertilizante de rochas com P e K.

Os dados do presente estudo, mostram que as plantas que receberam o tratamento com biofertilizante de rochas foram mais elevados em comparação ao tratamento com fertilizante convencional solúvel em todas as doses aplicadas. Os resultados obtidos confirmaram o aumento na altura das plantas de cana-de-açúcar em condições de campo.

A eficácia dos biofertilizantes de rocha PK inoculados com bactérias oxidativas *Acidithiobacillus* relatados por Stamford et al. (2008), demonstraram efeitos positivos e significativos dos biofertilizantes na cana-de-açúcar cultivada na região da Zona de Pernambuco, especialmente quando aplicados em mistura com o húmus de minhoca. Características inerentes da produção conferem ao fertilizante biológico liberação controlada dos nutrientes, com possibilidade de redução de lixiviação, permanecendo à disposição do sistema radicular por um maior período de tempo (KOMINKO et al., 2017). Esses resultados demonstram o potencial do fertilizante biológico na cana-de-açúcar, conforme descrito por Stamford et al. (2016) para cana-de-açúcar em experimento em campo.

Caione et al. (2011) demonstraram a eficácia da aplicação de torta de filtro, aumentando especialmente a disponibilidade de fósforo. Pela aplicação de fósforo observou-se efeito significativo no diâmetro de colmo da cana. Solos de boa condição de fertilidade natural tem maior poder tampão, tolerando alterações ou esgotamento dos nutrientes no solo (DOAN et al., 2015). Portanto, as ofertas de nutrientes para as plantas são maiores e constantes, promovendo melhor desenvolvimento (YAN et al., 2016).

5.4.6 Produtividade e avaliação tecnológica

Os valores de TCH encontrados foram similares aos obtidos por Stamford et al. (2016). Segundo os autores, no ciclo da cana planta em cultivo de sequeiro, como neste trabalho, a produtividade da RB92579 situou-se em torno de 75 t ha⁻¹. A eficácia dos biofertilizantes de rocha PK em mistura com torta de filtro é evidente, sendo os melhores resultados obtidos quando aplicados em doses mais elevadas.

Oliveira et al. (2015) relataram efeito positivo do biofertilizante de rochas aplicado na dose 150% que proporcionou os melhores resultados, sendo superior ao fertilizante convencional, com rendimento de cana diferente (86 e 57 t ha⁻¹), com e sem aplicação de torta de filtro, respectivamente. Estes resultados confirmam o efeito positivo do fertilizante organomineral sobre o rendimento das culturas.

Os valores de TCH encontrados neste trabalho concordam com Santos et al. (2010), que encontraram correlação entre o rendimento da cana-de-açúcar e a aplicação de fertilizantes. Os autores verificaram que a matéria orgânica promoveu maior rendimento na cana-de-açúcar, provavelmente porque liberou nutrientes necessários à nutrição das plantas. Santos et al. (2011), estudando a qualidade tecnológica da cana-de-açúcar com aplicação de torta de filtro enriquecida com fosfato solúvel, verificaram ganho de produtividade de açúcar com aumento das doses.

Os valores de TCH encontrados no presente estudo variaram de 59 a 72 t ha⁻¹, sendo o maior valor obtido nos tratamentos com fertilizante biológico na dose 150%, mais abaixo da média nacional para a safra 2016/2017. Entretanto, a produtividade de colmo apresentada pelas variedades de cana-de-açúcar usadas no trabalho, ainda que baixas, foram maiores que a média de alguns Estados do Nordeste (CONAB, 2018).

Stamford et al. (2016) reportaram efeitos dos tratamentos para a produção de Pol (TPH), que foram consideráveis para o biofertilizante de rocha com P e K e para aplicação do fertilizante convencional, especialmente quando aplicado em doses mais elevadas. Apesar dos valores do presente trabalho não apresentarem efeito significativo dos tratamentos de fertilização, foram semelhantes aos obtidos por Stamford et al. (2016) e estão de acordo com Santos et al. (2010), que também usaram solos com baixos níveis de nutrientes.

Os valores de TCH e TPH encontrados na cana soca (2^o cultivo), foram baixos quando comparados com os observados por Stamford et al. (2016). Segundo

os autores, a produtividade da RB92579, em cultivo de sequeiro, situa-se em torno de 80 t ha⁻¹. A reduzida produtividade por ambas as variedades, atribuiu-se a baixa qualidade das gemas utilizadas no plantio e a menor precipitação no final do ciclo da cana planta, o qual foi benéfico favorecendo a maturação das plantas.

Abreu et al. (2013) avaliando as interações entre variáveis meteorológicas e os componentes de produção e produtividade de seis variedades de cana-de-açúcar nos Tabuleiros Costeiros de Alagoas, observaram que na cana soca as TCHs foram menores, devido ao maior déficit hídrico, o que refletiu em menor produtividade média. Os autores relataram que a deficiência hídrica, ocorreram em até 80 dias antes da colheita do primeiro cultivo, prejudicando a brotação da soqueira, situação agravada ainda mais pelo restante do estresse ocorrido nos 130 dias iniciais do desenvolvimento da cultura.

Os valores de sólidos solúveis (°Brix) e de Pol neste trabalho foram similares aos obtidos por Oliveira et al. (2011) ao avaliarem a produtividade, eficiência de uso da água e qualidade tecnológica de cana-de-açúcar submetida a diferentes regimes hídricos. Segundo os autores, para as variedades RB867515 e RB92579 os valores médios de sólidos solúveis foi de 21,3%, enquanto que o de Pol foi de 18,5%.

Oliveira et al. (2015), avaliando a eficiência do biofertilizante de rocha com matéria orgânica, verificaram efeito positivo e significativo do Brix e Pol que apresentaram os maiores valores em tratamentos com adição de torta de filtro de cana-de-açúcar. Santos et al. (2010), estudaram a influência da adubação com torta de filtro enriquecida com fosfato solúvel na cana-de-açúcar e obtiveram valores excessivos de Brix e TCH quando aplicadas maiores taxas de fósforo (STAMFORD et al., 2016). Teixeira et al. (2016), estudando as características tecnológicas do caldo de variedades de cana-de-açúcar cultivadas em solo de cerrado com diferentes níveis de adubação fosfatada, verificaram maior Pol% caldo na maior dose de fertilizante fosfatado (300 kg ha⁻¹ de P₂O₅). Esse efeito pode ser observado (Tabela 2, 3 e 4), com aumento na produtividade de colmos, de Pol e os sólidos solúveis na cana planta.

A pureza do caldo da cana-de-açúcar nas variedades RB92579 e RB867515 não mostraram efeito significativo dos tratamentos, no entanto, esses valores não foram inferiores ao do CONSECANA (2006). De acordo com essas normas de qualidade, as unidades industriais podem recusar o carregamento da cana quando a pureza for < 75%. Oliveira et al. (2014) avaliando a qualidade do caldo em três

variedades de cana-de-açúcar, obtiveram valores similares. Também para Oliveira et al. (2014) o menor valor foi para a RB92579 com valor médio de 13,28%, seguido da RB867515 com 13,76%. Os teores de fibra encontram-se acima dos níveis ideais estabelecidos por Fernandes (2003), que devem variar de 10 a 11% para adequada industrialização.

Oliveira et al. (2015), descreveram efeitos significativos do fertilizante biológico na dose de 150% do recomendado para ATR, que foram superiores às diferentes fontes e doses de outros tratamentos de fertilização, com e sem aplicação de torta de filtro. Os valores de ATR foram similares aos encontrados por Oliveira et al. (2011), onde a variedade RB867515 e RB92579 apresentaram valores de ATR de 151 e 147 kg t⁻¹.

5.5 Conclusões

O fertilizante biológico na maior dose (150%) promoveu incremento na disponibilidade de nutrientes no solo, especialmente de P e K disponíveis e Ca e Mg trocáveis, tanto na camada superficial quanto na subsuperficial, nos dois ciclos da cana-de-açúcar;

Os resultados indicam que o fertilizante biológico apresentou efeitos significativos na absorção dos nutrientes nas variedades de cana-de-açúcar RB92579 e RB867515;

O fertilizante biológico na dose 7,5 t ha⁻¹ apresentou efeito significativo no rendimento da cana e nos sólidos solúveis, além de mostrar efeito positivo em variáveis tecnológicas do caldo e do colmo, como pureza, pol, ATR e PC;

O fertilizante biológico na maior dose (150%) influenciou os parâmetros das plantas e as características técnicas das safras de cana-de-açúcar, e mostrou os melhores resultados na produtividade da cana-de-açúcar em comparação com o fertilizante comercial e o controle, nos dois ciclos da cultura;

O fertilizante biológico produzido a partir da rocha PK inoculada com *Acidithiobacillus* em mistura com matéria orgânica, enriquecida em N por inoculação com bactérias diazotróficas e com quitosana fúngica, pode ser usado para aumentar a produção da cana-de-açúcar e alguns parâmetros tecnológicos e da planta, além de promover efeito residual, mostrando potencial para produção agrícola sustentável da cana-de-açúcar.

Referências

- ABREU, M. L.; SILVA, M. A.; TEODORO, I.; HOLANDA, L. A.; SAMPAIO NETO, G. D. Crescimento e produtividade de cana-de-açúcar em função da disponibilidade hídrica dos Tabuleiros Costeiros de Alagoas. **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 3, p.262-270, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/brag.2013.028>>.
- ALMEIDA JÚNIOR, A. B.; NASCIMENTO, C. W. A.; SOBRAL, M. F.; SILVA, F. B. V.; 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**, Campina Grande, v. 15, p. 1004-1013, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662011001000003>>.
- ANDRADE, M. M. M.; STAMFORD, N. P.; FREITAS, A. D. S.; SANTOS, C. E. R. S.; SOUSA, C. A.; LIRA JÚNIOR, M. A. Effects of biofertilizer with diazotrophic bacteria and mycorrhizal fungi on the soil attribute cowpea nodulation, yield and nutrient uptake in field conditions. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 162, p. 374-379, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.08.019>>.
- ARAÚJO FILHO, J. C.; BURGOS, N.; LOPES, O. F.; SILVA, F. H. B. B.; MEDEIROS, L. A. R.; MELO FILHO, H. F. R.; PARAHYBA, R. B. V.; CAVALCANTI, A. C.; OLIVEIRA NETO, M. B.; SILVA, F. B. R.; LEITE, A. P.; SANTOS, J. C. P.; SOUSA NETO, N. C.; SILVA, A. B.; LUZ, L. R. Q. P.; LIMA, P. C.; REIS, R. M. G.; BARROS, A. H. C. **Levantamento de reconhecimento de baixa e média intensidade dos solos do estado de Pernambuco**. Boletim de Pesquisa Embrapa Solos, Rio de Janeiro, n.11, 2000.
- ASSUNÇÃO, A.; SANTOS, L. D. C.; ROCHA, M. R.; REIS, A. J. D. S.; TEIXEIRA, R. A.; LIMA, F. S. O. Efeito de Indutores de Resistência sobre *Meloidogyne incognita* em Cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 34, n. 1, p. 56-62, 2010.
- BANERJEE, A.; BAREH, D. A.; JOSHI, S.R. Native microorganisms as potent bioinoculants for plant growth promotion in shifting agriculture (Jhum) systems. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 17, n. 1, p. 127-140, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162017005000010>>.
- BAREA, J. M. Future challenges and perspectives for applying microbial biotechnology in sustainable agriculture based on a better understanding of plant-microbiome interactions. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 15, n. 2, p. 261-282, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162015005000021>>.
- BERGER, L. R. R.; STAMFORD, N. P.; WILADINO, 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 crustacean chitosan and by biomass and chitosan obtained from *Cunninghamella elegans*. **Biological Control**, Amsterdam, v. 92, p. 45-54, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.09.006>>.

BERGER, L. R. R.; STAMFORD, N. P.; 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**, Temuco, v.13, n. 3, p. 592-603, 2013. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162013005000047>>.

BORGES, L. A. B.; MADARI, B. E.; LEANDRO, W. M.; FERNANDES, P. M.; SILVA, E. A.; SILVA, M. R.; SILVA, M. A. S. Nutritional State and Productivity of Organic Sugarcane in Goias, Brazil. **Juornal of Agronomy**, Dubai, v. 14, n. 1, p. 6-14, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3923/ja.2015.6.14>>.

CAIONE, G.; PRADO, R. M.; CAMPOS, C. N. S.; MODA, L. R.; VASCONCELOS, R. L.; PIZAURO JÚNIOR, J. M. Response of Sugarcane in a Red Ultisol to Phosphorus Rates, Phosphorus Sources, and Filter Cake. **The Scientific World Journal**, London, v. 2015, p. 1-10, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2015/405970>>.

CAIONE, G.; TEIXEIRA, M. T. R.; LANGE, A.; SILVA, A. F.; FERNANDES, E. F. M. Modos de aplicação e doses de fósforo em cana-deaçúcar forrageira cultivada em latossolo vermelho-amarelo. **Revista de Ciências Agroambientais**, Alta Floresta, v.9, n. 1, p.1- 11, 2011.

CASTRO, L.; FLORES, L.; URIBE, L. Efecto del vermicompost y quitina sobre el control de *Meloidogyne incognita* en tomate a nivel de invernadero. **Agronomía Costarricense**, San Pedro de Montes de Oca, v. 35, n. 2, p. 21-32, 2011.

CHAPOLA, R. G.; CRUZ, J. A.; NUNES, I. K.; FERNANDES JÚNIOR, A. R. **Censo varietal 2012**. Araras, Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético. UFSCAR, 2013. p. 55.

CHAVES, A.; PEDROSA, E. M. R.; WILADINO, L. G.; CARDOSO, M. S. O. Activation of resistance to *Meloidogyne incognita* in sugarcane treated with pyraclostrobin. **Nematoda**, Piracicaba, v.3, n.1, p. 1-7. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4322/nematoda.00516>>.

CHAVES, A.; MARANHÃO, R. V. L.; PEDROSA, E. M. R.; GUIMARÃES, L. M. P.; OLIVEIRA, M. K. R. Incidência de *Meloidogyne spp.* e *Pratylenchus sp.* em cana-deaçúcar no Estado de Pernambuco, Brasil. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.33, n. 4, p. 278-280, 2009.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; ABREU, H. M. C.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J. C.; BURNQUIST, W. L.; CRESTE, S.; ULIAN, E. C. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical plant biology**, Bethesda, v. 4, p. 62-89, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12042-011-9068-3>>.

CHEN, J.; AN, Y.; KUMAR, A.; LIU, Z. Improvement of chitinase Pachi with nematicidal activities by random mutagenesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, Colorado, v. 96, p. 171-176, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.093>>.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, safra 2017/2018**, quarto levantamento, abril/2018. Brasília, CONAB, 2018. v. 4, n. 4, 73 p. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 10 ago. 2018.

CONSECANA - Conselho de Produtores de cana-de-açúcar, açúcar e álcool do Estado de São Paulo. **Manual de Instruções**. 5a ed., Piracicaba. 2006. p. 112.

CPRM- Serviço geográfico do Brasil. **Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea do estado de Pernambuco**: Diagnóstico do município de Igarassu. Recife. 2005. p.22.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; FRACASSO, J. V.; COSTA, V. P. Influência da época de aplicação de nematicidas em soqueiras colhidas em início de safra sobre as populações de nematoides e a produtividade da cana-de-açúcar. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 34, n. 2, p. 106-117, 2010.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; PIVETTA, J. P.; FRACASSO, J. V. Influência da época de aplicação de nematicidas em soqueiras sobre as populações de nematoides e a produtividade da cana-de-açúcar. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 1, p.179-190, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052008000100022>>.

DOAN, T. T.; HENRY-DES-TUREAUX, T.; RUMPEL, C.; JANEAU, J.; JOUQUET, P. Impact of compost, vermicompost and biochar on soil fertility, maize yield and soil erosion in Northern Vietnam: A three year mesocosm experiment. **Science of the total environment**, Amsterdam, v. 514, p. 147-154, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.005>>.

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**, Amsterdam, v. 99, n. 10, p. 4164-4168, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.079>>.

EL-TARABILY, K. A.; SOAUD, A. A.; SALEH, M. E.; MATSUMOTO, S. Isolation and characterization of sulfur bacteria, including strains of Rhizobium from calcareous soils and their effects on nutrient uptake and growth of maize (*Zea mays* L.). **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 57, n. 1, p. 101-111, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1071/AR04237>>.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de Análises Químicas de Solo, Plantas e Fertilizantes**. 2ª ed., Brasília: Embrapa - Informações Tecnológicas, 2009. p. 627.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed., Rio de Janeiro: Embrapa, 1997. p. 212.

FERNANDES, A.C. **Cálculos na agroindústria da cana-de-açúcar**. 2.ed. Piracicaba: STAB, 2003. p. 240.

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**, São Paulo, v. 54, p. 70-78, 2011.

GOY, R. C.; BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 19, n. 3, p. 241-247, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282009000300013>>.

HASSAN, W.; HUSSAIN, M.; BASHIR, S.; SHAH, A. N.; BANO, R.; DAVID, J. ACC-deaminase and/or nitrogen fixing rhizobacteria and growth of wheat (*Triticum Aestivum* L.). **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 15, n. 1, p. 232-248, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162015005000019>>.

IPA - Instituto Pernambucano de Pesquisa Agropecuária. **Recomendações de adubação para o Estado de Pernambuco: 2ª aproximação**. 3 eds. revisado/coordenado por Francisco José de Albuquerque Cavalcanti. Recife: Instituto Agrônômico de Pernambuco – IPA. 2008. p. 212.

KOMINKO, H.; GORAZDA, K.; WZOREK, Z. The Possibility of Organo-mineral fertilizer production from sewage sludge. **Waste and Biomass Valorization**, Dordrecht, v. 8, n. 37, p. 1-11, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12649-016-9805-9>>.

KOWALSKI, B.; TERRY, F. J.; HERRERA, L.; PEÑALVER, D. S. Application of soluble chitosan in vitro and in the greenhouse to increase yield and seed quality of potato minitubers. **Potato Research**, Dordrecht, v. 49, p. 167-176, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11540-006-9015-0>>.

LIANG, B.; ZHAO, W.; YANG, X.; ZHOU, J. Fate of nitrogen-15 as influenced by soil and nutrient management history in a 19-year wheat–maize experiment. **Field Crops Research**, California, v. 144, p. 126-134, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fcr.2012.12.007>>.

LIMA NETO, J. F.; DUTRA FILHO, J. A.; SIMÕES NETO, D. E.; SILVA, A. E. P.; SILVA L. J.; FERREIRA, G. E. Avaliação agroindustrial e parâmetros genéticos de clones UFRPE de cana-de-açúcar no litoral norte de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, Recife, v. 18, n. 1, p. 8–13, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.12661/pap.2013.003>>.

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 Journal of Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 27, 1769-1775, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-010-0357-z>>.

MEENA, V. S.; MAURYA, B. R.; VERMAC, J. P.; AEROND, A.; KUMARA, A.; KIM, K.; BAJPAIF, V. K. Potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): isolation, identification, and K-release dynamics from waste mica. **Ecological Engineering**, Prague, v. 81, p. 340-347, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.04.065>>.

MELO, T. A.; SERRA, I. M. R. S.; SILVA, G. S.; SOUSA, R. M. S. Produtos naturais aplicados para manejo de *Meloidogyne incognita* em tomateiros. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.38, n.3, p.223-227, 2012.

MERCER, C.; GREENWOOD, D.; GRANT, J. Effect of plant and microbial chitinases on the eggs and juveniles of *Meloidogyne hapla* Chitwood (Nematoda: Tylenchida). **Nematologica**, Boston, v. 38, n. 1-4, p. 227–236, 1992. Disponível em: <<https://doi.org/10.1163/187529292X00199>>.

NOVARETTI, W. R. T.; REIS, A. M. Influência do método de aplicação de nematicidas no controle de *Pratylenchus zaeae* em soqueiras de cana-de-açúcar e definição dos níveis de dano e de controle. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 33, n. 1, p. 83–89. 2009.

OLIVEIRA, A. E.; SÁ, J. R.; MEDEIROS, J. F.; NOGUEIRA, N. W.; SILVA, K. J. Interação da adubação organo-mineral no estado nutricional das plantas. **Revista Verde**, Pombal, v. 5, p. 53-58, 2010.

OLIVEIRA, E. C. A.; FREITAS, F. J.; OLIVEIRA, A. C.; SIMÕES NETO, D. E.; ROCHA, T.; CARVALHO, L. A. Produtividade, eficiência de uso da água e qualidade tecnológica de cana-de-açúcar submetida a diferentes regimes hídricos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 6, p. 617–625, 2011.

OLIVEIRA, F. L. N.; OLIVEIRA, W. S.; STAMFORD, N. P.; SILVA, E. V. N.; SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S. Effectiveness of biofertilizer enriched in N by *Beijerinckia indica* on sugarcane grown on an Ultisol and the interactive effects between biofertilizer and sugarcane filter cake. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 17, n. 4, p. 1040-1057, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162017000400015>>.

OLIVEIRA, F. L. N.; STAMFORD, N. P.; SIMOES NETO, D. E.; OLIVEIRA, E. C. A.; OLIVEIRA, W. J.; SANTOS, C. E. R. E. 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**, Brisbane, v. 9, n. 6, p. 504-508, 2015.

OLIVEIRA, W. S.; STAMFORD, N. P.; SILVA, E. V. N.; SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; SILVA, M. V. The impact of biofertilizers with diazotrophic bacteria and fungi chitosan on melon characteristics and nutrient uptake as an alternative for conventional fertilizers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 209, 236–240, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.09.041>>.

OLIVEIRA, W. S.; STAMFORD, N. P.; SILVA, E. V. N.; SANTOS, C. E. R. S.; 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**, Brisbane, v 8, n. 7, p. 1124-1131, 2014.

RADWAN, M. A.; FARRAG, S. A. A.; ABU-ELAMAYEM, M. M.; AHMED, N. S. Extraction, characterization, and nematicidal activity of chitin and chitosan derived from shrimp shell wastes. **Biology and Fertility of Soils**, Florence, v. 48, n. 4, p. 463-468, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00374-011-0632-7>>.

SANTANA, R.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S.; SILVA JUNIOR, S.; FREITAS, A. D. S.; ARNAUD, T. M. S. Influence of bioprotector produced by interspecific microbial inoculation on green pepper characteristics and nutrient uptake. **Global Journal Science Frontier Reseach**, Massachusetts, v. 14, n. 1, p. 7-14, 2014.

SANTOS, D. H.; SILVA, M. A.; TIRITAN, C. S.; FOLONI, J. S. S.; ECHER, F. R. Qualidade tecnológica da cana-de-açúcar sob adubação com torta de filtro enriquecida com fosfato solúvel. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.15, n.5, p.443-449, 2011.

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

SAS INSTITUTE. The SAS 9.2 software. System for Windows. CD – ROM for Windows. 2011.

SILVA, S. F.; OLIVARES, F. L.; CANELLAS, L. P. The biostimulant manufactured using diazotrophic endophytic bacteria and humates is effective to increase sugarcane yield. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, Portici, v. 4, n. 24, 1-6, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40538-017-0106-8>>.

SILVA JÚNIOR, S.; STAMFORD, N. P.; OLIVEIRA, W. S.; SILVA, E. V. N.; SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; SILVA, V. S. G. Microbial biofertilizer increases nutrient uptake on grape (*Vitis labrusca* L) grown in an alkaline soil reclaimed by sulfur and *Acidithiobacillus*. **Australian Journal of Crop Science**, Brisbane, v. 12, n. 10, p. 1695-1701, 2018.

SOUSA JUNIOR, P. R.; BRUNHARO, C. A.; FURLANI, C. E.; PRADO, R.; JÚNIOR, W. M.; ZERBATO, C. Phosphorus fertilization in sugarcane cultivation under different soil managements. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 21, n. 10, p. 665-669, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v21n10p665-669>>.

STAMFORD, N. P.; SILVA, E. V. N.; OLIVEIRA, W. S.; SILVA, M. C. F.; MARTINS, M. S.; SILVA, V. S. G. Organic matter inoculated with diazotrophic bacterium *Beijerinckia indica* and *Cunninghamella elegans* fungus containing chitosan on banana "Williams" in field. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 39, n. 1, p. 33-41, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v39i1.30857>>.

STAMFORD, N. P.; NETO, D. E. S.; FREITAS, A. D. S.; OLIVEIRA, E. C. A.; OLIVEIRA, W. S.; CRUZ, L. Rock biofertilizer and earthworm compost on sugarcane performance and soil attributes in two consecutive years. **Scientia Agrícola**, São Paulo, v. 73, n. 1, p. 29-33, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0005>>.

STAMFORD, N. P.; SILVA JUNIOR, 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 biofertilizers with diazotrophic bacteria and fungi chitosan. **Australian Journal of Crop Science**, Brisbane, v. 8, n. 2, p. 301-306, 2014.

STAMFORD, N. P.; ANDRADE, I. P.; SILVA JUNIOR, S.; SANTOS, C. E. R. S.; LIRA JÚNIOR, M. A.; FREITAS, A. D. S.; STRAATEN, V. P. Nutrient uptake by grape in a Brazilian soil affected by rock biofertilizer. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 11, n. 4, 79-88, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162011000400006>>.

STAMFORD, N. P.; MOURA, P. M.; LIRA JUNIOR, M. A.; SANTOS, C. E. R. S.; DUENHAS, L. H.; GAVA, C. A. T. Chemical attributes of an Argisol of the Vale do São Francisco after melon growth with phosphate and potash rocks biofertilizers. **Horticultura Brasileira**, Recife, v. 27, p. 447- 452, 2009.

STAMFORD, N. P.; LIMA, R. A.; LIRA JUNIOR, M. A.; SANTOS, C. E. R. S. Effectiveness of phosphate and potash rocks with *Acidithiobacillus* on sugarcane yield and their effects in soil chemical attributes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 24, n. 10, p. 2061-2066, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-008-9710-x>>.

STAMFORD, N. P.; LIMA, R. A.; SANTOS, C. E. R. S.; DIAS, S. H. L. Rock biofertilizers with *Acidithiobacillus* on sugar cane yield and nutrient uptake in a Brazilian soil. **Geomicrobiology Journal**, Ithaca, v. 23, p. 261-265, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/01490450600760658>>.

SATYAPRAKASH, M.; NIKITHA, T.; REDDI, E. U. B.; SADHANA, B.; SATYA VANI, S. Phosphorous and Phosphate Solubilising Bacteria and their Role in Plant Nutrition. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Tamilnadu, v. 6, p. 2133-2144, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2017.604.251>>.

SEDIYAMA, M. A. N.; SANTOS, M. R.; SALGADO, L. T.; PUIATTI, M.; VIDIGAL, S. M. Produtividade e exportação de nutrientes por rizoma de taro cultivado com resíduos orgânicos. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 4, n. 4, p. 421-425, 2009.

TEIXEIRA, E. B.; BOLONHEZI, A. C.; FERNANDES, F. M.; RIBEIRO, N. A.; QUEIROZ, C. J. Características tecnológicas do caldo de variedades de cana-de-açúcar cultivadas em solo de cerrado com diferentes níveis de adubação fosfatada. **Científica**, Jaboticabal, v.44, n.1, p.23-34, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.15361/1984-5529.2016v44n1p23-34>>.

VAN STRAATEN, P. **Agrogeology** - the use of rocks for crops. Enviroquest, Cambridge, Ontario, Canada. 2007. p. 440.

YANG, J.; LIANG, L.; LI, J.; ZHANG, K. Nematicidal enzymes from microorganisms and their applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Münster, v. 97, n. 16, p. 7081-7095, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-013-5045-0>>.

YAN, W.; ZHONG, Y.; ZHENG, S.; SHANGGUAN, Z. Linking plant leaf nutrients/stoichiometry to water use efficiency on the Loess Plateau in China. **Ecological Engineering**, Amsterdam, v. 87, p. 124 - 131, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.11.034>>.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo fornecem informações relevantes que poderão auxiliar no manejo integrado de nematoides em cana-de-açúcar, por meio da geração de novas tecnologias que promovam o desenvolvimento de uma agricultura sustentável, através da utilização de processos microbiológicos. Estimulando dessa forma, o uso de insumos biológicos, diminuindo a utilização de produtos químicos que apresentam efeito deletério ao meio ambiente.

O estudo foi relevante para comprovar o efeito do biofertilizante produzido a partir de pó de rochas, inoculadas com microrganismos, como uma alternativa aos fertilizantes minerais solúveis no fornecimento de nutrientes para as plantas, contribuindo na melhoria dos atributos químicos do solo, nas características tecnológicas da cultura e proporcionando efeito positivo na comunidade microbiana do solo. Além disso, forneceu informações que contribuiu na elucidação da atuação do biofertilizante biológico no mecanismo de defesa das plantas, principalmente na indução de resistência ao nematoide das galhas, doença causada pelo *Meloidogyne incognita* responsável por grandes perdas em cultivos de cana-de-açúcar.

APÊNDICE A – Resumo da análise estatística

Tabela S1. Resultados de dois fatores ANOVA (Tratamento e tempo) para os parâmetros químicos e microbiológicos do solo (Capítulo 1)

Fatores ^a	pH ^b		N solúvel ^b		C solúvel ^b		P disponível ^b		K disponível ^b	
	<i>F</i> ^c	<i>P</i> ^d	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Trat.	204,72	<0,01	13,50	<0,01	5,90	<0,01	139,26	<0,01	0,60	0,67
T	331,91	<0,01	567,02	<0,01	41,17	<0,01	27,72	<0,01	10174	<0,01
Trat.xT	6,38	<0,01	22,46	<0,01	2,99	<0,01	9,43	<0,01	0,93	0,50
Fatores ^a	N total ^b		C org. ^b		M.O.T. ^b		P total ^b		K total ^b	
	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Trat.	2,75	0,04	12,68	<0,01	12,70	<0,01	31,36	<0,01	1,83	0,14
T	47,46	<0,01	45,36	<0,01	45,39	<0,01	12,55	<0,01	24,99	<0,01
Trat.xT	1,81	0,10	1,30	0,27	1,31	0,26	4,21	<0,01	1,71	0,12
Fatores ^a	β-gluc. ^b		Fosf.. ^b		Ureasa. ^b		Desid. ^b		Glicina ^b	
	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Trat.	2,73	0,04	5,23	<0,01	0,97	0,43	5,90	<0,01	2,34	0,07
T	5,31	<0,01	40,37	<0,01	40,49	<0,01	80,89	<0,01	54,33	<0,01
Trat.xT	0,25	0,98	4,77	<0,01	0,58	0,79	1,88	0,09	3,03	<0,01

^a Trat., tratamento; T, tempo de cultivo

^b Parâmetros: pH, N solúvel; C solúvel; P disponível; K disponível; N total; C org., carbono orgânico; M.O.T., matéria orgânica total; P total; K total; β-gluc., atividade β-glucosidase; Fosf., atividade Fosfatase; Ureasa, atividade Urease; Desid., atividade Desidrogenase; Glicina, atividade Glicina aminopeptidase.

^c *F*-relação.

^d *P* valores.

Tabela S2. Resumo da análise de variância do peso fresco da raiz da cana-de-açúcar variedade RB 92579, na interação entre tratamentos de fertilização (F) x *Meloidogyne incognita* (N) em casa de vegetação (Capítulo 2)

Fonte de variação	GL	ANOVA	Quadrado Médio	Valor F	Pr > F
F	7	814,67	116,38	8,22	< 0,0001
N	1	374,98	374,98	26,49	< 0,0001
TxN	7	293,38	41,91	2,96	0,0094

Tabela S3. Resumo da análise de variância da enzima superóxido dismutase (SOD) da cana-de-açúcar variedade RB 92579, na interação entre tratamentos de fertilização (F) x *Meloidogyne incognita* (N) x Tempo (T) em casa de vegetação, com medida repetida no tempo (Capítulo 2)

Fonte de variação	GL	ANOVA	Quadrado Médio	Valor F	Pr > F
F	7	7840,14	1120,02	2,48	0,0297
N	1	59205,65	59205,65	130,85	<0,0001
T	2	8955,54	4477,77	9,12	0,0002
FxN	7	10263,30	1466,19	3,24	0,0068
FxT	14	14780,23	1055,73	2,15	0,0153
NxT	2	22483,84	11241,92	22,89	<0,0001
FxNxT	14	14212,73	1015,19	2,07	0,0203
Resíduo	96	47144,99	491,09		

Tabela S4. Resumo da análise de variância da enzima ascorbato peroxidase (APX) da cana-de-açúcar variedade RB 92579, na interação entre tratamentos de fertilização (F) x *Meloidogyne incognita* (N) x Tempo (T) em casa de vegetação, com medida repetida no tempo (Capítulo 2)

Fonte de variação	GL	ANOVA	Quadrado Médio	Valor F	Pr > F
F	7	3049,86	435,69	1,00	0,4399
N	1	23463,35	23463,35	54,10	<0,0001
T	2	295007,33	147503,66	264,00	<0,0001
FxN	7	2393,25	341,89	0,79	0,6006
FxT	14	2177,31	155,52	0,28	0,9951
NxT	2	20226,86	10113,43	18,10	<0,0001
FxNxT	14	3361,50	240,11	0,43	0,9614
Resíduo	96	53637,93	558,73		

Tabela S5. Resumo da análise de variância da enzima catalase (CAT) da cana-de-açúcar variedade RB 92579, na interação entre tratamentos de fertilização (F) x *Meloidogyne incognita* (N) x Tempo (T) em casa de vegetação, com medida repetida no tempo (Capítulo 2)

Fonte de variação	GL	ANOVA	Quadrado Médio	Valor F	Pr > F
F	7	12046,84	1720,98	3,01	0,0106
N	1	9034,89	9034,89	15,78	0,0002
T	2	7873,81	3936,90	5,60	0,0050
FxN	7	6785,63	969,37	1,69	0,1333
FxT	14	14847,21	1060,51	1,51	0,1227
NxT	2	177,83	88,91	0,13	0,8814
FxNxT	14	8092,47	578,03	0,82	0,6438
Resíduo	96	67509,41	703,22		

Tabela S6. Resumo da análise de variância da proteína na cana-de-açúcar variedade RB 92579, na interação entre tratamentos de fertilização (F) x *Meloidogyne incognita* (N) x Tempo (T) em casa de vegetação, com medida repetida no tempo (Capítulo 2)

Fonte de variação	GL	ANOVA	Quadrado Médio	Valor F	Pr > F
F	7	13,41	1,92	2,51	0,0276
N	1	5,56	5,56	7,29	0,0095
T	2	154,74	77,37	77,82	<0,0001
FxN	7	9,39	1,34	1,76	0,1174
FxT	14	12,43	0,89	1,24	0,2620
NxT	2	1,60	0,80	1,12	0,3321
FxNxT	14	15,22	1,09	1,51	0,1203
Resíduo	96	68,89	0,72		