

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MINAS GERAIS
UNIDADE FRUTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS

BACTÉRIAS AUTÓCTONES PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO: QUANTIFICAÇÃO, SELEÇÃO E
REINOCULAÇÃO NA CANA-DE-AÇÚCAR, COMO
ALTERNATIVA VIÁVEL PARA MINIMIZAÇÃO DO USO DE
FERTILIZANTES

Adriana Barboza Alves
Tecnóloga em Produção Sucroalcooleira

FRUTAL-MG

2022

ADRIANA BARBOZA ALVES

**BACTÉRIAS AUTÓCTONES PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO: QUANTIFICAÇÃO, SELEÇÃO E
REINOCULAÇÃO NA CANA-DE-AÇÚCAR, COMO
ALTERNATIVA VIÁVEL PARA MINIMIZAÇÃO DO USO DE
FERTILIZANTES**

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Minas Gerais, Unidade Frutal, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora
Dra. Osania Emerenciano Ferreira

**FRUTAL-MG
2022**

- A474b Alves, Adriana Barboza
Bactérias autóctones promotoras de crescimento :
quantificação, seleção e reinoculação na cana-de-açúcar,
como alternativa viável para minimização do uso de
fertilizantes / Adriana Barboza Alves. - Frutal. - 2022.
111 f. : il., gráf.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado
de Minas Gerais - Unidade Frutal, 2022.
Orientadora: Osania Emerenciano Ferreira.
1. Bactérias do solo. 2. Fixadores de nitrogênio. I.
Ferreira, Osania Emerenciano. II. Universidade do Estado
de Minas Gerais - Unidade Frutal. III. Título.
- CDU 631

Catálogo na fonte

Bibliotecária: Gesiane Patrícia de Souza CRB-6/1894

22/11/2022 21:57

SEI/GOVMG - 56567524 - Ata



GOVERNO DO ESTADO DE MINAS GERAIS

ADRIANA BARBOZA ALVES

BACTÉRIAS AUTÓCTONES PROMOTORAS DE CRESCIMENTO: QUANTIFICAÇÃO, SELEÇÃO E REINOCULAÇÃO NA CANA-DE-AÇÚCAR, COMO ALTERNATIVA VIÁVEL PARA MINIMIZAÇÃO DO USO DE FERTILIZANTES

Dissertação apresentada a Universidade do Estado de Minas Gerais, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, área de concentração Multidisciplinar, Linha de Pesquisa Diagnóstico e Ecologia Ambiental, para à obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 23 de agosto de 2022.

Profa. Dra. Mara Cristina Pessoa da Cruz

UNESP Jaboticabal

Prof. Dr. Eduardo da Silva Martins

UEMG Frutal

Profa. Dra. Osania Emerenciano Ferreira

Orientadora



Documento assinado eletronicamente por **Mara Cristina Pessoa da Cruz, Usuário Externo**, em 22/11/2022, às 17:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **Osania Emerenciano Ferreira, Professora de Educação Superior**, em 22/11/2022, às 17:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo da Silva Martins, Professor de Educação Superior**, em 22/11/2022, às 17:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.mg.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **56567524** e o código CRC **045B9CCB**.

Dedico

Aos meus filhos,

Igor Leonardo, Izadora e Pedro Henrique, por simplesmente existirem...

.....por esse motivo eu tenho mil e uma razões a mais pra viver.

Eu amo vocês infinitamente....

*“We know more about the movement of celestial
bodies than about the soil underfoot”.
Leonardo da Vinci*

AGRADECIMENTOS

Ao Deus grandioso e maravilhoso, Criador de todas as coisas, Salvador e Consolador, agradeço pela saúde, proteção e permissão que eu chegasse até aqui. Ele com seu grande amor permitiu que minha família ficasse ilesa quanto à COVID-19. A Ele toda honra, glória e louvor, agora e para sempre...

À minha querida orientadora Dra Osania Emerenciano Ferreira, por entender minhas limitações... dentre elas o cansaço, o estress, o luto.., mas com amor e dedicação me ajudou a superar a dor desses momentos! Você foi muito mais do que uma orientadora pra mim, mais que uma amiga, mais que um exemplo de carinho e companheirismo.... Obrigada minha querida, por se preocupar muito mais com o que eu sentia do que com o que eu escrevia... Você sempre será referência para mim!!

Ao meu querido esposo e companheiro Gilberto, por ser o meu par, o meu refúgio, o ombro amigo que me compreendeu e me auxiliou, muitas vezes sem mesmo entender, porém simplesmente exercendo o verbo amar... Amo-te também!!!

Aos amigos e membros da banca, Dra. Mara Cristina Pessôa da Cruz e Dr. Eduardo da Silva Martins, grata pelos conselhos, sugestões e contribuições. Gratidão por aceitarem participar desse momento especial! Com certeza contribuirão muito com esse trabalho!

Aos grandes amigos do laboratório Adrianita, Giovanni e Halax. Nunca vou me esquecer do que fizeram por mim! Foram muitas caixas de analgésicos para compensarem as dores musculares...não tem preço que pague esse gesto! Extrema gratidão!

Às meninas da MGS, dona Elda, Joana e Givânia. Ah meninas, como fiz sujeira nos laboratórios! E como me surpreenderam com a sua disposição e alegria em deixar tudo pronto pra próxima etapa! Obrigada!!!

Ao amigo Gerson José, do viveiro Canatech onde ficaram minhas mudas. Grata pela alegria e disposição que sempre tinha quando chegávamos lá. Sempre nos auxiliou e contribuiu com mais do que o necessário! Obrigada!

À empresa M.S. Fernandes Consultoria Agrícola, patrocinadora do projeto, por ter permitido que esse desafio saísse do esboço e pelas expectativas que alimentam esse trabalho. Muito obrigada!!!!

Por fim, obrigada a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para que eu chegasse até aqui, finalizando um trabalho tão importante pra mim! MUITÍSSIMO obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL.....	17
REFERÊNCIAS.....	19
CAPÍTULO 2 – REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
1 O Cerrado e a distribuição padrão da comunidade microbiota	21
1.1 A conversão do bioma Cerrado	22
2 Importância e perspectivas do setor sucroenergético	23
3 Impactos no meio ambiente	24
4 Microrganismos promotores de crescimento	25
5 Fixação biológica de nitrogênio.....	26
5.1 O ciclo do nitrogênio	26
6 Solubilização de fosfato	28
7 Nutrientes para a cana-de-açúcar.....	29
8 Nutrientes para os microrganismos.....	31
REFERÊNCIAS	32
CAPÍTULO 3 – SOLUÇÕES EXTRATORAS MELHORAM A EXTRAÇÃO /QUANTIFICAÇÃO DE CARGA MICROBIANA POR TÉCNICAS CONVENCIONAIS DE CULTIVO	39
1 INTRODUÇÃO	40
2 MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1 Áreas de estudo	41
2.2 Método de coleta	42
2.3 Análises físico-químicas dos solos	42
2.3.1 Análise de pH do solo	42
2.3.2 Análise de umidade do solo	42
2.3.3 Obtenção da TFSA (terra fina seca ao ar)	43
2.3.4 Análise granulométrica	43
2.4 Métodos de extração dos solos	46
2.5 Análise microbiológica dos solos	47
2.6 Análise estatística	47
3 RESULTADOS	47
3.1 Análise de pH e umidade atual	47
3.2 Análises granulométricas	48
3.3 Análises microbiológicas	49
4 DISCUSSÕES	49
5 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	52
CAPÍTULO 4 – AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DE SOLOS DE CERRADO DO TRIÂNGULO MINEIRO SUBMETIDOS AO PLANTIO DE CANA-DE-AÇÚCAR: SELEÇÃO, ISOLAMENTO E MULTIPLICAÇÃO DE MICRORGANISMOS FIXADORES DE NITROGÊNIO E SOLUBILIZADORES DE FOSFATO.....	55
1 INTRODUÇÃO	55
2 MATERIAL E MÉTODOS	57

2.1 Áreas de estudo	57
2.2 Análises físico-químicas.....	58
2.2.1 pH do solo em água destilada (EMBRAPA, 1997)	58
2.2.2 Umidade (EMBRAPA, 1997)	59
2.2.3 Obtenção da TFSA (terra fina seca ao ar)	59
2.2.4 Análise granulométrica	59
2.3 Características microbiológicas do solo	62
2.3.1 Diluição e preparo das amostras	63
2.3.2 Bactérias totais (OLSEN; BAKKEN, 1987; SORHEIM et al., 1989)....	63
2.3.3 Fungos totais (MARTIN, 1950)	64
2.3.4 Estirpes fixadoras de Nitrogênio (DÖBEREINER et al., 1995)	64
2.3.5 Estirpes de solubilização de fosfato.....	68
2.4 Análises estatísticas	69
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	69
4 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	77
CAPÍTULO 5 – BACTÉRIAS AUTÓCTONES PROMOTORAS DE	
CRESCIMENTO DE CANA-DE-AÇÚCAR: ALTERNATIVA PARA	
MELHORAR A RENTABILIDADE E MINIMIZAÇÃO DO USO DE	
FERTILIZANTES.....	82
1 INTRODUÇÃO.....	82
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	85
2.1 Cultivo das bactérias autóctones.....	85
2.2 Área experimental e instalação dos vasos.....	85
2.3 Avaliação das características microbiológicas do solo.....	86
2.3.1 Bactérias totais (OLSEN; BAKKEN, 1987; SORHEIM <i>et al.</i> , 1989)....	87
2.3.2 Bactérias fixadoras de Nitrogênio (DÖBEREINER <i>et al.</i> , 1995).....	87
2.3.3 Bactérias solubilizadoras de fosfato (NAUTIYAL, 1999).....	88
2.4 Determinação das características químicas do solo.....	88
2.5 Biometria das mudas de cana-de-açúcar.....	88
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	88
4 CONCLUSÃO.....	101
REFERÊNCIAS	101
APÊNDICES.....	106

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Tempo de sedimentação calculado para a fração silte ($0,002 \text{ mm} < \varnothing < 0,05 \text{ mm}$) em função da temperatura da suspensão para a profundidade de 5 cm e para solos com densidade de partículas média de $2,65 \text{ kg.dm}^{-3}$, ao nível do mar	44
Tabela 2 - Tratamentos utilizados como soluções extratoras de solo para análise microbiológica	47
Tabela 3 - Resultados das médias de pH e umidade atual, com análise do desvio padrão, dos solos de Cerrado	48
Tabela 4 - Médias dos atributos granulométricos dos dois tipos de solos de Cerrado, submetidos ao plantio de cana-de-açúcar	48
Tabela 5 - Médias dos valores de unidades formadoras de colônia (10^4 UFC.g^{-1}) após 72 horas de incubação em meio Ágar Nutriente, utilizando diferentes soluções extratoras	49

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Tempo de sedimentação calculado para a fração silte ($0,002 \text{ mm} < \varnothing < 0,05 \text{ mm}$) em função da temperatura da suspensão para a profundidade de 5 cm e para solos com densidade de partículas média de $2,65 \text{ kg.dm}^{-3}$, em determinação efetuada ao nível do mar	61
Tabela 2. Valores de pH e umidade, realizados em quadruplicatas em amostras de solos coletados em período de estio (2020), em área de solos agrícolas com plantio de cana-de-açúcar. Os resultados estão apresentados como médias $\pm$ desvio padrão.....	69
Tabela 3. Médias dos atributos granulométricos para determinação das frações de areia, silte e argila em amostras de solos agrícolas	70
Tabela 4. Médias dos valores de unidades formadoras de colônia (UFC.g^{-1}) após o tempo de incubação de acordo com metodologias aplicadas	72
Tabela 5. Atividade nitrogenase medida em teor de nitrogênio total na amostra	75
Tabela 6. Medição em cm dos diâmetros dos halos de solubilização após inoculação de amostras de solos analisadas em meio seletivo para bactérias solubilizadoras de	

fosfato.....	77
--------------	----

CAPÍTULO 5

Tabela 1 – Tratamentos em condição de vaso utilizando solo virgem, quanto às adubações aplicadas e microrganismos inoculados.....	86
--	----

Tabela 2. Interação microrganismos-solo, unidades formadoras de colônia de bactérias totais 60 e 90 dias após a inoculação de bactérias autóctones com diferentes adubações, em condição de vasos com plantio de cana-de-açúcar.....	89
---	----

Tabela 3. Interação microrganismos-solo, unidades formadoras de colônia de bactérias fixadoras de nitrogênio 60 e 90 dias após a inoculação de bactérias autóctones com diferentes adubações, em condição de vasos com plantio de cana-de-açúcar.....	90
--	----

Tabela 4. Interação microrganismos-solo, unidades formadoras de colônia de bactérias solubilizadoras de fósforo 60 e 90 dias após a inoculação de bactérias autóctones com diferentes adubações, em condição de vasos com plantio de cana-de-açúcar.....	91
---	----

Tabela 5. Caracterização química de Latossolo Vermelho, utilizado no experimento em condições de vaso.....	91
---	----

Tabela 6. Legenda numérica dos tratamentos para visualização nas análises PCA.....	99
---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1** – Cobertura e uso da terra no Brasil (1985 – 2020). Destaque para a variação da cobertura do Cerrado (Área de formação savânica) 22
- Figura 2** – Área de desmatamento anual do Cerrado no Brasil (2001 – 2020) em km²..... 23
- Figura 3** - Representação esquemática das principais vias do ciclo do N que ocorrem na interface atmosfera-solo. Os valores na figura representam os fluxos no balanço de N medidos para o Cerrado descritos em uma revisão por Bustamante *et al.* (2006). Anammox - oxidação anaeróbia da amônia; DNRA - redução dissimilatória de nitrato para amônio; Norg - nitrogênio orgânico..... 27

CAPÍTULO 3

- Figura 1** - Percentuais das frações de areia, silte e argila em dois solos submetidos ao plantio de cana de açúcar no Cerrado de Minas Gerais 49

CAPÍTULO 4

- Figura 1** - Representação geográfica dos fundos agrícolas estudados por inserção de coordenadas 58
- Figura 2** - Procedimento para preparação de diluições em série a partir de uma amostra de solo já diluída (10^{-1}) em água de diluição (0,9% de NaCl). Adaptado de NICOLAU, 2014..... 63
- Figura 3** - Coloração turva e formação de película característica em tubos de ensaio contendo caldo nutriente e inóculos de microrganismos isolados para avaliação de fixação/solubilização..... 65
- Figura 4** - A densidade óptica de uma suspensão celular, usando como referência um tubo de meio não inoculado, lida num espectrofotômetro, a um comprimento de onda fixo (600 nm) (b). A diferença de absorvância entre o tubo com suspensão celular e o tubo com meio estéril possibilita a determinação da densidade celular na suspensão (c). Imagem (c) adaptado de NICOLAU, 2014..... 66
- Figura 5** - Destilação em destilador de nitrogênio tipo Kjeldahl com adição de NaOH 50% e Solução de H₃BO₃ com indicador misto..... 67
- Figura 6** - Medição de halo formado por colônia solubilizadora de fosfato em meio característico após 15 dias de incubação a 30°C. Os resultados foram expressos em

cm	68
Figura 7 - Percentuais das frações de areia, silte e argila em solos submetidos ao plantio de cana de açúcar e de Mata Nativa no Cerrado de Minas Gerais.....	71
Figura 8 - Análise de PCA componentes principais e correlação das amostras de solos agrícolas com os componentes (pH, Umidade, Fungos totais (FT), Bactérias totais (BT), Bactérias fixadoras de nitrogênio (FBN) e Bactérias solubilizadoras de fosfato (BSP).....	73
Figura 9 - Análise de componentes principais das variáveis FT (fungos totais); BT (bactérias totais); FN (bactérias fixadoras de nitrogênio); SP (bactérias solubilizadoras de fosfato); pH e percentual de umidade.....	74
Figura 10 - Crescimento de colônias em meio FNB para seleção de microrganismos fixadores de nitrogênio. Unidades formadoras de colônias com 7 dias de incubação	74
Figura 11 - Atividade nitrogenase em inóculos isolados aos 5 dias de agitação em mesa agitadora a 100 rpm em meio semi-sólido NFB	75
Figura 12 - Comparação entre teores de nitrogênio total (mg) e densidade óptica (DO) em amostras de solos analisadas	76
Figura 13 - Placas contendo meio seletivo para bactérias solubilizadoras de fosfato, apresentando os halos das unidades formadoras de colônia	76

CAPÍTULO 5

Figura 1 - Análise da biometria da cana-de-açúcar: Comprimento da raiz em (cm) aos 60 e 90 dias após o plantio das gemas e a inoculação de bactérias autóctones com diferentes adubações, em condição de vasos.....	92
Figura 2 - Análise da biometria da cana-de-açúcar: Massa seca da raiz em (g) aos 60 e 90 dias após o plantio das gemas e a inoculação de bactérias autóctones com diferentes adubações, em condições de vasos.....	93
Figura 3 - Biometria da cana-de-açúcar aos 90 dias após plantio: Raízes na avaliação de comprimento e massa seca.....	95
Figura 4 - Análise da biometria da cana-de-açúcar: Altura da planta em (cm) aos 60 e 90 dias após o plantio das gemas e a inoculação de bactérias autóctones com diferentes adubações, em condição de vasos.....	96

Figura 5 - Cana-de-açúcar aos 60 dias após plantio para análise de biometria.....	97
Figura 6 - Análise da biometria da cana-de-açúcar: Massa seca da planta em (g) aos 60 e 90 dias após o plantio das gemas e a inoculação de bactérias autóctones com diferentes adubações, em condição de vasos.....	98
Figura 7 - Análise de Componentes Principais e correlação dos tratamentos 60 dias após o plantio.....	99
Figura 8 - Análise de Componentes Principais e correlação dos tratamentos 90 dias após o plantio.	100

RESUMO

Solos são ecossistemas complexos que abrigam elevada biodiversidade. O Cerrado, segundo maior bioma da América do Sul e savana tropical, é caracterizado por apresentar grande riqueza vegetal, seus solos distróficos e ácidos possuem enorme riqueza biológica. A influência das propriedades químicas do solo sobre a camada vegetal no bioma é bem conhecida, mas informações sobre como esses fatores atuam sobre a diversidade microbiana e sobre processos ecológicos mediados por microrganismos no solo, com ocupações agrícolas, ainda são escassas. Diante desse contexto, esse trabalho objetivou avaliar a riqueza da microbiota em seis solos submetidos ao plantio de cana-de-açúcar, selecionando espécies de bactérias com boa facilidade de fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato, a fim de disponibilizar nutrientes para as plantas e com o propósito de reduzir/ou melhorar a assimilação de fertilizantes em ambientes de produção. Para as análises microbiológicas, inicialmente foi realizado um comparativo de técnicas de extração utilizando diferentes soluções extratoras, atingindo a maior quantificação possível de microrganismos por técnicas convencionais. A textura do solo influencia no processo de solubilização dos grãos de areia e argila, permitindo assim a escolha do solvente ideal para a melhor extração da riqueza microbiana. A quantificação microbiana em cada tipo de solo permitiu comparar as riquezas em cada fundo agrícola e a seleção dos microrganismos encontrados foi realizada conforme habilidade das espécies em atividade nitrogenase e capacidade de solubilização de fosfato. Após seleção, isolamento e multiplicação desses microrganismos, os mesmos foram inoculados em minirrebolos de cana-de-açúcar e avaliados aos 60 e 90 dias. Os tratamentos avaliados somaram 28, com alternâncias entre quantidades de fertilizantes aplicadas e tipo de microrganismo utilizado, de forma isolada e associados. Foram realizadas as análises de biometria da cana-de-açúcar, dentre elas a altura da planta e peso de massa seca de parte aérea, comprimento e peso de massa seca de raízes e análises microbiológicas. Os tratamentos que tiveram inoculação microbiana reduziram a adubação em até 50%, sem afetar o desenvolvimento das mudas, sendo os resultados de biometria da cultura superiores à adubação convencional (100%).

Palavras-chave: Bactérias do Solo. Fixadores de Nitrogênio. Promotores de Crescimento. Solubilizadores.

**GROWTH-PROMOTING AUTOCHTON BACTERIA: QUANTIFICATION,
SELECTION AND REINOCULATION IN SUGAR CANE, AS A VIABLE
ALTERNATIVE FOR MINIMIZING THE USE OF FERTILIZERS**

ABSTRACT

Soils are complex ecosystems that harbor high biodiversity. The Cerrado, the second largest biome in South America and tropical savanna, is characterized by its great plant wealth, its dystrophic and acidic soils have enormous biological richness. The influence of soil chemical properties on the vegetation layer in the biome is well known, but information on how these factors act on microbial diversity and on ecological processes mediated by microorganisms in soil with agricultural occupations is still scarce. In this context, this study aimed to evaluate the microbiota richness in six soils subjected to sugarcane planting, selecting species of bacteria with good nitrogen fixation and phosphate solubilization in the soils, in order to provide nutrients that can be assimilated by the plants. plants, with the purpose of reducing/or improving the assimilation of fertilizers in production environments. For the microbiological analyses, a comparison of extraction techniques was initially carried out using different extracting solutions, in order to achieve the greatest possible quantification of microorganisms by conventional techniques. Soil texture influences the process of solubilization of sand and clay grains, thus allowing the choice of the ideal solvent for the best extraction of microbiota richness. The microbial quantification in each type of soil allowed comparing the richness in each agricultural fund and the selection of the microorganisms found was carried out according to the ability of the species in nitrogenase activity and phosphate solubilization capacity. After selection, isolation and multiplication of these microorganisms, they were inoculated into mini sugarcane grinding wheels and evaluated at 60 and 90 days. The evaluated treatments totaled 28, with alternations between the amounts of fertilizers applied and the type of microorganism used, in isolation and in association. Biometric analyzes of sugarcane were performed, including plant height and shoot dry mass weight, root length and dry mass weight and microbiological analyses. The treatments that had microbial inoculation reduced the fertilization in up to 50%, without affecting the development of the seedlings, being the results of biometrics of the culture superior to the conventional fertilization (100%).

Keywords: Soil Bacteria. Nitrogen Fixers. Growth Promoters. Solubilizers.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL

A estrutura dos ecossistemas terrestres é formada por múltiplos processos ecológicos, entre os quais, mudanças climáticas, características edáficas, perturbação de distúrbios (fogo, ventos, inundações) e pela biota com suas interações (CHAPIN *et al.*, 2011). A integração e o comportamento desses componentes são determinantes para a estruturação da cobertura vegetal dos biomas (BOND *et al.*, 2004). Dentre os biomas, o Cerrado surge como o segundo maior da América do Sul e se define como uma das mais ricas e diversas savanas tropicais, compreendendo uma biodiversidade de florestas, savânicas e campestres. Os ambientes deste bioma variam no sentido horizontal, com áreas campestres, capões de mata, florestas e áreas brejosas que podem coexistir numa mesma região, esse fato é determinante para a grande diversidade de espécies de plantas, animais e microrganismos neste ambiente (MACHADO *et al.*, 2004; SANO *et al.*, 2008).

Nos últimos anos as altas taxas de conversão do Cerrado em áreas agricultáveis, comprometem a sua sustentabilidade (NOOJIPADY *et al.*, 2017). Na região do Triângulo Mineiro a expansão da produção de cana-de-açúcar, soja, milho, sorgo, dentre outras culturas que utilizam fertilizantes, agroquímicos, mecanização entre outras técnicas/insumos para promover elevadas produtividades, têm causado alterações nestes ambientes.

Mesmo com as intensas práticas agrícolas têm-se observado nos últimos anos, áreas de cultivo com baixas produtividades, resultando em elevados custos de produção nesses ambientes, além dos impactos ambientais gerados (VEDANA *et al.*, 2019). Diante do contexto, o setor possui uma necessidade de novas tecnologias que favoreçam o aumento da produtividade, menores custos de produção e redução nos impactos ambientais. A inoculação com microrganismos promotores de crescimento vegetal vem sendo considerada como prática sustentável, que possibilita maior produtividade.

A utilização de microrganismos como promoção da disponibilidade de nutrientes para as plantas vem sendo aplicada para melhorar a produtividade, reduzir gastos com fertilizantes e principalmente por questões ambientais (REZENDE *et al.*, 2021). Bactérias não patogênicas que possuem grande capacidade de colonização da superfície de raízes induzem o crescimento vegetal pela fixação de N₂ atmosférico (BABALOBÁ, 2010), solubilização de fosfato e secreção de fitormônios (GLICK *et al.*, 1999). A introdução de cepas eficientes de espécies solubilizadoras de P em solos rizosféricos, tem causado aumento da concentração do nutriente no ambiente (HAJJAM; CHERKAoui, 2017).

O conhecimento da microbiota do solo e sua dinâmica em áreas de intensa atividade agrícola do Cerrado se torna essencial para a melhor escolha de manejo agrícola, tanto em busca de maiores produtividades quanto ao tratamento de áreas degradadas, sob efeito de agroquímicos. Para tal conhecimento, fazem-se necessárias técnicas analíticas aplicadas, que permitam avaliações precisas e garantam a melhor forma de manejo. O conhecimento da fase líquida do solo é de extrema importância para a avaliação da quantidade de nutrientes para a cultura e compreensão da dinâmica e caracterização do ambiente e sua microbiota (SOUZA *et al.*, 2013).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a microbiota de solos submetidos ao plantio de cana-de-açúcar e verificar a viabilidade econômica e ambiental de microrganismos autóctones fixadores de nitrogênio e solubilizadoras de fosfato para o desenvolvimento da cultura. Para isto, foram testadas as seguintes hipóteses: i) Métodos eficazes de extração de solos garantem melhor avaliação de riqueza microbiológica; ii) Solos agrícolas submetidos à monocultura de cana-de-açúcar possuem interações microbiológicas de promoção de nutrientes para as plantas; iii) O aumento de populações de espécies promotoras de nutrientes no solo favorece o desenvolvimento da cultura de cana-de-açúcar; iv) A presença de nutrientes favorece o desempenho das bactérias promotoras de crescimento.

Este trabalho foi estruturado em cinco seções distintas, que compreendem a introdução geral (**Capítulo 1**), a revisão bibliográfica e mais três capítulos. O **Capítulo 2** que traz um detalhado levantamento bibliográfico, discutindo sobre como vem ocorrendo a conversão do bioma Cerrado; a importância e as perspectivas do setor sucroenergético, juntamente à expansão da cultura de cana-de-açúcar; a relevância da atividade da microbiota nesse bioma e como as interações desses microrganismos são importantes nesse ambiente; a importância do nitrogênio, fósforo e potássio para a cana-de-açúcar e como os microrganismos auxiliam nos processos de fixação e solubilização desses nutrientes e, por fim, traz um recorte sobre os nutrientes necessários disponíveis nos solos para maior desenvolvimento e crescimento da cultura de cana-de-açúcar, frente às questões econômicas e ambientais.

Considerando os trabalhos de pesquisa encontrados, fez-se necessário uma abordagem aos tipos de técnicas convencionais que utilizam soluções extratoras de solos para análises microbiológicas. A literatura nesse tema é extremamente escassa, sendo encontrados resultados de análises microbiológicas muito divergentes em amostras similares, propícias a resultados semelhantes. Com intenção de melhorar esses resultados divergentes o **Capítulo 3** foi

desenvolvido apresentando como diferentes soluções extratoras podem interferir na quantificação da microbiota, dependendo da textura do solo analisado. Nesse capítulo foram descritas as análises físico-químicas dos solos estudados e uma prévia quantificação da microbiota em dois solos de diferentes texturas, porém com o mesmo sistema de uso da terra.

O **Capítulo 4** traz um recorte e uma abordagem mais detalhada sobre os microrganismos promotores de crescimento da cana-de-açúcar. Neste capítulo foram realizadas análises físico-químicas e microbiológicas em amostras de solos com plantio dessa cultura. Após o resultado, foram descritas as técnicas de seleção e isolamento de colônias fixadoras de nitrogênio e solubilizadoras de fosfato, para posterior aplicação na cultura.

O **Capítulo 5** segue como complementação do estudo, onde se determina o desenvolvimento de mudas de cana-de-açúcar, utilizando 28 tratamentos para sua avaliação. Esses tratamentos envolvem a inoculação de quatro microrganismos isolados e/ou combinados, em associações com diferentes dosagens de fertilizantes. Os tratamentos foram avaliados aos 60 e 90 dias após plantio. Os dados permitiram a conclusão sobre a ação dos microrganismos como agentes promotores de crescimento da cana-de-açúcar, com redução significativa de fertilizantes agrícolas e consequente redução nos custos com insumos e principalmente com impactos ambientais.

REFERÊNCIAS

BABALOLA, O. O. Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 1559-1570, 2010. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s10529-010-0347-0>. Acesso em: 10 ago. 2021.

BOND, W. J.; WOODWARD, F. I.; MIDGLEY, G. F. The global distribution of ecosystems in a world without fire. **New Phytologist**, v. 165, p. 525-538, 2004. Disponível em: <http://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.2004.01252.x>. Acesso em: 15 mar. 2021.

CHAPIN, F. S., MATSON, P. A., VITOUSEK, P. M. **Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology**. 2 ed. New York: Springer, 2011. Disponível em: <http://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4419-9504-9>. Acesso em: 14 mar. 2021.

GLICK, B. R.; PATTEN, C. L.; HOLGUIN, G.; PENROSE, D. M. **Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria**. Londres: Imperial College Press, 1999. Disponível em: http://books.google.com.br/books?hl=pt-PT&lr=&id=vPq3CgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP9&dq=Biochemical+and+genetic+mechanisms+used+by+plant+growth+promoting+bacteria&ots=7T2jBzv_p&sig=jaEZBRtiTF4bWaVwSQvqVPgHwus#v=onepage&q=Biochemical%20and%20genetic%20mechanisms%20used%20

oby%20plant%20growth%20promoting%20bacteria&f=false. Acesso em: 23 jun. 2021.

HAJJAM, Y.; CHERKAOUI, S. The influence of phosphate solubilizing microorganisms on symbiotic nitrogen fixation: Perspectives for sustainable agriculture. **Journal of Materials and Environmental Sciences**, v. 8, p. 801-808, 2017. Disponível em: http://www.jmaterenvironsci.com/Document/vol8/vol8_N3/83-JMES-ICMES-Hajjam.pdf. Acesso em: 14 mai. 2021.

MACHADO, R. B.; RAMOS NETO M. B.; PEREIRA P. G. P.; CALDAS E. F.; GONÇALVES D. A.; SANTOS N. S.; TABOR K.; STEININGER M. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro**. Relatório técnico. Conservação Internacional, Brasília, DF. 2004. Disponível em: http://jbb.ibict.br/bitstream/1/357/1/2004_%20Conservacao%20Internacional_%20estimativa_desmatamento_cerrado.pdf. Acesso em: 14 mai. 2022.

NOOJIPADY, P.; MORTON, D.; MACEDO, M.; VICTORIA, D.; HUANG, C.; GIBBS, H.; BOLFE, E. Forest carbon emissions from cropland expansion in the Brazilian Cerrado biome. **Environmental Research Letters**, v. 12, p. 1-12, 2017. Disponível em: <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1748-9326/aa5986/pdf>. Acesso em: 14 mai. 2022.

REZENDE, C. C.; SILVA, M. A.; FRASCA, L. L. M.; FARIA, D. R.; FILIPPI, M. C. C.; LANNA, A. C.; NASCENTE, A. S. Microrganismos multifuncionais: utilização na agricultura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, e50810212725, 2021. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1136809/1/rsd-2021.pdf>. Acesso em: 21 jun. 2022.

SANO, S. M.; DE ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. P. **Cerrado: Ecologia e Flora**, 1 ed., Embrapa Cerrados. – Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, v. 2, 2008. Disponível em: <http://livimagens.sct.embrapa.br/amostras/00082120.pdf>. Acesso em: 17 jan. 2021.

SOUZA, E. R.; MELO, H. F.; ALMEIDA, B. G.; MELO, D. V. M. Comparação de métodos de extração da solução do solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 17, n. 5, p. 510-517, 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbeaa/a/YvKLNZq6RjJb8Wc9SZQZGhx/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 17 jan. 2021.

VEDANA, R.; RODRIGUES, K. C. T. T.; PARRÉ, J. L.; SHIKIDA, P. F. A. Distribuição espacial da produtividade de cana-de-açúcar no Brasil. **Revista de Política Agrícola**, v. 28, n. 4, p. 121-133, 2019. Disponível em: <https://seer.sede.embrapa.br/index.php/RPA/article/view/1529/pdf>. Acesso em: 12 fev. 2020.

CAPÍTULO 2 – REFERENCIAL TEÓRICO

1 O Cerrado e a distribuição padrão da comunidade microbiota

Os microrganismos impulsionam a maioria dos processos biogeoquímicos relevantes ocorridos no solo, pela ação de diversas funções na microbiota presente, o que constitui o solo como um ambiente extremamente rico de funcionalidades microbianas; dessa forma, o solo vivo se destaca como o organismo de maior diversidade de funções e habitat do planeta (ELSAS *et al.*, 2019). A abundante microbiota constitui-se num componente de fertilidade dos solos, juntamente com as características físico-químicas do mesmo, assim sendo, os atributos químicos, físicos e biológicos são precursores essenciais e determinantes para a disponibilidade de nutrientes do ambiente (SOUSA, 2020). Os microrganismos estão envolvidos no fluxo de energia e na ciclagem dos elementos, portando-se dessa forma como produtores, transportadores e consumidores do ecossistema do solo e sendo responsáveis pela maior disponibilidade de minerais para as plantas (MCLEOD *et al.*, 2016).

O estudo sobre a microbiota do solo tem se tornado cada vez mais importante para o conhecimento da atividade biológica que sustenta a sobrevida do Cerrado (PROCÓPIO; BARRETO, 2021), com destaque para áreas onde a intensa atividade agrícola trouxe alterações nas características desse solo (REIS *et al.*, 2017).

O bioma Cerrado é composto por um mosaico de formações florísticas e geológicas, tornando-o um ambiente dos mais ricos e notáveis do mundo em relação ao seu diversificado microbioma; pode ser considerado um *hotspot* com grande riqueza de diversidade que oferece possibilidades para potenciais biotecnológicos e recursos biológicos, por suas estirpes promotoras de crescimento, produtoras de enzimas e antibióticos, com potencial para o controle de pragas (PROCÓPIO; BARRETO, 2021). Considerando a pobreza nutricional da maioria dos solos de Cerrado cobertos por vegetação savânica, a eficiência na ciclagem de nutrientes se torna um fator de extrema relevância. A elevada quantidade de serrapilheira associada à atividade biológica é ideal à mineralização e absorção de nutrientes, o que favorece o uso desses elementos, normalmente escassos nesses solos (SANO *et al.*, 2008).

Encontrar e entender padrões de diversidade bacteriana na natureza representa uma tarefa extremamente difícil, considerando a elevada plasticidade fisiológica e diversidade desses grupos microbianos (SOUSA, 2020). Diferentes sistemas de uso do solo também são importantes fatores que alteram a composição e a abundância das comunidades bacterianas do

solo de Cerrado, podendo causar tanto perda de diversidade quanto mudanças na presença/ausência de determinados grupos (RAMPELOTTO *et al.*, 2013). De acordo com Silva (2012) a adição de nutrientes em áreas de Cerrado causa variações na abundância de espécies bacterianas, principalmente naquelas com menor frequência relativa.

1.1 A conversão do bioma Cerrado

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro e a utilização de suas áreas para atividades agrícolas tem aumentado significativamente nos últimos anos. Devido a sua biodiversidade, o Cerrado é caracterizado como bioma heterogêneo, essa característica reflete na rica biodiversidade de fauna, flora e microbiana (SANO *et al.*, 2019). Ainda de acordo com os autores, o Cerrado brasileiro já perdeu quase metade do bioma para áreas agrícolas e pastagens plantadas (Figura 1), e possui hoje localização geopolítica e econômica estratégicas para a produção de commodities agrícolas (ALENCAR *et al.*, 2020).

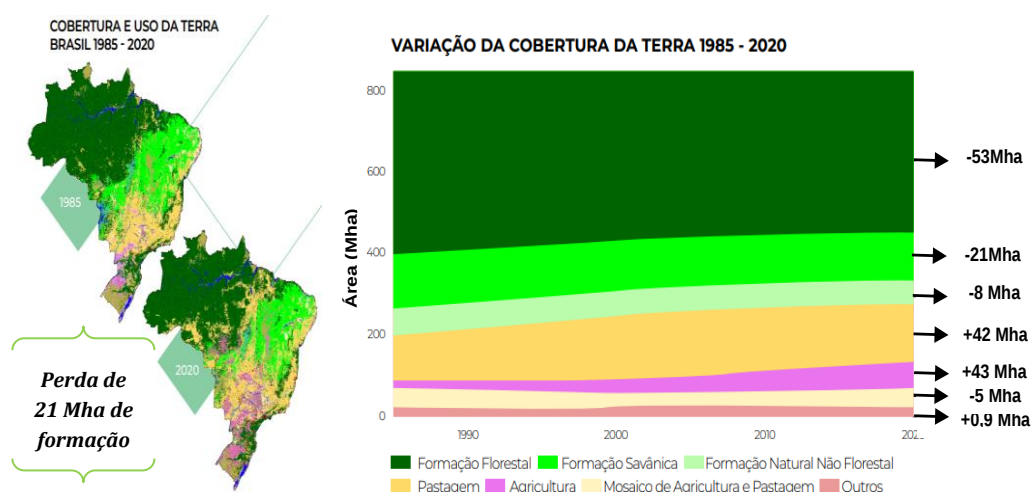


Figura 1 – Cobertura e uso da terra no Brasil (1985 – 2020). Destaque para a variação da cobertura do Cerrado (Área de formação savânica)
Fonte: Mapbiomas.org, 2021.

Segundo o Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) (2021), nos últimos cinco anos houve redução nas taxas de conversão de mata nativa do Cerrado brasileiro em áreas antropizadas (Figura 2); porém as perdas de biodiversidade em um sistema tão rico podem ser irreversíveis. Após a compreensão da heterogeneidade ambiental, o bioma necessita de estratégias de manejo fundiário que visem à diversidade, conservação e restauração de áreas modificadas (SANO *et al.*, 2018).

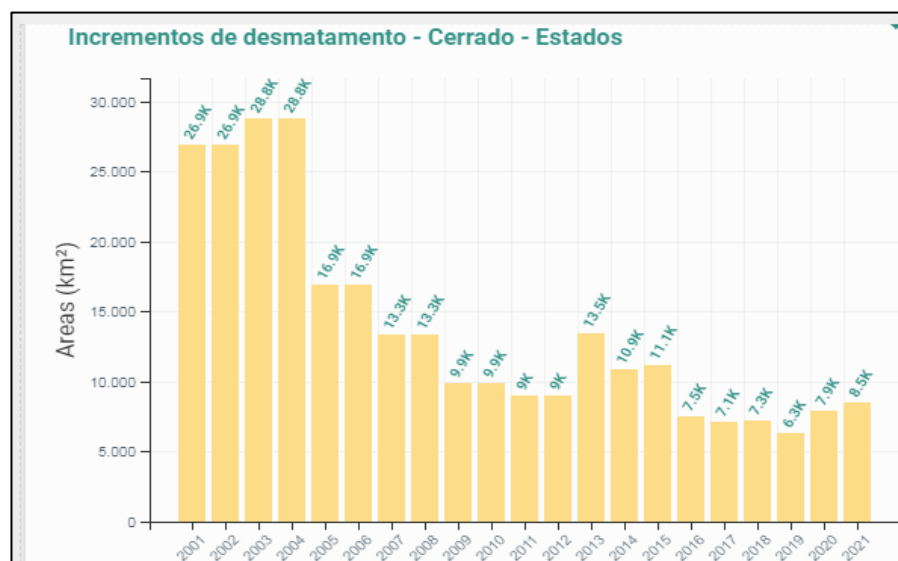


Figura 2 – Área de desmatamento anual do Cerrado no Brasil (2001–2021) em km²
Fonte: INPE 2021.

A agropecuária utiliza 30,9% da área total do Cerrado brasileiro. Isso corresponde a 263,04 milhões de hectares dos 850 milhões de hectares do bioma (INPE, 2021). A agricultura convencional baseou-se no uso de fertilizantes químicos desde a Revolução Verde, esse método de uso indiscriminado é uma forma negativa de sustentar as bases da produção e da alta produtividade, além do fato de causar contaminação na água e no solo (HAJJAM; CHERKAOU, 2017).

2 Importância e perspectivas do setor sucroenergético

A indústria sucroalcooleira vive um momento de demanda global crescente e expectativa de expansão do consumo interno. O setor se encontra num momento de infinitas oportunidades, o que demonstra um cenário positivo para investimentos com a demanda global crescente e a expansão do consumo interno. Soma-se a esse cenário o RENOVBIO, que é a política nacional de incentivo específica para o mercado de biocombustíveis. Com essa política, os produtores que adotarem as boas práticas receberão uma espécie de pagamento pelos serviços ambientais. O Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos. As perspectivas são de que o País produza 30,4 bilhões de litros de etanol em 2021 e chegar a 37,2 bilhões em 2028 (UNEM, 2020).

A importância dada à economia e à cultura canavieira dá-se ao fato da diversidade de produtos gerados, como o etanol (biocombustível), o açúcar (alimento), o melaço (pode ser utilizado como ração animal ou como matéria-prima para o etanol), o bagaço de cana (fonte

calorífera para produção de bioenergia, componente da ração animal, adubo e produção de celulose). Dessa forma, não é de se impressionar que a agroindústria canavieira no Brasil movimente riqueza aproximada de 2% do seu Produto Interno Bruto (PIB) e seja responsável pela geração de cerca de 1 milhão de postos de trabalhos formais. Além disso, a produção de etanol e a cogeração de energia já representam 15,7 % da energia total do País (NEVES *et al.*, 2010). Segundo a União da indústria de cana-de-açúcar (2019), a cadeia produtiva da cana responde por cerca de 10% do agronegócio brasileiro, ultrapassando a cifra de R\$ 150 bilhões em 2017.

3 Impactos no meio ambiente

Neste processo de produção de cana-de-açúcar utilizam-se adubos, fertilizantes, agroquímicos, mecanização entre outras técnicas/insumos para promover elevadas produtividades dos canaviais. Entretanto, têm-se observado nos últimos anos, áreas de cultivo com baixos rendimentos, resultando em elevados custos de produção nesses ambientes. Ramalho, Amaral Sobrinho e Velloso (1999), determinaram em seu trabalho que os fertilizantes fosfatados, quando utilizados por mais de 25 anos, causaram aumento significativo nos teores de cádmio nos três tipos de solos estudados. Além desse impacto, determinaram incrementos significativos nos teores de Cd, Pb, Cu, Cr e Ni nas águas do rio Paraíba do Sul, que banha a região de estudo. Segundo Sharma *et al.* (2013) existe uma preocupação global com a energia e os custos envolvendo a mineração do fosfato de rocha e seu transporte até os campos; para os autores, espalhar fertilizantes fosfatados sobre a paisagem também não é ecologicamente correto, já que está associado a emissões de flúor (altamente volátil e venenoso) e ao acúmulo, no solo e nas colheitas, de cádmio e outros metais pesados, como resultado do uso repetitivo do fertilizante de base fosfatada.

De acordo com Elsas (2019) estudos indicam uma redução na biomassa microbiana devido à contaminação de solos por metais; entre os fatores responsáveis por essas alterações incluem as concentrações de nitrogênio e carbono, pH do solo, textura dos sedimentos e macrófitas, favorecem ou não às concentrações de metais na água e no solo. Ainda segundo os autores, excessos de N por aplicações do fertilizante ou excrementos animais podem ser perdidos por rotas físico-químicas (volatilização, lixiviação) ou pela nitrificação e/ou desnitrificação realizada por microrganismos. Dentre as etapas do ciclo de nitrogênio estão a fixação de N₂, a amonização, a nitrificação e desnitrificação.

O tipo e a quantidade de nitrogênio aplicado como fertilizante nas culturas tem um impacto significativo na estrutura da comunidade microbiana que exerce essas etapas. Os microrganismos nitrificantes utilizam energia da oxidação da amônia ou do nitrito, sendo assim muito influenciados pela disponibilidade do nutriente no ambiente. A nitrificação está diretamente envolvida na emissão do gás de efeito estufa NO_2 , contaminação por nitrato nos recursos de água doce, eutrofização e perdas de nitrogênio por lixiviação em campos agrícolas (PROSSER *et al.*, 2020).

4 Microrganismos promotores de crescimento

Nitrogênio (N), Fósforo (P) e Potássio (K) são os principais macronutrientes indispensáveis às plantas (SILVA, 2013). As bactérias são mencionadas como principais responsáveis pelos processos de biossolubilização, pela capacidade de formar biofilmes e sua fixação no mineral produz microambientes que as protegem de situações como estresse ambiental.

A fixação de N é um processo que demanda muita energia, sendo muitas vezes realizado por bactérias endofíticas com associações simbióticas com plantas. Existem dois grupos de bactérias endossimbióticas diazotróficas, que induzem as raízes das plantas hospedeiras a formarem nódulos radiculares, secretores de quantidades significativas de N durante o desenvolvimento da planta. Estes são rizóbios α - e β - (Proteobactérias), do gênero *Rhizobium* que nodulam plantas leguminosas. Entre as espécies mais utilizadas estão a *Bradyrhizobium* e a *Mesorhizobium*, amplamente exploradas na agricultura. Outra forma de fixação de N, como é o caso na cultura da cana-de-açúcar, é realizada por bactérias endofíticas não nodulantes, que habitam os espaços intercelulares das plantas e o xilema (ELSAS *et al.*, 2019).

Organismos solubilizadores de fosfato destacam-se como alternativa economicamente viável, pois são capazes de disponibilizar grandes quantidades desse nutriente, promovendo o crescimento da planta, por meio da conversão de fósforo insolúvel para as formas solúveis (DIAS *et al.*, 2009). Bactérias dos gêneros *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* e *Serratia* são altamente eficientes quanto à solubilização de complexos de fosfato indisponível em fosfato inorgânico. Esses microrganismos atuam como agentes de liberação de fósforo solubilizando o fosfato por meio de ácidos e enzimas fosfatases, contribuindo para a redução do uso de fertilizantes e com a manutenção dos reservatórios do nutriente (DUARTE, 2016).

5 Fixação biológica de nitrogênio

Para Pires (2016) e Unkovich (2013) dentre os processos biológicos mais importantes pode-se destacar a fixação do N_2 atmosférico, perdendo apenas para a fotossíntese. O nitrogênio é um elemento químico essencial para a vida e representa aproximadamente 78% da atmosfera do planeta, na forma gasosa (N_2), fazendo parte dos ácidos nucleicos e proteínas, entre outras moléculas orgânicas (HOWARD; REES, 1996). Durante a fixação do nitrogênio, a forma inorgânica é convertida em uma forma biológica útil e sua assimilação se encontra em diversas cadeias carbônicas.

O nitrogênio tem o papel principal entre os nutrientes mais exigidos pelas culturas em geral, uma vez que é participante de vários processos bioquímicos (MALAVOLTA *et al.*, 1997) sendo assim considerado a sua presença como fator limitante no crescimento de plantas, sendo a produtividade comprometida pela presença desse nutriente (FRANCO; DÖBEREINER, 1994). A fixação de bactérias endofíticas para a nutrição de leguminosas é bem conhecida e consiste na associação de bactérias gram negativas conhecidas como rizóbios (*Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*), as quais colonizam as raízes pelo processo de simbiose, ocorrendo a formação de nódulos, estruturas formadas por sinais entre planta e bactéria (COSTA *et al.*, 2014).

5.1 O ciclo do nitrogênio

O nitrogênio constitui 78% da atmosfera da Terra e é um componente essencial aos organismos vivos, compreendendo de 1 a 4% de todas as células vivas. As plantas são incapazes de fixar o N_2 atmosférico. Bactérias e arqueias podem reduzir a ligação tripla do N_2 atmosférico para formas assimiláveis pelas plantas, como a amônia, pela atividade da enzima nitrogenase. O N_2 atmosférico entra no ciclo do nitrogênio pela fixação de nitrogênio; esse ciclo geralmente é considerado para começar e terminar com N_2 (Figura 3).

As etapas de fixação de N, nitrificação e desnitrificação são consideradas as principais do ciclo. O nitrito, composto intermediário de várias reações do ciclo do N é reativo e tóxico e é processado pelos microrganismos por reações de oxidação ou redução. Alguns processos do ciclo desempenham papel secundário, como a decomposição espontânea da hidroxilamina em N_2O , no processo de nitrificação. A redução de nitrato para amônio pode ser um tipo de reação importantíssima em ambientes ricos em carbono orgânico com baixas concentrações de nitrato, o que resulta em N conservado com amônia. A mineralização do nitrogênio por fungos e bactérias heterotróficas é uma função importante da cadeia alimentar; os fungos formam uma relação mutualística com as plantas, melhorando a nutrição de fosfato dos vegetais, além de transferir N da matéria orgânica do solo, nitrato e amônia para suas plantas hospedeiras (ELSAS *et al.*, 2019).

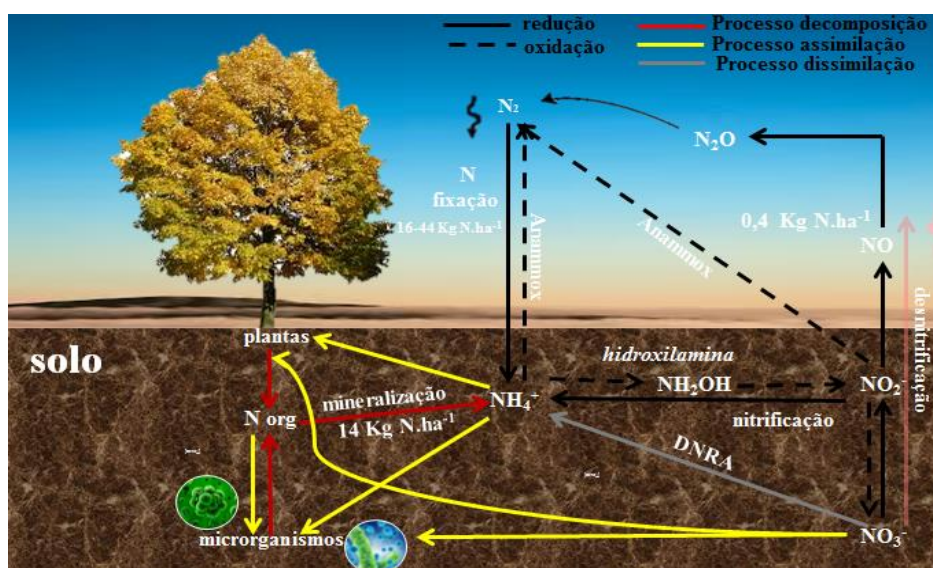


Figura 3 – Representação esquemática das principais vias do ciclo do N que ocorrem na interface atmosfera-solo. Os valores na figura representam os fluxos no balanço de N medidos para o Cerrado descritos em uma revisão por Bustamante *et al.* (2006). Anammox - oxidação anaeróbia da amônia; DNRA - redução dissimilatória de nitrato para amônio; Norg - nitrogênio orgânico

Fonte: o autor.

Atualmente não se sabe quantos microrganismos diferentes fixam o nitrogênio nos solos. O processo é de suma importância em solos limitados pelo N, já que no resultado final do processo a amônia é incorporada à matéria orgânica do solo (ELSAS *et al.*, 2019). Além da fixação biológica de nitrogênio e a solubilização de fosfatos minerais, as bactérias podem promover o crescimento das plantas por meio do complexo bacteriano ferro/sideróforo, limitando a aquisição de ferro aos fitopatógenos (SOUZA *et al.*, 2020).

6 Solubilização de fosfato

Depois do nitrogênio, o fósforo é o elemento nutriente que mais limita a planta, restringindo a produção da cultura, caso haja deficiência (KHAN *et al.*, 2007). Esse elemento atua na respiração, na produção e armazenamento de energia, na divisão e crescimento celular e na constituição do DNA e RNA (DUARTE, 2016).

O P não possui forma gasosa em seu ciclo biogeoquímico, dessa forma, as plantas e microbiota edáfica necessitam conseguir o nutriente especificadamente dos solos. Para maximizar a disponibilidade do P algumas plantas alteram a rizosfera exsudando ácidos orgânicos (cítrico, málico e oxálico), reduzem o valor do pH, facilitando assim a dissolução de minerais apatíticos (ARCAND; SCHNEIDER, 2006). Os vegetais podem também aumentar e rearranjar seus sistemas radiculares, aumentar a eficiência dos transportadores de P nos tecidos, sintetizar as enzimas fosfatases ou estimular microrganismos produtores da mesma (RAMAEKERS *et. al.*, 2010). A disponibilidade de fósforo em solos é de cerca de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$, mas as plantas, para atingirem sua máxima produtividade, requerem bem mais que isso, ao que equivale aproximadamente $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ (JHA; SARAF, 2015). Segundo Duarte (2016) o fósforo possui forte capacidade de adsorção às partículas do solo, e, em solos ácidos como os de cerrado, possui alta capacidade de adsorção correlacionada aos óxidos de ferro e alumínio.

Os suprimentos globais de fosfato de rochas minerais disponíveis como fertilizantes agrícolas estão em escassez e podem durar apenas mais 50 anos (ELSAS *et al.*, 2019). Todavia, Khan *et al.*, (2007) sugerem que os depósitos de P acumulados nos solos seriam suficientes para sustentar a colheita máxima mundial durante 100 anos. O P inorgânico do solo ocorre principalmente em complexos minerais insolúveis, aparecendo após frequente aplicação do fertilizante; essas formas, quando precipitadas, não podem ser assimiladas pelas plantas; assim, os fertilizantes fosfatados aplicados em solos atingem apenas 30% de sua eficiência devido à fixação com esses minerais (SHARMA *et al.*, 2013).

Este é um grande desafio para a agricultura intensiva, que necessita desse mineral como macronutriente em culturas de interesse. Embora o fosfato seja incorporado às plantas e reciclado em adubos e resíduos, parte é perdida para corpos d'água, por lixiviação; além disso, as plantas não podem assimilar o P orgânico. O fosfato, quando liberado das frações orgânicas pelos microrganismos pode se ligar aos minerais do solo (Al e óxidos de Fe) para solos ácidos e em minerais contendo cálcio, no caso de solos calcários, deixando assim de ser disponível para as plantas. Esse P sequestrado é então liberado lentamente pelas ações de microrganismos

em conjunto com reações químicas e exsudados radiculares.

Estima-se que 70% do fertilizante fosfatado de base mineral ou orgânica ficam retidos no solo em formas não acessíveis para as plantas (PAVINATO *et al.*, 2020). Segundo Hinsinger (2001) isso ocorre devido à alta capacidade de fixação do P com argilas e óxidos provenientes do alto grau de intemperismo de solos tropicais, principalmente em suas camadas superficiais. Dessa forma, em condições tropicais, o solo acaba competindo com a planta pelo nutriente, o que favorece a maiores custos com adubações fosfatadas; assim, surge a capacidade de algumas espécies de fungos e bactérias de solubilizar ou mineralizar P, suprimindo a necessidade desse nutriente pela planta. A ação dos microrganismos solubilizadores ocorre por duas vias: (i) Pela liberação de ácidos orgânicos e inorgânicos por esses microrganismos que impulsionam a soltura de P de compostos como óxidos de ferro, de alumínio e de cálcio, tanto de solos como de rochas fosfatadas, em diferentes graus de reatividade (OWEN *et al.*, 2015); (ii) pela mineralização do P orgânico da matéria orgânica do solo, por meio de enzimas fitases e fosfatases liberadas por esses indivíduos (BINI; LOPES, 2016). Outros mecanismos de solubilização realizados por esses microrganismos já estão sendo descritos tais como a produção de fitormônios, exopolissacarídeos, sideróforos e biofilmes (SOUZA *et al.*, 2021).

7 Nutrientes para a cana-de-açúcar

O nitrogênio é um nutriente crucial, desempenha papel importante no metabolismo da planta, no rendimento e na qualidade; não há função na vida da planta da qual o nitrogênio não participe (MALAVOLTA; MORAES, 2007). A carência desse nutriente reflete diretamente na redução da síntese de clorofila e aminoácidos essenciais, e também na energia para a produção de carboidratos e esqueleto carbônico, o que reduz diretamente o desenvolvimento e produtividade da planta (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997). A necessidade por esse nutriente é suprida em partes pela adubação com fertilizantes, sendo a dosagem recomendada pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) de 100 Kg ha⁻¹ de N em soqueiras de cana-de-açúcar (AGUIAR *et al.*, 2014). As condições do ambiente e a disponibilidade desse nutriente em solos agrícolas podem mudar essa “dosagem ideal” podendo ocorrer uma super ou subestimação de adubação nitrogenada. Para Bhatt, Singh e Kashyap (2022) doses excessivas aumentaram os ataques de pragas e doenças à medida que aumentou a suculência das plantas e consequente redução da fibra.

O nitrogênio apresenta alta correlação entre o número de perfilhos e a produtividade do

canavial. A mineralização resulta em maior disponibilidade de N no solo, porém depende de vários fatores como textura do solo, precipitação recebida, conteúdo de matéria orgânica, variações na temperatura e intensidade no preparo do solo (BHATT; SINGH; KASHYAP, 2022). Além disso, estudo realizado por Oliveira *et al.* (2018) destacou a relevância da disponibilidade de P para melhor absorção relativa de N pela planta. Canas com suprimento suficiente de P apresentaram maior eficiência de extrair nitrato da solução do solo, apresentando também maior absorção pelo acúmulo de proteína nas folhas e raízes (RUFTY *et al.*, 1990).

O fósforo é o segundo nutriente mais exigido pela planta e seu metabolismo; sua presença está proporcionalmente associada ao crescimento, produtividade e qualidade traduzida em açúcares totais recuperáveis (ATR) da cana-de-açúcar. A disponibilidade desse nutriente para as plantas através das raízes depende de vários fatores físico-químicos como a textura, o pH e a umidade do solo (BHATT, 2020). Solos ácidos e alcalinos absorvem P nas formas H_2PO_4^- (dihidrogenofosfato) e $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ (monohidrogenofosfato), respectivamente em diferentes faixas de concentração (BHATT; OLIVEIRA; SILVA, 2021). Solos de Cerrado normalmente possuem uma elevada acidez, o que resulta em menores absorções de $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$. Solos deficientes do nutriente, com concentrações abaixo de $12,5 \text{ Kg ha}^{-1}$ de P disponível, a dosagem recomendada é de $30 \text{ Kg P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$, no entanto, existe uma tendência de aplicação de doses mais altas desse nutriente em culturas de cana-de-açúcar, já que sua aplicação tem aumentado à produtividade e qualidade da cultura e o fato dos fertilizantes fosfatados possuírem disponibilidade de P disponível diferentes. Latossolos vermelhos geralmente são notificados como deficientes de P, porém, em longo prazo altas doses de fertilizantes fosfatados podem comprometer a sustentabilidade com sérias implicações ecológicas (BHATT; OLIVEIRA; SILVA, 2021).

Dentre as diferentes formas de P mineral, fosfatos de alumínio (AlPO_4), tricálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e ferro (FePO_4) são muito pouco disponíveis para as canas; óxidos hidratados também reduzem a disponibilidade de P para vegetais (BHATT, 2020). As formas solúveis em água (H_2PO_4^- e $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$) e fosfato monocálcico ($(\text{CaH}_2\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) estão prontamente disponíveis para as plantas e os processos de fixação do nutriente devem ser seguidos conforme recomendado na região (BHATT; OLIVEIRA; SILVA, 2021). O pH do solo é outro fator muito relevante na disponibilidade de P para as plantas, sendo que, conforme Oliveira e Pavan (1996) houve aumento no teor de P de 4,8 para 24,2 quando houve a correção do pH a partir de 4,0 a 5,5. Segundo os autores, o aumento no pH a partir das referidas escalas, precipitam o alumínio

e disponibilizam o P no ambiente.

O potássio é o terceiro nutriente mais importante para canas e sua presença aumenta o sistema radicular, viabiliza o sistema de uso de água e N, reduz a incidência de pragas e aumenta significativamente a produtividade do canavial (BHATT; SINGH; KASHYAP, 2022). Da mineralogia argilosa dos solos, a presença de K está associada aos feldspatos e micas e a deficiência desse nutriente em cana-de-açúcar, afeta a eficiência do uso de N, o crescimento das raízes e o desenvolvimento dos perfilhos (BHATT; OLIVEIRA; SILVA, 2021). O teor de argila no solo reduz o processo de lixiviação do nutriente, favorecendo a eficiência no uso de K. Bhatt, Singh e Kashyap (2022) encontraram a melhor adubação de K que ficou determinada em 80 kg.K₂O ha⁻¹, quando da avaliação de crescimento, rendimento e qualidade da cana-de-açúcar. Coelho *et al.* (2008) descreveram em seu trabalho com o milho, sobre o diferente padrão do K em relação ao N e P, como sendo um nutriente mais absorvido na fase vegetativa e com alta taxa de acúmulo (superior ao N e P) nos primeiros 30 a 40 dias de desenvolvimento, sendo considerado como um elemento de arranque, por se tratar de um nutriente requerido na fase inicial da cultura.

De acordo com Oliveira *et al.* (2018) a exigência de macronutrientes em Kg t⁻¹ para a cultura de cana-de-açúcar, fica estabelecida em solos brasileiros como (1,51 para o nitrogênio; 0,40 para o fósforo; 1,80 para o potássio; 0,50 para o magnésio; 0,90 cálcio; 0,40 enxofre) e para micronutrientes em g t⁻¹ (8,0 ferro; 3,0 manganês; 0,6 zinco; 0,4 cobre; 0,3 boro e 0,032 para o molibdênio).

8 Nutrientes para os microrganismos

Nutrientes como carboidratos, lipídios, proteínas, vitaminas, minerais e água são essenciais para o metabolismo celular (NICOLAU, 2014). A matéria orgânica é considerada como fator limitante no crescimento de microrganismos heterotróficos. Assim, como os compostos inorgânicos, que dependendo de sua forma química e das condições do ambiente afetam ou inibem o crescimento microbiano. Dentre os compostos inorgânicos de importância para o crescimento dessas populações incluem os gases (O₂, CO₂, CO, H₂, N₂, N₂O e H₂S); o enxofre elementar, os cátions NH₄⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Si, Na⁺, K⁺, Bo, Co, Cu²⁺, Mn, Mo, Vn, Ni, Zn²⁺, Hg, Cd e Pb. Dentre os ânions: fosfatos, carbonatos, bicarbonatos, sulfuretos, sulfatos, nitritos, nitratos, cloretos, cloratos, brometos, fluoretos, silicatos, selenitos e arsenatos. Em relação aos metais pesados citados, estes comportam como elementos essenciais vestigiais,

sendo que baixas concentrações já são suficientes para transformá-los em tóxicos e/ou inibitórios para o crescimento microbiano (NICOLAU, 2014).

O fósforo é nutriente essencial, componente dos nucleotídeos, e participa no armazenamento e síntese de energia para o metabolismo celular (ATP, ADP e AMP), além de ser essencial na síntese dos fosfolipídeos de membrana. Contudo, elevadas concentrações desse nutriente podem inibir o desenvolvimento desses microrganismos. Em relação aos potenciais de solubilização, o tipo do fosfato e a fonte de carbono estão entre os principais fatores de participação decisiva no processo (SILVA FILHO; VIDOR, 2000).

O Fe, o Ca e o K participam do processo de solubilização de fosfatos; o Fe por ser constituinte de várias enzimas faz com que sua disponibilidade seja relacionada às vias metabólicas (SILVA FILHO; VIDOR, 2001). A solubilização de fosfatos é intensificada quando há liberações de ácidos orgânicos, assim a presença de microrganismos com esse metabolismo pode contribuir para melhorar esse processo.

O Ca por sua vez, é necessário às atividades enzimáticas e constituinte da membrana e sua ausência está ligada à maior solubilização de fosfatos desse elemento. O K também é participante das atividades enzimáticas, do metabolismo de carboidratos e do balanço iônico; sua deficiência maximiza a liberação de ácidos orgânicos (PARIS *et al.*, 1996).

O nitrogênio é um elemento indispensável para todas as fontes de vida é um constituinte plástico. Ele compõe parte integrante de aminoácidos, proteínas e coenzimas, mas para a maior parte dos microrganismos o N_2 é um gás inerte, sendo as bactérias fixadoras de azoto os principais microrganismos capazes de fixar o N_2 e converter em formas combinadas (NO^{3-} , NO^{2-} e NH^{4+}). Os íons amônio e nitrito são oxidados por algumas espécies quimiolitotróficas para produzir energia e o nitrato é utilizado no processo de respiração anaeróbica, resultando na liberação de N_2 para a atmosfera (NICOLAU, 2014).

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A. T da E.; GONÇALVES, C.; PATERNIANI, M. E. A. G. Z.; TUCCI, M. L. S.; CASTRO, C. E. F. de. Cana-de-açúcar. **In:** Boletim 200. Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas. Boletim IAC, n. 200, 7 ed., 452 p., 2014. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/publicacoes/arquivos/iacboletim200.pdf>. Acesso em: 14 mai. 2022.
- ALENCAR, A.; SHIMBO, J. Z.; LENTI, F.; MARQUES, C. B.; ZIMBRES, B.; ROSA, M.; ARRUDA, V.; CASTRO, I.; RIBEIRO, J. P. F. M.; VARELA, V.; ALENCAR, I.; PIONTEKOWSKI, V.; RIBEIRO, V.; BUSTAMANTE, M. M. C.; SANO, E. E.; BARROSO, M. Mapping Three Decades of Changes in the Brazilian Savanna Native Vegetation Using

Landsat Data Processed in the Google Earth Engine Platform. **Remote Sensing**, v. 12, p. 924, 2020. Disponível em: <file:///C:/Users/Professores/Downloads/remotesensing-12-00924.pdf>. Acesso em: 8 jun. 2022.

ARCAND, M. M.; SCHNEIDER, K. D. Plant- and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. **Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, p. 791-807, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/aabc/a/5TC6Z6RxRmK4yNHWnsvjYzt/?lang=en&format=html>. Acesso em: 17 mai. 2021.

BABALOLA, O. O. Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnol Lett**, v.32, p.1559-1570, 2010. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s10529-010-0347-0>. Acesso em: 10 ago. 2021.

BHATT, R. Resources Management for Sustainable Sugarcane Production. In: KUMAR, S.; MEENA, R. S.; JHARIYA, K. **Springer book**, Singapore, p. 650-685, 2020. Disponível em: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-15-6953-1_18. Acesso em: 14 jun. 2021.

BHATT, R.; P. SINGH; KASHYAP, L. Effect of irrigation and potash levels on growth, yield and quality of spring sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 92, p. 663-666, Punjab Agricultural University, Ludhiana, Punjab 143 521, India, 2022. Disponível em: http://www.researchgate.net/profile/Rajan-Bhatt/publication/361329027_Effect_of_irrigation_and_potash_levels_on_growth_yield_and_quality_of_spring_sugarcane_Saccharum_officinarum/links/62aaedf4938bee3e3f37b880/Effect-of-irrigation-and-potash-levels-on-growth-yield-and-quality-of-spring-sugarcane-Saccharum-officinarum.pdf. Acesso em: 20 ago. 2022.

BHATT, R.; OLIVEIRA, M. W.; SILVA, V. S. G. Sugarcane nutrition for food and environmental security, **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 6, p. 64431-64467, 2021. Disponível em: <http://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/32109/pdf>. Acesso em: 08 mai. 2022.

BINI, D.; LOPEZ, M. V. Transformações microbianas do fósforo. In: CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. (ed.). **Microbiologia do solo**. Piracicaba: ESALQ, 2016. p. 149-166. Disponível em: http://www.esalq.usp.br/biblioteca/sites/default/files/Microbiologia_solo.pdf. Acesso em: 08 mai. 2021.

CATTELAN, A. J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. (Embrapa soja documentos, 139), 36 p., 1999. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/461542/1/doc139.pdf>. Acesso em: 24 jun. 2022.

COELHO, A. M.; PITTA, G. L. E; ALVES, V. M. C.; FRANÇA, G. E.; COELHO, A. M.; FRANÇA, G. E. DE; PITTA, G. V. E.; ALVES, V. M. C.; HERNANI, L. C. **Cultivo do Milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 10 p. Sistemas de Produção, 4 ed., ISSN: 1679-012X, 2019. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/491015>. Acesso

em: 11 mai. 2022.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (Brasil). **Acompanhamento da safra brasileira: Cana-de-açúcar**, SAFRA 2019/20 - Segundo levantamento Brasília: Conab, v.6, n. 2, 2019. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>. Acesso em: 12 dez. 2020.

COSTA, E. M.; CARVALHO, F.; ESTEVES, J. A. NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. Resposta da soja à inoculação e co-inoculação com bactérias promotoras do crescimento vegetal e *Bradyrhizobium*. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, p. 1678-1689, 2014. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2014b/AGRARIAS/resposta%20da%20soja%20a%20inoculacao.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2022.

DIAS, A. C. F.; COSTA, F. E. C.; ANDREOTE, F. D.; LACAVA, P. T.; TEIXEIRA, M. A.; ASSUMPÇÃO, L. C.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 189-195, 2009. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11274-008-9878-0>. Acesso em: 17 mai. 2022.

DUARTE, J. L. **Solubilização de fosfatos por *Aspergillus niger*, *Penicillium islandicum* e ácidos orgânicos**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2016. Disponível em: <http://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/21331/1/texto%20completo.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2022.

FRANCO, A. A.; DÖBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 68-74, 1994.

GLICK, B. R.; PATTEN, C. L.; HOLGUIN, G.; PENROSE, D. M. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. **Imperial College Press**, London, p.187-189, 1999. Disponível em: http://books.google.com.br/books?hl=pt-PT&lr=&id=vPq3CgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP9&dq=Biochemical+and+genetic+mechanisms+used+by+plant+growth+promoting+bacteria&ots=7T2jB1xt2r&sig=kB7smZLPIB7UBp_mP3QN6L8YxzI#v=onepage&q=Biochemical%20and%20genetic%20mechanisms%20used%20by%20plant%20growth%20promoting%20bacteria&f=false. Acesso em: 21 jun. 2022.

HEIJDEN, M. G. A.; VAN, D. E. R; DARDGETT, R. D.; STRAALLEN, N. M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. **Ecology Letters**, v. 11, 296-310. 2008. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x>. Acesso em: 16 mai. 2022.

HINSINGER, P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. **Plant and Soil**, v. 237, p. 173-195, 2001. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1013351617532>. Acesso em: 14 abr. 2022.

HOWARD, J. B.; REES, D. C. Structural Basis of Biological Nitrogen Fixation, **Chemical**

Reviews, v.96, n.7, p. 2965-2982, 1996. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/cr9500545>. Acesso em: 18 abr. 2022.

INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais). **Programa de Monitoramento da Amazônia e Demais Biomas - Bioma Cerrado**. Disponível em: <http://terrabrasilis.dpi.inpe.br/downloads>. Acesso em: 12 ago. 2022.

JHA, C. K.; SARAF, M. Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): a review. **Journal of Agricultural Research and Development** v.5, n.2, p. 0108-0119, 2015. Disponível em: https://www.e3journals.org/cms/articles/1434021343_Chaitanya%20and%20Meenu.pdf. Acesso em: 09 jan. 2022.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; WANI, P. A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - A review. **Agronomy for Sustainable Development**, Springer Verlag/EDP Sciences/INRA, v. 27 n. 1, p. 29-43, 2007. Disponível em: <http://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00886352/document>. Acesso em: 14 mai. 2022.

MALAVOLTA, E.; MORAES, M. F. Fundamentos do nitrogênio e do enxofre na nutrição mineral das plantas cultivadas. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. S.; VITTI, G. C. (Ed). **Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira**. Piracicaba: IPNI Brasil, cap. 6, p. 189-249, 2007. Disponível em: [file:///C:/Users/Professores/Downloads/sed-70%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/Professores/Downloads/sed-70%20(2).pdf). Acesso em: 13 jun. 2021.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional de plantas**. 2. Ed. Piracicaba: Potafos, 319 p. 1997. Disponível em: <http://repositorio.usp.br/item/001070906>. Acesso em: 17 mai. 2021.

MCLEOD, M. L., CLEVELAND, C. C., LEKBERG, Y., MARON, J. L., PHILIPPOT, L., BRU, D.; CALLAWAY, R. M. Exotic invasive plants increase productivity, abundance of ammonia-oxidizing bacteria and nitrogen availability in intermountain grasslands. **Journal of Ecology**, v. 104, n. 3, p. 994-1002, 2016. Disponível em: <http://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/1365-2745.12584>. Acesso em: 19 mai. 2022.

MOROZKINA, E. V.; ZVYAGILSKAYA, R. A. Nitrate reductases: Structure, functions, and effect of stress factors, **Biochemistry**, Washington D. C., v. 72, n. 10, p. 1151-1160, 2007. Disponível em: <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18021072/>. Acesso em: 13 jul. 2021.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; CONSOLI, M. O mapa sucroenergético do Brasil. In: SOUSA, E. L. L.; MACEDO, I. C. (Coord.). **Etanol e bioeletricidade: a cana-de-açúcar no futuro da matriz energética**. São Paulo: Luc Projetos de Comunicação, 314 p., 2010.

NICOLAU, P. B. **Microrganismos e crescimento microbiano**. Universidade Aberta – Disponível em: http://repositorioaberto.uab.pt/bitstream/10400.2/6137/1/UT2_Microrganismos%20e%20crescimento%20microbiano_PBN.pdf. Acesso em: 10 fev. 2022.

NOOJIPADY, P.; MORTON, D.; MACEDO, M.; VICTORIA, D.; HUANG, C.; GIBBS, H.; BOLFE, E. Forest carbon emissions from cropland expansion in the Brazilian Cerrado biome.

Environmental Research Letters, v. 12, p. 1-12, 2017. Disponível em: <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1748-9326/aa5986/pdf>. Acesso em: 14 mai. 2022.

OLIVEIRA, B. de; JUNIOR, B. H. M.; MEWS, H. A.; VALADÃO, M. B. X.; MARIMON, B. S. Unraveling the ecosystem functions in the Amazonia– Cerrado transition: evidence of hyperdynamic nutrient cycling. **Plant Ecology**, v. 218, p. 225-239, 2017. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11258-016-0681-y>. Acesso em: 16 jun. 2022.

OLIVEIRA, M. W.; MACÊDO G. A. R.; MARTINS, J. A.; SILVA, V. S.; OLIVEIRA, A. B. Mineral Nutrition and Fertilization of Sugarcane. In: Alexandre Bosco de Oliveira. (Org.). **Sugarcane - Technology and Research**. Londres: IntechOpen, v. 1, p. 169-191, 2018. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?hl=pt-PT&lr=&id=gWiQDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA169&dq=Mineral+Nutrition+and+Fertilization+of+Sugarcane&ots=M0mMHagvEd&sig=0toSBKO0KScGFol8YvRO-w-PGbM#v=onepage&q=Mineral%20Nutrition%20and%20Fertilization%20of%20Sugarcane&f=false>. Acesso em: 14 jun. 2021.

OLIVEIRA, E. L.; PAVAN, M. A. Control of soil acidity in no-tillage system for soybean production. **Soil & Tillage Research**, v. 38, p. 47-57, 1996. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167198796010215>. Acesso em: 17 jun. 2022.

OWEN, D.; WILLIAMS, A.; GRIFFITH, G.; WITHERS, P. Use of commercial bioinoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. **Applied Soil Ecology**, v. 86, p. 41-54, 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0929139314002698>. Acesso em: 13 mai. 2022.

PARIS, F.; BOTTON, B.; LAPEYRIE, F. In vitro weathering of phlogopite by ectomycorrhizal fungi II: effect of K⁺ and Mg⁺⁺ deficiency and N sources on accumulation of oxalate and H⁺. **Plant and Soil**, v. 179, n. 1, p. 141-150, 1996. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/42946534>. Acesso em: 10 abr. 2022.

PAVINATO, P. S.; CHERUBIN, M. R.; SOLTANGHEIS, A.; ROCHA, G. C.; CHADWICK, D. R.; JONES, D. L. Revealing soil legacy phosphorus to promote sustainable agriculture in Brazil. **Scientific Reports**, v. 10, n. 15615, 2020. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-020-72302-1>. Acesso em: 12 jul. 2022.

PIRES, E. C. C. **Microbiologia do ciclo do nitrogênio em solos do cerrado**. 2016. Dissertação (Mestrado em Biologia Microbiana) - Universidade de Brasília, Brasília, 2016. Disponível em: http://mestrados.uemg.br/images/ppgciamb/docs/12_normas_dissertacao.pdf. Acesso em: 13 mai. 2022.

PROCÓPIO, L.; BARRETO, C. The soil microbiomes of the Brazilian Cerrado. **Journal of Soils and Sediments**, v. 21, p. 2327-2342, 2021. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11368-021-02936-9>. Acesso em: 08 mai. 2022.

PROJETO MAPBIOMAS – Mapeamento Anual de Cobertura e Uso da Terra no Brasil -

Coleção 6, 2021. Disponível em: http://mapbiomas-br.s3.amazonaws.com/Fact_Sheet_Colec%CC%A7a%CC%83o_6_Agosto_2021_27082021_OK_ALTA.pdf. Acesso em: 12 ago. 2022.

RAMAEKERS, L.; REMANS, R.; RAO, I. M.; BLAIR, M. W.; VANDERLEYDEN, J. Strategies for improving phosphorus acquisition efficiency of crop plants. **Field Crops Research**, v. 117, p. 169-176, 2010. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378429010000596>. Acesso em: 24 jan. 2021.

RAMALHO, J. F. G. P.; AMARAL SOBRINHO, N. M. B.; VELLOSO, A. C. X. Acúmulo de metais pesados em solos cultivados com cana-de-açúcar pelo uso contínuo de adubação fosfatada e água de irrigação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 23, n. 4, p. 971-979, Viçosa, 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/rbcs/a/xwJJYcwJyBB4s5PTyJf4jLn/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 19 jun. 2022.

REIS, T.; RUSSO G.; RIBEIRO, V.; MOUTINHO, P.; GUIMARÃES, A.; STABILE, M.; ALENCAR A.; CRISOSTOMO, A. C.; SILVA, D.; SHIMBO, J. **Climate challenges and opportunities in the Brazilian Cerrado**. IPAM: Documentos e Relatórios, p. 11, 2017. Disponível em: <http://ipam.org.br/wp-content/uploads/2017/11/PB-Cerrado-COP23-web.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2021.

RUFTY, T. W.; MACKOWN, C. T.; ISRAEL, D. W. Phosphorus stress effects on assimilation of nitrate. **Plant Physiology**, v. 94, p. 328-333, 1990. Disponível em: <http://academic.oup.com/plphys/article/94/1/328/6086090>. Acesso em: 16 ago. 2021.

SANO, E. E.; RODRIGUES, A. A.; MARTINS, E. S.; BETTIOL, G. M.; BUSTAMANTE, M. M. C.; BEZERRA, A. S.; COUTO JR., A. F.; VASCONCELOS, V.; SCHULER, J.; BOLFE, E. L. Cerrado ecoregions: A spatial framework to assess and prioritize Brazilian savanna environmental diversity for conservation. **Journal of Environmental Management**, v. 232, p. 818-828, 2019. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479718313732>. Acesso em: 14 jun. 2021.

SANO, E. E.; ROSA, R.; SCARAMUZZA, C. A. M.; ADAMI, M.; BOLFE, E. L.; COUTINHO, A. C.; ESQUERDO, J. C. D. M.; MAURANO, L. E. P.; NARVAES, I. S.; OLIVEIRA FILHO, F. J. B.; SILVA, E. B.; VICTORIA, D. C.; FERREIRA, L. G.; BRITO, J. L. S.; BAYMA, A. P.; OLIVEIRA, G. H.; SILVA, G. B. Dinâmica de uso da terra no Cerrado brasileiro no período de 2002 a 2013. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 54, e00138, 2019. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/pab/a/GQYcBYK993bQksGszxwkcsf/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 07 abr. 2022.

SHARMA, B. S.; SAYYED, R. Z.; TRIVEDI, M. H.; GOBI, T. A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus**, v. 2, n. 587, p. 2-14, 2013. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1186/2193-1801-2-587>. Acesso em: 13 out. 2021.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 24, n. 2, p. 311-319, 2000. Disponível em:

<http://www.scielo.br/j/rbcs/a/xqJhYNHYDmk5frXzGB9KMWw/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 19 mai. 2022.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 36, n. 2, p. 1495-1508, 2001. Disponível em:

<http://www.scielo.br/j/pab/a/VQ4pVFMWtFJWZwG8x6sbRYP/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 19 mai. 2022.

SILVA, V. N. **Interação de microrganismos na solubilização de fósforo e potássio de rochas para produção de biofertilizantes**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, RN, 2013. Disponível em: http://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/12652/1/InteracaoMicroorganismosSolubilizacao_Silva_2013.pdf. Acesso em: 26 jun. 2022.

SOUSA, S. M.; OLIVEIRA, C. A.; ANDRADE, D. L.; CARVALHO, C. G.; RIBEIRO, V. P.; PASTINA, M. M.; MARRIEL, I. E.; LANA, U. G. de P.; GOMES, E. A. Tropical *Bacillus* strains inoculation enhances maize root surface area, dry weight, nutrient uptake and grain yield. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 40, p. 867-877, 2021. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00344-020-10146-9>. Acesso em: 15 abr. 2022.

SOUZA, M. G.; CARVALHO, F.; OLIVEIRA-LONGATTI, S. M.; BARBOSA, L. P.; MOREIRA, F. M. S. Strains of paraburkholderia originated from rupestrian fields promote the growth of mimosa foliolosa. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 44, e4412, p. 1-9, 2020. Disponível em:

<http://www.scielo.br/j/rarv/a/36BBPMbGTYLkZ9YSGHCCW7s/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 15 abr. 2022.

UNEM – União nacional do etanol de milho. **Jornal A Gazeta**, 2020. Disponível em: <http://etanoldemilho.com.br/2020/02/03/a-hegemonia-do-etanol/>. Acesso em: 13 out. 2021.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Unicadata**. Disponível em: <http://www.unica.com.br/wp-content/uploads/2019/06/Relatorio-Atividades-201213-a-201819.pdf>. Acesso em: 14 out. 2021.

UNKOVICH, M. Isotope discrimination provides new insight into biological nitrogen fixation. **New Phytologist**, v. 198, p. 643-646, 2013. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/newphytologist.198.3.643>. Acesso em: 25 jun. 2021.

CAPÍTULO 3 – SOLUÇÕES EXTRATORAS MELHORAM A EXTRAÇÃO E A QUANTIFICAÇÃO DE CARGA MICROBIANA POR TÉCNICAS CONVENCIONAIS DE CULTIVO

RESUMO

Limitações na quantificação de microrganismos em análises microbiológicas convencionais de solos ocasionam erros experimentais. Além da dificuldade de fornecer todas as condições favoráveis para o crescimento microbiano, para que se desenvolva uma perfeita análise, é necessária a correta diluição da amostra, a qual é influenciada pelas características granulométricas específicas de cada solo. Esse estudo teve como objetivo avaliar diferentes combinações de soluções extratoras de solos. Avaliaram-se dois tipos de solo, um francoargiloso e outro francoarenoso. Nestes foram determinados o pH, a umidade atual e as análises granulométricas. Para diluição das amostras e posterior quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC.g⁻¹) do solo, utilizou-se as soluções extratoras de H₂O (água destilada), NaCl (cloreto de sódio) 0,9%, Na₄P₂O₇ (pirofosfato de sódio) 0,1% e C₆₄H₁₂₄O₂₆ (polisorbato Tween-80) 0,1%. A contagem de microrganismos foi feita por meio do método de diluição seriada e posterior semeadura em profundidade. Cada placa de Petri contendo 0,1mL da amostra foi incubada em meio ágar nutriente a 29°C. As leituras foram realizadas após 72 h e a quantificação de carga microbiana foi comparada entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As características granulométricas do solo afetaram a quantificação microbiana em ambientes de Cerrado do Triângulo Mineiro. A solução de H₂O⁺ Na₄P₂O₇⁺ C₆₄H₁₂₄O₂₆ possibilitou maior quantificação para solo francoarenoso e para solo francoargiloso, a solução de H₂O⁺ Na₄P₂O₇ foi a mais eficiente.

Palavras chave: Contagem. Microrganismos. Diluição. Granulometria.

CHAPTER 3. EXTRACTION/QUANTIFICATION OF MICROBIAL LOAD BY CONVENTIONAL CULTIVATION TECHNIQUES

ABSTRACT

Limitations in the quantification of microorganisms in conventional microbiological analyzes of soils cause experimental errors. In addition to the difficulty of providing all the favorable conditions for microbial growth, in order to develop a perfect analysis, the correct sample dilution is necessary, which is influenced by the specific granulometric characteristics of each soil. This study aimed to evaluate different combinations of soil extractor solutions. Two types of soil were evaluated, a clay loam and a sandy loam. In these, the pH, the current humidity and the granulometric analysis were determined. For sample dilution and subsequent quantification of colony forming units (CFU.g⁻¹) in the soil, extracting solutions of H₂O (distilled water), NaCl (sodium chloride) 0.9%, Na₄P₂O₇ (pyrophosphate of sodium) 0.1% and C₆₄H₁₂₄O₂₆ (Tween-80 polysorbate) 0.1%. Microorganisms were counted using the serial dilution method and

subsequent deep seeding. Each Petri dish containing 0.1mL of the sample was incubated in nutrient agar at 29°C. Readings were taken after 72 h and the quantification of microbial load was compared by Tukey's test at 5% probability. Soil granulometric characteristics affected microbial quantification in Cerrado environments in the Minas Gerais triangle. The $\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 + \text{C}_{64}\text{H}_{124}\text{O}_{26}$ solution allowed greater quantification for sandy loam soil and for clay loam soil, the $\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ solution was the most efficient.

Keywords: Count. microorganisms. Dilution. Granulometry.

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que são conhecidos apenas 1% das bactérias de solos, o cultivo e a quantificação destes microrganismos por técnicas convencionais é limitante, devido ao fato de que estes seres vivos necessitam ter todas as condições físicas e químicas necessárias a seu crescimento, sendo difícil otimizar estas condições em laboratório (STURSA *et al.*, 2009). Outro fator que pode afetar esta quantificação é a adequada diluição e homogeneização da amostra, sendo importante o desenvolvimento de novas metodologias para o seu estudo, as quais permitam quantificar o máximo possível destes microrganismos.

Os microrganismos provêm diversos serviços ecossistêmicos, como a ciclagem de nutrientes, a reciclagem de dejetos, a decomposição de material orgânico e o controle biológico. De acordo com Pires (2016) a população mundial depende diretamente dos microrganismos, quando relacionado à reciclagem de nutrientes e ao abastecimento da agricultura e pecuária. Os solos do bioma Cerrado são responsáveis por grande parte dessa produtividade agropecuária. Esses solos, devido à sua própria formação de origem e ao elevado processo de intemperismo, possuem a característica de serem naturalmente ácidos, com baixos teores de cátions e alta concentração de alumínio, o que os torna limitados para os sistemas agropastoris (FAGERIA; STONE, 1999). Conhecer as características físico-químicas e biológicas dos solos de Cerrado é de extrema importância, para que se possa atribuir adequadamente qual o tipo de manejo empregado para melhorar a produtividade.

Os mais variados métodos de extração podem ser a razão de resultados contraditórios, com diferentes conclusões em experimentos idênticos, no que se refere à análise da microbiota de solos. Extratos aquosos em diferentes relações solo e água foram utilizados por Silva *et al.* (2016), na quantificação da microbiota em diferentes manejos de solos. Varela (2012) também utiliza dessa mesma técnica de extração para análise de microrganismos em solos degradados por mineração de carvão. Bueno *et al.* (2018) quantificaram elevada formação de unidades

formadoras de colônias (UFCs) em solos de áreas agroflorestais, após extração das amostras em solução salina (0,85% NaCl). Há também trabalhos que utilizam soluções com pirofosfato de sódio e tween 80, como Santos e Batista (2015), que avaliaram a presença de bactérias em solos poluídos com resíduos sólidos domésticos e industriais. Moraes (2016) utilizou solução extratora de solo 0,1% de pirofosfato para a quantificação de bactérias totais em solos com plantio de milho e inoculados por bactérias promotoras de crescimento. O uso de indicadores biológicos como promotores de crescimento e desenvolvimento de culturas, tem sido adotado em programas de monitoramento, onde se avalia as alterações no solo e quantifica a sua qualidade (SILVEIRA, 2011). A riqueza microbiana é uma importante ferramenta para avaliar e quantificar a biodiversidade em ambientes terrestres.

A definição das fases sólida, líquida e gasosa do solo é de extrema importância na caracterização dos atributos físicos, químicos e biológicos; sobretudo na escolha da técnica a ser utilizada, por exemplo, na quantificação microbiana. A fase sólida (areia, silte e argila) possui característica maior de resistência a mudanças da fase inicial, as fases líquida e gasosa apresentam-se bastante variáveis, conforme o manejo empregado (SOUZA *et al.*, 2013).

O conhecimento da fase líquida, a solução do solo, é muito importante, pois é nessa fase que se pode monitorar a disponibilidade de nutrientes para as plantas, os processos de contaminação ambiental e a caracterização e quantificação de excesso de sais no solo (SOUZA *et al.*, 2013). É também nessa fase que se define quali e quantitativamente a carga microbiana. As hipóteses do estudo foram definidas como: Diferentes combinações de soluções extratoras possuem capacidade de diluições distintas. A textura dos solos, nesse caso arenoso e argiloso, influencia na interação das moléculas das soluções extratoras aplicadas. Esse trabalho tem por objetivo avaliar a eficiência de três componentes utilizados para extração de biomassa microbiana de solos, em diferentes combinações, em amostra de solo de Cerrado no município de Frutal, MG.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Áreas de estudo

O experimento foi realizado em duas áreas agrícolas de Cerrado, Fazenda Marmeleiro e Fazenda Mata da Chuva, ambas localizadas no município de Frutal, MG. Os solos são do tipo latossolo vermelho-amarelo, de média fertilidade (FERREIRA, 2002) e estão submetidos ao plantio de cana-de-açúcar. As amostras foram coletadas no período seco do mês de julho de

2020.

2.2 Método de coleta

Foram coletadas, na profundidade de 0-25 cm, amostras em quatro parcelas de cada propriedade, totalizando 8 amostras distintas. Os solos coletados foram colocados em sacos estéreis e conduzidos ao laboratório para análises. Efetuou-se então a homogeneização das parcelas por fundo agrícola, reduzindo para duas amostras no total.

2.3 Análises físico-químicas dos solos

Foram realizadas as análises de pH e umidade atual, conforme Teixeira *et al.* (2017). Em seguida, efetuou-se o preparo da amostra, obtendo-se a terra fina seca ao ar (TFSA) e a análise granulométrica, com a determinação em massa das frações componentes dos solos (TEIXEIRA *et al.*, 2017). Todas as análises foram feitas em triplicata.

2.3.1 Análise de pH do solo

Para medir o potencial hidrogeniônico, 10 g de solo foram pesadas e transferidas para um béquer de 50 mL. Adicionou-se então, 25 mL de água destilada e, com auxílio de bastão de vidro individual, realizou-se a homogeneização por aproximadamente 1 min. A mistura ficou em repouso por 1 h e pode-se então aferir o pH da solução, mergulhando o eletrodo combinado água e KCl a 3 mol L⁻¹.

2.3.2 Análise de umidade do solo

A determinação da umidade foi realizada utilizando-se cápsulas de porcelana, onde foram pesados em balança analítica de precisão, 30 g de solo úmido e colocados em estufa a 105°C por 24 h. Depois de retiradas da estufa, as cápsulas foram inseridas em dessecador com sílica indicadora de umidade, até que atingissem a temperatura ambiente. Após resfriadas, as cápsulas contendo os solos secos foram novamente pesadas na mesma balança de precisão analítica. O cálculo da umidade atual gravimétrica (kg kg⁻¹) pode ser determinado conforme equação abaixo.

$$U_g = \left(\frac{a-b}{b} \right)$$

Em que:

U_g = Umidade gravimétrica (kg kg⁻¹)

a = Massa amostra úmida (kg)

b = Massa amostra seca (kg)

2.3.3 Obtenção da TFSA (terra fina seca ao ar)

As amostras foram destorroadas manualmente e espalhadas sobre bandejas de papel kraft 180 g m² e colocadas em local seco e arejado, expostas ao sol, até completa dessecação ao ar.

2.3.4 Análise granulométrica

Primeiramente efetuou-se a medição da umidade residual do solo, conforme Teixeira *et al.* (2017), onde 10 g de TFSA foram pesados em cápsulas de porcelana previamente secas e taradas, e submetidos à temperatura de 105 °C por 24 h. Os cálculos para determinação de umidade residual e fator de correção de massa do solo foram feitos conforme especificados abaixo:

$$Ur = \left(\frac{a-b}{b} \right) \quad f = \frac{a}{b}$$

Em que:

Ur = Umidade residual em kg kg⁻¹.

f = fator usado para correção da massa de solo, utilizado para a massa de solo seca nas determinações em laboratório com a utilização de TFSA (Fator "f").

a = massa da amostra seca ao ar, em g.

b = massa da amostra seca em estufa a 105°C, em g.

Para a análise granulométrica, foram pesados 20 g de TFSA de cada amostra. Com auxílio de um funil de vidro, os solos foram transferidos para Erlenmeyers de 250 mL, utilizando para essa transferência 100 mL de água destilada. Adicionou-se à mistura 10 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol L⁻¹. Todos os frascos Erlenmeyers foram colocados em mesa agitadora, submetidos à rotação de 50 rpm por 16 h. Após o término rotacional, as amostras passaram por peneiras de malha 0,053 mm, as quais foram acopladas com o auxílio de funis, às provetas de 1000 mL. Todo o material retido foi lavado com água destilada, com cuidado para se evitar respingos, observando sempre o limite de volume das provetas. Após lavagem total do material retido nas peneiras, o volume de 1 L em cada proveta, foi completado utilizando água destilada. As areias retidas nas peneiras foram transferidas para béqueres previamente secos e tarados, sendo submetidas à secagem em estufa por 24 h à 105 °C. Após secagem e resfriamento, foram determinadas as frações de areia grossa e areia fina, submetendo a areia total em uma nova peneira de 0,212 mm. A fração retida e pesada constituiu a fração de areia grossa. A areia fina, que passou pela peneira, também foi pesada, anotando-se

o valor de sua massa.

Para a determinação de silte e argila foi utilizado o método da pipeta (TEIXEIRA *et al.*, 2017). Em outra proveta de 1000 mL foi preparada a prova controle, adicionando-se 10 mL de NaOH 1 mol L⁻¹ e completando o volume com água destilada. Com uma pipeta volumétrica, coletou-se então 25 mL da solução e transferiu para um béquer de 50 mL, previamente seco e tarado. A solução foi submetida à secagem em estufa por 24 h à 105°C. Após a secagem e resfriamento, mediu-se novamente a massa do béquer e reservou o resultado. Todas as soluções contidas nas provetas, inclusive a prova controle foram submetidas à aferição de temperatura da suspensão, utilizando um termômetro. Em seguida, todas as suspensões foram agitadas vigorosamente durante 1 min com bastões de vidro, coletando imediatamente 25 mL de cada solução sobrenadante. Da mesma forma, as soluções coletadas foram colocadas em béqueres de 50 mL, previamente secos e tarados e colocados em estufa por 24 h à 105°C. Aguardou-se o tempo de sedimentação da fração silte, seguindo a temperatura aferida da solução, conforme tempo descrito (Tabela 1).

Tabela 1 - Tempo de sedimentação calculado para a fração silte (0,002 mm < Ø < 0,05 mm) em função da temperatura da suspensão para a profundidade de 5 cm e para solos com densidade de partículas média de 2,65 kg dm⁻³, em determinação efetuada ao nível do mar

Temperatura (°C)	Tempo de sedimentação a 5 cm	
	Horas	Minutos
15	4	23
16	4	16
17	4	10
18	4	4
19	3	58
20	3	52
21	3	46
22	3	41
23	3	36
24	3	31
25	3	26
26	3	21
27	3	17
28	3	13
29	3	9
30	3	5

Fonte: Teixeira *et al.* (2017).

Passado o tempo de sedimentação da fração silte, foram retirados das soluções sobrenadantes, em triplicata, 25 mL de tal forma que não aprofundasse mais do que 5 cm na

proveta. As alíquotas foram transferidas para béqueres limpos, previamente secos e tarados, e foram levadas à estufa de secagem à 105°C durante 24 horas. Após resfriamento em dessecador, os béqueres foram pesados em balança com precisão de 0,0001 g. Todas as massas foram reservadas.

Os cálculos foram efetuados, conforme seguem equações.

$$S_m = \left(\frac{m_{af} \cdot f}{m_i} \right) + \left(\frac{(m_{at} - m_{af}) \cdot f}{m_i} \right) + \left(\frac{(m_{sa} - m_{ar}) \cdot f}{m_i \cdot R_v} \right) + \left(\frac{(m_{ar} - m_{br}) \cdot f}{m_i \cdot R_v} \right)$$

Em que:

S_m = Somatório da massa das frações, em g.

m_{af} = Massa de areia fina, em g.

m_{at} = Massa de areia total, em g.

m_{sa} = Massa de silte + argila, seca em estufa, em g.

m_{ar} = Massa de argila, seca em estufa, em g.

m_{br} = Massa do controle, seca em estufa, em g.

m_i = Massa inicial da amostra, em g.

R_v = Razão do volume pipetado para o volume total da proveta.

f = fator de correção de umidade para a massa inicial.

As concentrações de areia fina passaram pela equação:

$$T_{af} = \left(\frac{m_{af} \cdot f}{m_i} \right) \cdot \left(\frac{1000}{S_m} \right)$$

Em que:

T_{af} = concentração de areia fina, em g kg⁻¹.

m_i = massa inicial da amostra, em g.

m_{af} = massa de areia fina, em g.

f = fator de correção de umidade para a massa inicial.

S_m = Somatório da massa das frações, em g.

Para o cálculo de areia grossa, usou-se a seguinte equação:

$$T_{ag} = \left(\frac{(m_{at} - m_{af}) \cdot f}{m_i} \right) \cdot \left(\frac{1000}{S_m} \right)$$

Em que:

T_{ag} = concentração de areia grossa, em g kg⁻¹.

m_i = massa inicial da amostra, em g.

m_{at} = Massa de areia total, em g.

m_{af} = Massa de areia fina, em g.

f = fator de correção de umidade para a massa inicial.

S_m = Somatório da massa das frações, em g.

Equação da concentração de silte:

$$T_s = \left(\frac{(m_{sa} - m_{ar}) \cdot f}{m_i \cdot R_v} \right) \cdot \left(\frac{1000}{S_m} \right)$$

Em que:

T_s = concentração de silte, em g kg⁻¹.

m_i = massa inicial da amostra, em g.

m_{sa} = Massa de silte + argila, seca em estufa, em g.

m_{ar} = Massa de argila, seca em estufa, em g.

R_v = Razão do volume pipetado para o volume total da proveta.

f = fator de correção de umidade para a massa inicial.

S_m = Somatório da massa das frações, em g.

Para a concentração de argila:

$$T_{arg} = \left(\frac{(m_{ar} - m_{br}) \cdot f}{m_i \cdot R_v} \right) \cdot \left(\frac{1000}{S_m} \right)$$

Em que:

T_{ar} = concentração de argila, em g kg⁻¹.

m_i = massa inicial da amostra, em g.

m_{ar} = Massa de argila, seca em estufa, em g.

m_{br} = Massa do controle, seca em estufa, em g.

R_v = Razão do volume pipetado para o volume total da proveta.

f = fator de correção de umidade para a massa inicial.

S_m = Somatório da massa das frações, em g.

2.4 Métodos de extração dos solos

Foram avaliadas três metodologias estudadas, em diferentes combinações. Solução água

e solo 10% (SILVA *et al.*, 2016); solução NaCl 0,9% (BUENO *et al.*, 2018); solução pirofosfato 0,1% + tween 0,1% (SANTOS; BATISTA, 2015). O delineamento experimental foi de quatro repetições, totalizando 6 tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2 - Tratamentos utilizados como soluções extratoras de solo para análise microbiológica

Tratamentos		Concentrações
1	H ₂ O	100%
2	H ₂ O + NaCl	0,9% NaCl
3	H ₂ O + Na ₄ P ₂ O ₇	0,1% Na ₄ P ₂ O ₇
4	H ₂ O + C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆	0,1% C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆
5	H ₂ O + NaCl + C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆	0,9% NaCl + 0,1% C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆
6	H ₂ O + Na ₄ P ₂ O ₇ + C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆	0,1% Na ₄ P ₂ O ₇ + 0,1% C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆

H₂O = Água destilada; NaCl = Cloreto de sódio; Na₄P₂O₇ = Pirofosfato de sódio; C₆₄H₁₂₄O₂₆ = Tween 80.

2.5 Análises microbiológicas dos solos

Para a contagem de microrganismos totais, 10 g de cada amostra de solo rizosférico foram adicionados em Erlenmeyers de 250 mL, contendo 90 mL de cada solução extratora. As misturas foram submetidas à rotação de 300 rpm por 30 min. Após homogeneização, realizaram-se as diluições seriadas, onde 1,0 mL foram diluídos em 9,0 mL de solução salina 0,9 %. O mesmo procedimento foi realizado, até obtenção da concentração desejada. Dessa forma, as concentrações utilizadas no experimento são de 10⁻⁴ até 10⁻⁷. Em quadruplicata, alíquotas de 0,1 mL de cada concentração foram incubadas por "pour plate" em meio ágar nutriente. As placas contendo o inóculo foram mantidas em BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) em temperatura de 28 °C, durante 72 horas. Após esse período, realizou-se a contagem do número de colônias existentes, em contador de colônias com 6 X de aumento.

2.6 Análise estatística

Avaliou-se a quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC g⁻¹) de solo, sendo essa a variável dependente para a avaliação da eficiência das soluções extratoras. Assim, os resultados obtidos da contagem microbiológica foram associados ao maior ou menor grau de capacidade de diluição das soluções extratoras. As médias de cada UFCs foram comparadas entre si através do teste de Tukey 5% de probabilidade. Para a execução das análises foi utilizado o programa Agroestat versão 1.0 (BARBOSA; MALDONADO, 2010).

3 RESULTADOS

3.1 Análise de pH e umidade atual

Dos resultados obtidos em triplicata das análises de pH e umidade foram determinadas as médias, expressas na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados das médias de pH e umidade atual, com análise do desvio padrão, dos solos de Cerrado

	Fazenda Marmeleiro	Fazenda Mata da Chuva
Análise de pH	5,78 ± 0,62	6,20 ± 0,08
Análise de umidade atual (kg.kg ⁻¹)	0,096 ± 0,026	0,018 ± 0,0096

3.2 Análises granulométricas

As análises granulométricas também passaram pelo cálculo de média, sendo submetidas em seguida aos cálculos descritos na metodologia. Os resultados de todas as equações estão descritos na tabela 4.

Tabela 4 - Médias dos atributos granulométricos dos dois tipos de solos de Cerrado, submetidos ao plantio de cana de açúcar

Atributos granulométricos	Faz. Marmeleiro	Faz. Mata da Chuva
Umidade residual, em kg.kg ⁻¹	0,0014	0,0012
m _i = massa inicial da amostra, em g	20,000	20,000
m _{at} = Massa de areia total, em g	7,888	14,560
m _{af} = Massa de areia fina, em g	7,030	12,570
m _{br} = Massa do controle, seca em estufa, em g	0,0119	0,0119
m _{sa} = Massa de silte + argila, seca em estufa, em g	0,2836	0,1305
m _{ar} = Massa de argila, seca em estufa, em g	0,1890	0,0645
R _v = Razão do volume pipetado para o volume total da proveta	0,025	0,025
f = fator de correção de umidade para a massa inicial	1,0129	1,0057
S _m = Somatório da massa das frações, em g.	0,9499	0,9707
T _{af} = concentração de areia fina, em g kg ⁻¹	374,78	651,18
T _{ag} = concentração de areia grossa, em g kg ⁻¹	45,790	103,120
T _s = concentração de silte, em g kg ⁻¹	201,700	136,800
T _{ar} = concentração de argila, em g kg ⁻¹	377,730	108,990

A partir dos resultados da tabela 4 foram determinadas as frações das partículas formadoras de cada solo (Figura 1).

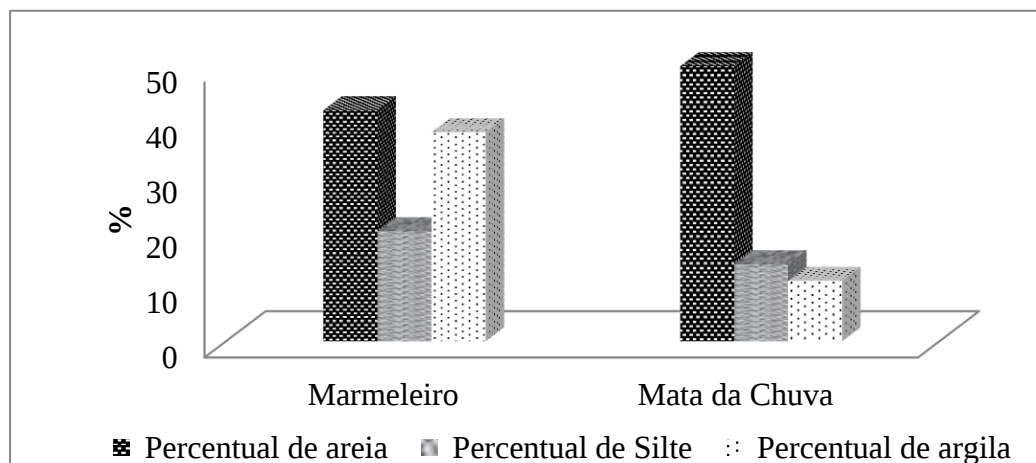


Figura 1 - Percentuais das frações de areia, silte e argila em dois solos submetidos ao plantio de cana de açúcar no Cerrado de Minas Gerais

Os solos foram classificados como francoargiloso (Faz. Marmeleiro) e francoarenoso (Faz. Mata da Chuva) de acordo com o triângulo de classes texturais do solo (Manual técnico de pedologia - IBGE, 2015).

3.3 Análises microbiológicas

A Tabela 5 demonstra os resultados obtidos nas amostras das fazendas analisadas entre os tratamentos avaliados.

Tabela 5 - Médias dos valores de unidades formadoras de colônia (10^4 UFC g^{-1}) após 72 horas de incubação em meio Ágar Nutriente, utilizando diferentes soluções extratoras

Tratamentos	Faz. Marmeleiro	Faz. Mata da Chuva
1 H ₂ O	2,500 c	2,500 b
2 H ₂ O + NaCl	2,500 c	20,000 b
3 H ₂ O + Na ₄ P ₂ O ₇	177,500 a	77,500 b
4 H ₂ O + C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆	12,500 c	20,000 b
5 H ₂ O + NaCl + C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆	107,500 b	10,000 b
6 H ₂ O + Na ₄ P ₂ O ₇ + C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆	20,000 c	427,500 a
DMS (5%)	41,622	155,533

Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey probabilidade a 5%.

4 DISCUSSÕES

O crescimento das comunidades de bactérias foi influenciado por fatores ambientais, como o pH e granulometria, que interferiram no número de bactérias. Quanto ao pH a Fazenda

Mata da Chuva foi a que apresentou o valor mais elevado e os menores de umidade, neste solo foi onde se observou o maior número de bactérias (Tabela 3/Gráfico 1). A maior parte das bactérias de solo tendem a apresentar maior crescimento em pH neutro, entre (6.5 a 7.5) (SUDHARHSAN *et al.*, 2007). A variação sazonal da comunidade de bactérias pode ser afetada pela umidade do solo (BUTENSCHOEN; SCHEU; EISENHAUER, 2011). No presente trabalho a umidade não afetou no número de bactérias.

Em relação às análises granulométricas foi determinado maior percentual de areia para a Fazenda Mata da Chuva e também onde se obteve os maiores valores de carga microbiana na solução de $\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 + \text{C}_{64}\text{H}_{124}\text{O}_{26}$; a Fazenda Marmeleiro foi classificada como um solo francoargiloso e o maior valor de carga microbiana foi observado na solução de $\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (Tabela 3/Gráfico 1). Estes resultados evidenciam a relevância da utilização correta da solução extratora, sendo importante uma padronização do método levando em consideração as características granulométricas do solo.

A água é um extrator natural sendo frequentemente usada para extração do carbono da biomassa microbiana do solo em ecologia microbiana (HANEY *et al.*, 1999). Neste trabalho, a solução extratora composta apenas por água destilada (tratamento 1) foi a que apresentou menor eficiência, sendo o valor para UFC g^{-1} igual a $2,50 \cdot 10^4$ para ambas as amostras de solo. Silva *et al.* (2016) encontraram valores superiores a $7 \cdot 10^6$ UFC g^{-1} em solos de olericultura, utilizando apenas água destilada como solução extratora. Valores inferiores foram relatados por Silva *et al.* (2009) utilizando a mesma solução extratora em áreas de floresta tropical, os quais determinaram a contagem média da ordem de 10^3 UFC g^{-1} para fungos e 10^5 UFC g^{-1} para bactérias, por grama de solo. No entanto, é importante mencionar que os valores de UFC g^{-1} são afetados pelas propriedades do solo, não devendo ser comparados diretamente.

A adição de NaCl a água (tratamento 2) não acarretou em diferença estatística significativa entre os tratamentos (1 e 2), para os valores obtidos de UFC g^{-1} (Tabela 5). Bueno *et al.* (2018), avaliando indicadores microbiológicos em sistemas agroflorestais, encontraram bactérias aeróbias da ordem de 10^9 UFC g^{-1} de solo em seu trabalho, utilizando como solução extratora NaCl 0,85 %. Esses resultados não conferem com os dados desse trabalho, já que esse tipo de solução possui baixa capacidade de diluição do material avaliado; por isso a importância de se conhecer a granulometria do solo analisado e utilizar a solução extratora ideal para melhor eficácia analítica.

Com base na mineralogia das duas amostras de solo estudadas, não é surpreendente que

a extração com a solução aquosa de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 0,1 % m m⁻¹ (tratamento 3) tenha revelado um valor estatisticamente superior de UFCs para amostra extraída do solo francoargiloso (Tabela 5), uma vez que a extração da biomassa microbiana com essa solução, pode ser atribuída a capacidade do $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ de quelar com íons metálicos, Ca^{2+} e trivalentes, presentes no solo (Hall *et al.*, 1996). Moraes (2016) utilizando solução extratora de solo $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 0,1 % m m⁻¹, em avaliação de desenvolvimento do milho, quantificou bactérias totais da ordem de 10⁶ em solos inoculados com *Azospirillum brasilense*. Os resultados registrados para a solução aquosa de tween 80 0,1% m/m (tratamento 4), revelaram uma baixa eficiência de extração em ambas as amostras de solo, com valores de UFC g⁻¹ estatisticamente iguais àqueles registrados para os tratamentos 1 e 2, para ambas as amostras de solo (Tabela 5). De fato, é sabido que a sorção do tween 80 em solos influencia significativamente na capacidade de solubilização da matéria orgânica, isto é, leva à redução dos níveis do surfactante para a extração da biomassa microbiana. Ademais, os minerais de argila dominam a sorção do tween 80 mesmo em baixa concentração (KANG *et al.*, 2015).

Segundo Kang *et al.* (2015), surfactantes aniônicos reduzem a adsorção de surfactantes não aniônicos; no caso desse trabalho, o $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ limita a adsorção do tween 80 em solos, principalmente argilosos. Esse fato está de acordo com os resultados obtidos no (tratamento 6), em que, solos de textura arenosa possuem maior porosidade e melhor superfície de contato, o que favoreceram as reações da solução extratora com os grãos de areia, permitindo uma maior quantificação de biomassa microbiana. Santos e Batista (2015) utilizaram solução extratora de solos contendo (0,1% $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ + 0,1% de tween 80). Os autores descrevem sobre os seus resultados contraditórios aos demais trabalhos citados, já que a maior contagem de UFCs foi determinada em período seco e não chuvoso, como citado pela maioria dos autores. Lanza, Monteiro e Malheiro (2004), em conformidade com esse trabalho, evidenciaram um maior desenvolvimento do fungo *Metharizium anisopliae* em solos com textura areno-argilosas. Segundo os autores, texturas argilosas reduzem a porosidade e aumentam a retenção hídrica, o que dificulta a aeração e a exploração nutricional do solo pelo microrganismo.

5 CONCLUSÕES

As características granulométricas do solo afetam a quantificação microbiana em ambientes de cerrado do triângulo mineiro.

Para melhorar a eficiência dos métodos tradicionais de contagem de microrganismos é

importante a padronização das soluções extratoras.

Neste trabalho, a solução de $\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 + \text{C}_{64}\text{H}_{124}\text{O}_{26}$ é a que possibilitou maior quantificação para solos francoarenosos, com até 75% de areia; para solos francoargilosos, com maior porcentagem de argila, a solução de $\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ é a mais eficiente.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, J. C.; MALDONADO JR., W. **AgroEstat**: sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos. Versão 1.0. Jaboticabal: Departamento de Ciências Exatas, 2010.

BUENO, P. A. A., OLIVEIRA, V. M. T. de, GUALDI, B. L., SILVEIRA, P. H. N., PEREIRA, R. G., FREITAS, C. E. S. de, BUENO, R. de O., SEKINE, E. S., SCHWARCZ, K. D. Indicadores microbiológicos de qualidade do solo em recuperação de um sistema agroflorestal. **Acta Brasiliensis**, v. 2, p. 40-44, 2018. Disponível em: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=BR2018V00000>. Acesso em: 10 jan. 2021.

BUTENSCHOEN, O.; SCHEU, S.; EISENHAUER, N. Interactive effects of warming, soil humidity and plant diversity on litter decomposition and microbial activity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, p. 1902-1907, 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0038071711002045>. Acesso em: 10 jan. 2021.

FAGERIA, N. K.; STONE, L. F. **Manejo da acidez dos solos de Cerrado e de várzea do Brasil**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 92). ISSN 1516-7518. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/207078/1/doc92.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2021.

FERREIRA, J. **Original história de Frutal**: registros de fatos pessoais e de conhecimentos históricos de Frutal. Frutal: Oficina das Artes, 2002.

HALL, G. E. M.; VAIVE, J. E.; MACLAURIN, A. I. Analytical aspects of the application of sodium pyrophosphate reagent in the specific extraction of the labile organic component of humus and soils. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 56, p. 23-36, 1996. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0375674295000461>. Acesso em: 11 fev. 2021.

HANEY, R. L.; FRANZLUEBBERS, A. J.; HONS, F. M.; ZUBERER, D. A. Soil C extracted with water or K_2SO_4 : pH effect on determination of microbial biomass. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 79, n. 74, p. 529-533, 1999. Disponível em: <http://cdnsiencepub.com/doi/10.4141/S99-011>. Acesso em: 11 fev. 2021.

KANG, S.; JEONG, H. Y. Sorption of a nonionic surfactant Tween 80 by minerals and soils. **Journal of Hazardous Materials**, v. 284, p. 143-150, 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304389414009108>. Acesso em: 21

jan. 2021.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Manual técnico de pedologia:** Guia prático de campo. Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <http://pt.scribd.com/document/305768716/Manual-Tecnico-de-Pedologia-Guia-Pratico-de-Campo>. Acesso em: 20 jan. 2021.

LANZA, L. M.; MONTEIRO, A. C.; MALHEIROS, E. B. População de *Metarhizium anisopliae* em diferentes tipos e graus de compactação do solo. **Ciência Rural**, v. 34, n. 6, p. 1757-1762, 2004. Disponível em: <http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/29299/S0103-84782004000600014.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 10 mar. 2021.

MORAES, C. **Azospirillum brasilense e um isolado solubilizador de fósforo em milho.** 2016. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal, São Paulo, 2016. Disponível em: http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/141935/moraes_c_dr_jabo_int.pdf?sequence=4&isAllowed=y. Acesso em: 13 mar. 2021.

PIRES, E. C. C. **Microbiologia do ciclo do nitrogênio em solos do Cerrado.** 2016. Tese (Doutorado em Biologia Microbiana – Departamento de Biologia Celular) - Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2016. Disponível em: http://mestrados.uemg.br/images/ppgciamb/docs/12_normas_dissertacao.pdf. Acesso em: 23 fev. 2021.

SANTOS, A. P. A.; BATISTA, S. B. Isolamento e caracterização fenotípica de micro-organismos isolados de solo poluído por resíduos sólidos do bairro carrapicho município de várzea grande – Mato Grosso. **Connection Line**. n. 12, p. 29-43, 2015. Disponível em: <http://www.periodicos.univag.com.br/index.php/CONNECTIONLINE/article/view/198/452>. Acesso em: 23 fev. 2021.

SILVA, F. C.; SANTANA, I. J.; MARTINS, R. D.; LEMES, N. M.; RIETJENS A. R.; LIMA, M. L. P. Quantificação da microbiota e diversidade ecológica da meso e macrofauna do solo sob diferentes usos no município de Urutaí (região Sudeste Goiano). **Multi-Science Journal**, v. 1, n. 4, p. 12-18, 2016. Disponível em: <https://periodicos.ifgoiano.edu.br/index.php/multiscience/article/view/112>. Acesso em 12 mar. 2021.

SILVA, R. B.; MOURA, Q.; RODRIGUES, H.; BARRETO, P.; NUNES, H.; RODRIGUES, R.; SANTOS, S.; RUIVO, M. L. Estudo das colônias de fungos e bactérias em solos de floresta tropical associada à variação das chuvas da região. CONGRESSO BRASILEIRO DE METEOROLOGIA, 2009, João Pessoa. **Anais [...]**. João Pessoa, 2009. Disponível em: file:///C:/Users/Lab-biologia/Downloads/CBMEt457_52866.pdf. Acesso em: 13 mar. 2021.

SILVEIRA, A. O. **Avaliação de metodologias para o monitoramento da qualidade do solo.** 2011. Tese (Doutorado em Ciência do solo) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/61140/000864565.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

wed=y. Acesso em: 13 mar. 2021.

SOUZA, E. R.; MELO, H. F.; ALMEIDA, B. G.; MELO, D. V. M. Comparação de métodos de extração da solução do solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 5, p. 510-517, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/rbeaa/a/YvKLNZq6RjJb8Wc9SZQZGhx/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 14 abr. 2021.

ŠTURSA, P.; UHLÍK O.; KURZAWOVÁ V.; KOUBEK, J.; IONESCU, M.; STROHALM M., LOVECKÁ P., MACEK T., MACKOVÁ M. Approaches for diversity analysis of cultivable and non-cultivable bacteria in real soil. **Plant Soil Environ**, v. 55, p. 389-396, 2009. Disponível em: http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/136_2009-PSE.pdf. Acesso em: 13 abr. 2021.

SUDHARHSAN, S.; SENTHILKUMAR, S.; RANJITH, K. Physical and nutritional factors affecting the production of amylase from species of *Bacillus* isolated from spoiled food waste. **African Journal Biotechnology**, v. 6, p. 430-435, 2007. Disponível em: <file:///C:/Users/Lab-biologia/Downloads/56233-Article%20Text-95370-1-10-20100707.pdf>. Acesso em: 13 abr. 2021.

TEIXEIRA, P. C.; DONAGEMMA, G. K.; FONTANA, A.; TEIXEIRA, W. G. **Manual de métodos de análises de solo**. Brasília, DF: EMBRAPA, 2017. Disponível em: <file:///C:/Users/Lab-biologia/Downloads/Manual-de-Metodos-de-Analise-de-Solo-2017.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2021.

VARELA, R. B. **Caracterização da comunidade microbiana do solo de áreas em reabilitação pela atividade carbonífera no município de Treviso, Santa Catarina**. TCC (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, Criciúma, Santa Catarina, 2012. Disponível em: <http://repositorio.unesc.net/bitstream/1/1424/1/Roger%20Bitencourt%20Varela.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2021.

CAPÍTULO 4 – CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DE SOLOS DE CERRADO DO TRIÂNGULO MINEIRO, COM PLANTIO DE CANA-DE-AÇÚCAR: SELEÇÃO E ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS FIXADORES DE NITROGÊNIO E SOLUBILIZADORES DE FOSFATO

RESUMO

O cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, a utilização de áreas de Cerrado para atividades agrícolas tem se intensificado. É um bioma heterogêneo, quando relacionado à rica biodiversidade de fauna, flora e também microbiana. Assim, este trabalho teve por objetivo quantificar microrganismos de solos de áreas agrícolas com plantio de cana-de-açúcar e selecionar, isolar e multiplicar espécies autóctones que apresentem potencial para aplicação agrícola na fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato. Solos coletados na profundidade de 0-20cm das fazendas Mata da Chuva, Marmeleiro, Bom Jardim, Salin, Tia Pal e Canatech, foram caracterizadas quanto às características físico-químicas (granulometria, pH e umidade) e microbiológicas (bactérias e fungos totais, bactérias fixadoras de nitrogênio e solubilizadoras de fosfato). Foram isoladas 10 colônias entre todas as amostras avaliadas, não necessariamente 1 em cada amostra, utilizando características como cor, aspecto, tamanho e formas de crescimento. Nestas bactérias foi avaliada a atividade de nitrogênio e halo de solubilização de fosfato. Observou-se que a umidade favorece a presença de fungos e bactérias solubilizadoras de fosfato, porém não está relacionada à riqueza de fixadoras de nitrogênio. A granulometria do solo foi importante para definir a melhor solução para quantificar a maior riqueza de Unidades Formadoras de Colônia (UFC). A característica de produzir a enzima nitrogenase não dependeu da densidade populacional das espécies, sendo característica da estirpe de seleção. Quatro espécies de microrganismos autóctones, duas fixadoras de nitrogênio e duas solubilizadoras de fosfato, com potencial para aplicação e reinoculação na cultura de cana-de-açúcar foram selecionadas. Os inoculantes microbianos podem ser alternativas viáveis para substituição ou complementação ao consumo de insumos químicos. Assim, faz-se necessário o isolamento e a caracterização de microrganismos autóctones que são mais adaptados ao ambiente de produção e que permaneçam por mais tempo no solo.

1 INTRODUÇÃO

Desde a chamada Revolução Verde, início da década de 60, iniciou-se a utilização massiva de agrotóxicos, maquinários e sementes modificadas geneticamente, tudo em busca de grandes

produtividades (LOPES, 2017). Esse uso contínuo de agrotóxicos desencadeou grande degradação das terras agrícolas, pois afeta de forma irreversível áreas agrícolas de grandes extensões, além de reduzir o rendimento das culturas nesses ambientes (RAI *et al.*, 2020). Além disso, essas produções não sustentáveis prejudicam o meio ambiente, poluindo recursos hídricos, o solo e o ar; além do aumento nos custos de produção, já que são produtos de alto custo aquisitivo (PIETRO SOUZA *et al.*, 2020). Dessa forma, são necessárias técnicas de manejo agrícola que possam substituir esses métodos de aplicação ofensivos, as quais visem ao desenvolvimento de tecnologias alternativas, garantam rendimentos com viabilidade econômica e proteção aos alimentos, realizando assim, uma abordagem sustentável em busca do equilíbrio ecológico em longo prazo (SINGH; SINGH; PAL, 2017).

Práticas como rotação de culturas, desenvolvimento de cultivares, consórcio, uso de cobertura, foram desenvolvidas a algumas décadas, porém não estão sendo bem aplicadas para mitigar impactos negativos de degradação de áreas (ABHILASH *et al.*, 2016). O uso de microrganismos promotores de crescimento vegetal, como rizobactérias e fungos deve ser complementado como alternativa racional e segura (LOPES *et al.*, 2020). Os microrganismos desempenham funções centrais, já que exercem importantes processos nos solos; eles conduzem os ciclos dos nutrientes e, sem a presença desses, muitos elementos essenciais não estariam disponíveis para as plantas; exercem também a solubilização de minerais dos solos, fornecendo os macronutrientes P, K, S, Ca e Mg, além de uma gama de micronutrientes (B, Cl, Cu, Fe, Mn, Mo e Zn) (ELSAS *et al.*, 2019).

As rizobactérias exercem efeitos benéficos para os vegetais por dois mecanismos de ação, os diretos (fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de fitormônios) ou indiretos (produção de sideróforos e formação de biofilme) (SINGH *et al.*, 2017). Os gêneros de bactérias (*Acetobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Klebsiella* e *Serratia*) foram designados como capazes de promover o desenvolvimento vegetal, aumento na produtividade de grãos, incremento na emergência de sementes, adição de biomassa vegetal, resistência às pragas e doenças e acréscimo no rendimento de colheita (KANG *et al.*, 2019). Esse processo é muito importante em solos limitados pelo N, já que no resultado final do processo, a amônia é incorporada à matéria orgânica do solo (ELSAS *et al.*, 2019). Uma grande diversidade de funções microbianas foi descoberta para o enriquecimento dos solos, uma infinidade de fixadores de nitrogênio, oxidantes de amônia, redutores de nitrato, sulfato e ferro, fermentadores e degradadores aeróbicos de carbono orgânico. Dessa forma o solo tem se apresentado como um local de grandes e diferentes funcionalidades microbianas (ELSAS *et al.*, 2019). A mineralização resulta

em maior disponibilidade de N no solo, porém depende de vários fatores como textura do solo, precipitação recebida, conteúdo de matéria orgânica, variações na temperatura e intensidade no preparo do solo (BHATT; SINGH; KASHYAP, 2022).

A produção e utilização de microrganismos promotores de crescimento no mercado produtivo são ainda muito limitadas, por questões inconsistentes de trabalhos científicos e pela dificuldade de aplicação em campo; essa realidade necessita de estudos aprofundados que contribuam para o avanço científico e com a aplicabilidade nos sistemas agrícolas (KANG *et al.*, 2019). A gestão no desenvolvimento desse mercado de promotores biológicos de crescimento da cultura é muito importante, de acordo com Sharma *et al.* (2013) o microrganismo que apresenta melhor atividade *in vitro* pode não desenvolver o esperado no campo; além disso espécies de determinados tipos de solos podem não ser tão eficientes em ambientes diferentes.

Sabe-se que áreas com alta produtividade agrícola de cana-de-açúcar apresentam diversidade e quantidade de microrganismos que possibilitam maior aproveitamento dos elementos químicos do solo pela planta. Assim, o estudo da interação microrganismos-solo-planta nessas áreas, pode levar ao isolamento e caracterização de bactérias autóctones, permitindo a reutilização em áreas de baixa fertilidade. Diante do contexto, o objetivo desse trabalho foi quantificar microrganismos de solos de áreas agrícolas com plantio de cana-de-açúcar, selecionar e isolar bactérias autóctones que apresentem potencial para aplicação agrícola na fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Áreas de estudo

Foram selecionados solos de fundos agrícolas submetidos ao plantio de cana-de-açúcar para avaliação da riqueza da microbiota. Foram cinco propriedades localizadas no município de Frutal-MG e uma no município de Itapagipe-MG. Foram coletadas três amostras de solo rizosférico 0-20 cm de profundidade em cada fazenda, em pontos aleatórios, resultando em apenas uma amostra homogênea de cada fundo agrícola. As localizações geográficas dos solos estudados foram representadas (Figura 1).

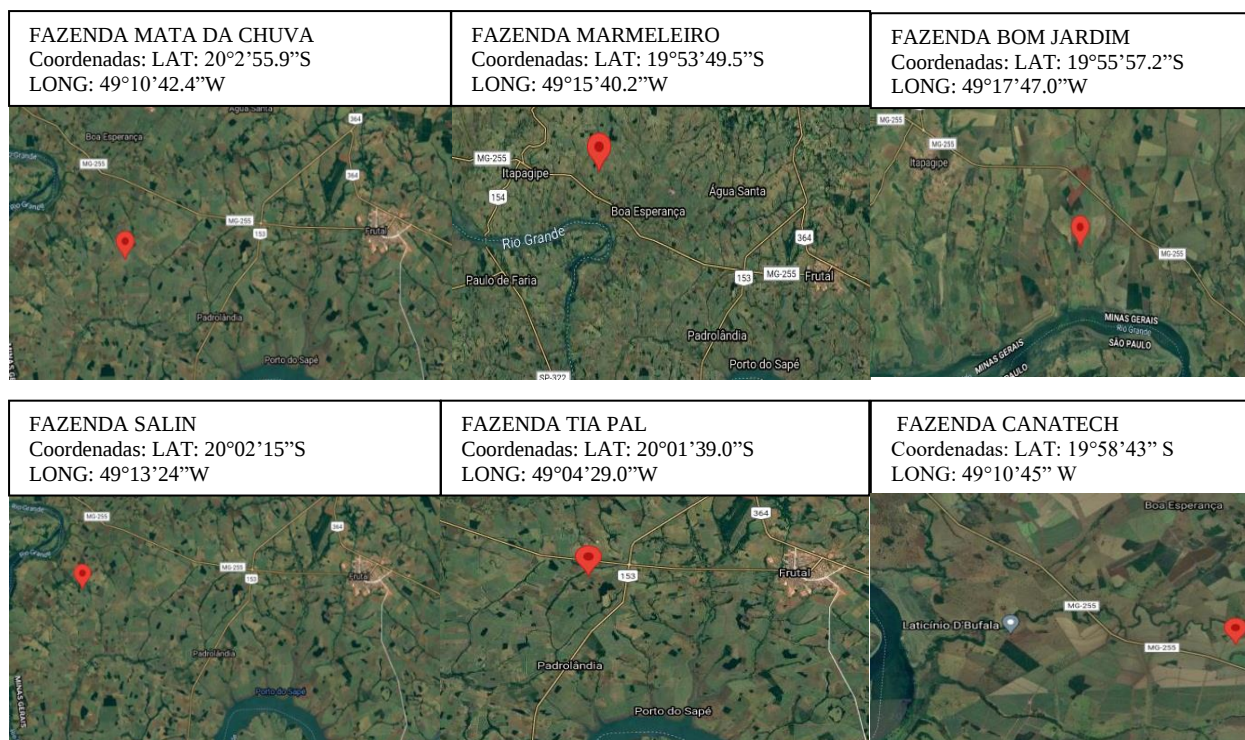


Figura 1 – Representação geográfica dos fundos agrícolas estudados por inserção de coordenadas.

Fonte: Google maps, 2021.

Os seis fundos agrícolas estudados: Fazenda Mata da Chuva, Fazenda Marmeleiro, Fazenda Bom Jardim, Fazenda Salin, Fazenda Tia Pal e Fazenda Canatech. As escolhas dos fundos agrícolas foram feitas em parceria com a empresa M.S. Fernandes Consultoria Agrícola, que auxiliou nas coletas de solo. São áreas que estão submetidas ao plantio de canaviais há mais de 3 anos e, conhecer as características desses solos, principalmente a riqueza da microbiota é de extrema importância frente às questões econômicas e ambientais.

Todas as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, devidamente identificadas, e enviadas ao laboratório da Universidade do Estado de Minas Gerais, unidade de Frutal, para análises posteriores.

2.2 Análises físico-químicas

2.2.1 pH do solo em água destilada (EMBRAPA, 1997).

Foram colocados 10 gramas de solo em béquer de 50 mL numerado; acrescentou-se com uma proveta 25 mL de água destilada. As amostras foram agitadas com um bastão de vidro e

permaneceram em repouso por 1 hora. Após esse período, mergulhou-se o eletrodo na suspensão e procedeu-se a leitura do pH. As análises foram feitas em triplicata.

2.2.2 Umidade (EMBRAPA, 1997).

Foram pesados em triplicata, 30 g da amostra, sendo condicionadas em cápsulas de porcelana, previamente secas em estufa por 1h e resfriadas em dessecador, anotando o peso do recipiente e tara da balança. As amostras foram colocadas em estufa a 105°C por 24 h; após o tempo de secagem foram colocadas no dessecador por 1 h. Ao esfriar, pesaram-se novamente as amostras, sendo calculada a umidade atual em porcentagem, conforme equação.

Umidade $100 \cdot (A-B)/B$

Peso da amostra úmida (A)

Peso de amostra seca (B)

Os resultados da triplicata foram utilizados no cálculo da média analítica de cada tipo de solo.

2.2.3 Obtenção da TFSA (terra fina seca ao ar)

As amostras foram destorroadas manualmente e espalhadas sobre bandejas de papel kraft 180 g m² e colocadas em local seco e arejado, expostas ao sol, até completa dessecação ao ar.

2.2.4 Análise granulométrica

Essa análise foi realizada para determinação das frações de areia, silte e argila de todos os solos analisados. Conhecer a textura dos solos é muito importante para que se consiga realizar a melhor forma de extração das amostras. No final, a textura de cada solo foi definida de acordo com o triângulo de classes texturais do solo (Manual técnico de pedologia - IBGE, 2015).

Primeiramente realizou-se a taxa de umidade residual do solo (EMBRAPA, 2017), onde 10 g de TFSA foram pesadas em cápsulas de porcelana previamente secas e taradas, e submetidas à temperatura de 105°C por 24 h. Os cálculos para determinação de umidade residual e fator de correção de massa do solo foram feitos conforme equação:

$$Ur = \left(\frac{a-b}{b} \right) \quad f = \frac{a}{b}$$

Em que:

U_r = Umidade residual em kg kg^{-1} .

f = fator usado para correção da massa de solo, utilizado para a massa de solo seca nas determinações em laboratório com a utilização de TFSA (Fator "F").

a = massa da amostra seca ao ar, em g.

b = massa da amostra seca em estufa a 105°C , em g.

Para a análise granulométrica, foram pesados 20 g de TFSA de cada amostra. Os solos foram transferidos para Erlenmeyers de 250 mL, utilizando 100 mL de água destilada. Adicionou-se à mistura 10 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol L^{-1} . Todos os frascos Erlenmeyers foram alocados em mesa agitadora, submetidos à rotação de 50 rpm por 16 h. Após o término rotacional, as amostras foram passadas por peneiras de malha 0,053 mm, e transferidas para provetas de 1000 mL. Todo o material retido na peneira foi lavado com água destilada, com cuidado para se evitar respingos, observando sempre o limite de volume da proveta. Após lavagem total do material retido nas peneiras, o volume de 1 L em cada proveta foi completado utilizando água destilada. As areias retidas nas peneiras foram transferidas para béqueres previamente secos e tarados, e submetidas à secagem em estufa por 24 h à 105°C . Após secagem e resfriamento, foram determinadas as frações de areia grossa e areia fina, submetendo a areia total em uma nova peneira de 0,212 mm. A fração retida e pesada constituiu a fração de areia grossa. A areia fina, que passou pela peneira, também foi pesada e anotado o valor de sua massa.

Para a determinação de silte e argila, utilizou-se o método da pipeta (EMBRAPA, 2017). Em uma nova proveta de 1000 mL preparou-se a prova controle, adicionando-se 10 mL de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e completando o volume com água destilada. Com uma pipeta volumétrica, foram coletados 25 mL da solução e transferidos para um béquer de 50 mL, previamente seco e tarado. A solução foi então submetida à secagem em estufa por 24 h à 105°C . Após a secagem e resfriamento, mediu-se novamente a massa do béquer, anotando o resultado. Todas as soluções contidas nas provetas, inclusive a prova controle, foram submetidas à aferição de temperatura da suspensão, utilizando um termômetro. Em seguida, agitaram-se vigorosamente todas as suspensões durante 1 min com bastões de vidro, coletando imediatamente 25 mL de cada solução sobrenadante e transferiu para béqueres de 50 mL, previamente secos e tarados. Todas as amostras foram secas em estufa por 24 h à 105°C . Foi aguardado o tempo de

sedimentação da fração silte, seguindo a temperatura aferida da solução em proveta correspondente, conforme tempo descrito (Tabela 1).

Tabela 1 – Tempo de sedimentação calculado para a fração silte ($0,002 \text{ mm} < \varnothing < 0,05 \text{ mm}$) em função da temperatura da suspensão para a profundidade de 5 cm e para solos com densidade de partículas média de $2,65 \text{ kg dm}^{-3}$, em determinação efetuada ao nível do mar

Temperatura (°C)	Tempo de sedimentação a 5 cm	
	Horas	Minutos
15	4	23
16	4	16
17	4	10
18	4	4
19	3	58
20	3	52
21	3	46
22	3	41
23	3	36
24	3	31
25	3	26
26	3	21
27	3	17
28	3	13
29	3	9
30	3	5

Fonte: Teixeira, (2017).

Após o tempo de sedimentação da fração silte, foram retirados 25 mL das soluções sobrenadantes, em triplicata, de tal forma que não se aprofundou mais do que 5 cm na proveta. As alíquotas extraídas foram transferidas para béqueres limpos, previamente secos e tarados, e levadas à estufa de secagem à 105°C durante 24 horas. Após resfriamento em dessecador, os béqueres foram pesados em balança com precisão de 0,0001 g. Todas as massas encontradas foram reservadas para cálculos posteriores, conforme equações.

Equação do somatório da massa das frações

$$S_m = \left(\frac{m_{af} \cdot f}{m_i} \right) + \left(\frac{(m_{at} - m_{af}) \cdot f}{m_i} \right) + \left(\frac{(m_{sa} - m_{ar}) \cdot f}{m_i \cdot R_v} \right) + \left(\frac{(m_{ar} - m_{br}) \cdot f}{m_i \cdot R_v} \right)$$

Em que:

S_m = Somatório da massa das frações, em g.

m_{af} = Massa de areia fina, em g.

m_{at} = Massa de areia total, em g.

m_{sa} = Massa de silte + argila, seca em estufa, em g.

m_{ar} = Massa de argila, seca em estufa, em g.

m_{br} = Massa do controle, seca em estufa, em g.

m_i = Massa inicial da amostra, em g.

R_v = Razão do volume pipetado para o volume total da proveta.

f = fator de correção de umidade para a massa inicial.

Equação de concentração de areia fina.

$$T_{af} = \left(\frac{m_{af} \cdot f}{m_i} \right) \cdot \left(\frac{1000}{S_m} \right)$$

Em que:

T_{af} = concentração de areia fina, em g kg⁻¹.

m_i = massa inicial da amostra, em g.

m_{af} = massa de areia fina, em g.

f = fator de correção de umidade para a massa inicial.

S_m = Somatório da massa das frações, em g.

Equação da concentração de areia grossa.

$$T_{ag} = \left(\frac{(m_{at} - m_{af}) \cdot f}{m_i} \right) \cdot \left(\frac{1000}{S_m} \right)$$

Em que:

T_{ag} = concentração de areia grossa, em g kg⁻¹.

m_i = massa inicial da amostra, em g.

m_{at} = Massa de areia total, em g.

m_{af} = Massa de areia fina, em g.

f = fator de correção de umidade para a massa inicial.

S_m = Somatório da massa das frações, em g.

Equação da concentração de silte.

$$T_s = \left(\frac{(m_{sa} - m_{ar}) \cdot f}{m_i \cdot R_v} \right) \cdot \left(\frac{1000}{S_m} \right)$$

Em que:

T_s = concentração de silte, em g kg⁻¹.

m_i = massa inicial da amostra, em g.

m_{sa} = Massa de silte + argila, seca em estufa, em g.

m_{ar} = Massa de argila, seca em estufa, em g.

R_v = Razão do volume pipetado para o volume total da proveta.

f = fator de correção de umidade para a massa inicial.

S_m = Somatório da massa das frações, em g.

Com os resultados encontrados de todos os atributos granulométricos, foi utilizado o triângulo de classes texturais de acordo com o Manual técnico de pedologia - IBGE (2015).

2.3 Características microbiológicas do solo

2.3.1 Diluição e preparo das amostras

Foram utilizados 2 métodos de extração, dentre eles, solução extratora de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (pirofosfato de sódio) 0,1% (p/v) e outro método, utilizando solução extratora de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 0,1% (p/v) + $\text{C}_{64}\text{H}_{124}\text{O}_{26}$ (tween 80) 0,1% (p/v), selecionados de acordo com os resultados das análises de granulometria. A utilização de 2 métodos está associada à melhor eficiência de extração, quando relacionada à textura do solo. Para a diluição, foram adicionados 10 g de cada solo a um Erlenmeyer contendo 90 mL de cada uma das soluções extradoras. Após agitação por 30 minutos, em mesa agitadora, foram feitas diluições decimais em série (Figura 2), de 10^{-1} a 10^{-5} .

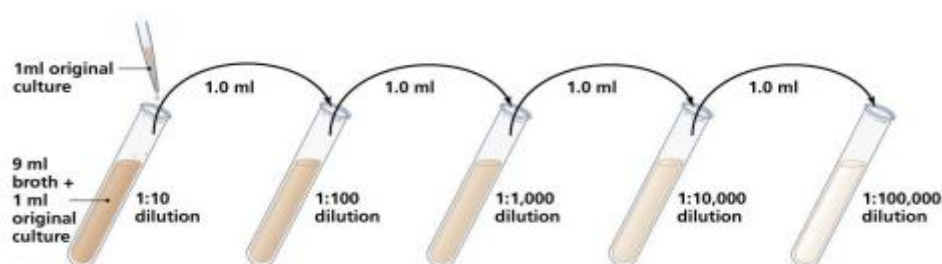


Figura 2 – Procedimento para preparação de diluições em série a partir de uma amostra de solo já diluída (10^{-1}) em água de diluição (0,9% de NaCl). Adaptado de NICOLAU, 2014.

Em seguida, alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram transferidas pelo método “pour plate” em placas de Petri esterilizadas, adicionando meio de cultura. As placas foram acondicionadas em sacos plásticos com o objetivo de evitar o ressecamento do meio de cultura (OLSEN; BAKKEN, 1987; SORHEIM *et al.*, 1989) e evitar contaminação.

2.3.2 Bactérias totais (OLSEN; BAKKEN, 1987; SORHEIM *et al.*, 1989)

Para contagem do número total de microrganismos foi utilizado o meio de cultura Ágar Nutriente, preparado conforme orientação na embalagem, incubados em estufa BOD (*Biochemical Oxygen Demand*), a 30°C, em ausência de luz. Foi adicionado ao meio 1,0 g L⁻¹ de actidione com a intenção de evitar a contaminação por fungos. As contagens das UFCs (unidades formadoras de colônias) foram realizadas 48 horas após a inoculação em um contador de colônias com 6x de aumento.

2.3.3 Fungos totais (MARTIN (1950))

Para contagem do número total de fungos foi utilizado o meio MARTIN (1950), pH 6,0, acrescido de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de uma mistura dos antibióticos penicilina e estreptomicina. Para o preparo do meio foram pesados $1,0 \text{ g}$ de KH_2PO_4 (fosfato monopotássico); $0,5 \text{ g}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato hepta-hidratado de magnésio); $5,0 \text{ g}$ de Peptona; $10,0 \text{ g}$ de dextrose; $0,033 \text{ g}$ de rosa de bengala; 20 g de ágar nutriente em 1 L de água destilada. Após aquecimento e diluição do meio aguardou-se resfriamento e ajustou o pH. A incubação das culturas foi feita a 30°C por 48 horas. Após esse tempo, foram contadas as UFCs.

2.3.4 Estirpes fixadoras de Nitrogênio (DÖBEREINER *et al.*, 1995)

a) Preparo do meio e inoculação

As diluições selecionadas foram inoculadas ($0,1 \text{ mL}$) em meio NFB semi-sólido, isento de nitrogênio. Para o preparo do meio foram pesados: $5,0 \text{ g}$ de $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$ (ácido málico); $0,5 \text{ g}$ de K_2HPO_4 (fosfato de potássio dibásico); $0,2 \text{ g}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de magnésio heptahidratado); $0,1 \text{ g}$ de NaCl (cloreto de sódio); $0,02 \text{ g}$ de CaCl_2 (cloreto de cálcio); $2,0 \text{ mL}$ de solução de micronutrientes: [$0,04 \text{ g}$ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de cobre pentahidratado); $1,2 \text{ g}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de zinco heptahidratado); $1,4 \text{ g}$ H_3BO_3 (ácido bórico); $1,0 \text{ g}$ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (molibdato de sódio dihidratado); $1,175 \text{ g}$ de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (sulfato de manganês hidratado); em 200 mL de água destilada]; $1,0 \text{ mL}$ de solução de vitaminas: [100 mg de biotina; 200 mg de piridoxol-HCl; 200 mL água destilada]; $2,0 \text{ mL}$ de $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{Br}_2\text{O}_5$ (azul de bromotimol) a $0,5\%$ diluído em KOH (hidróxido de potássio) $0,2 \text{ N}$; $4,0 \text{ mL}$ de $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_8\text{FeNa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (EDTA férrico) em solução aquosa a $1,64 \%$; $18,0 \text{ g}$ de ágar bacteriológico; 1000 mL de água destilada. Foi acrescido ao meio $1,0 \text{ mL L}^{-1}$ de actidione visando a não-contaminação por fungos. As placas de Petri previamente esterilizadas foram incubadas pelo método pour-plate e alocadas em estufas BOD a 30°C , durante 7 dias, sendo então contadas as UFCs.

b) Isolamento de espécies

Após o período de incubação, foram isoladas UFCs utilizando técnica de diferenciação visual. Desse modo, foram separadas 10 colônias entre todas as amostras avaliadas, não necessariamente 1 em cada amostra, e estas apresentavam cor, aspecto, tamanho e formas diferentes. Os isolados foram extraídos das placas com auxílio de alça de platina, de forma a se aproveitar ao máximo todo o conteúdo da colônia. Foram inoculados então em tubos de ensaio

contendo caldo nutriente semi-sólido: (extrato de bife – $1,0 \text{ g L}^{-1}$; extrato de levedura – $2,0 \text{ g L}^{-1}$; peptona – $5,0 \text{ g L}^{-1}$ e cloreto de sódio – $5,0 \text{ g L}^{-1}$). Os pré-inóculos permaneceram em estufa BOD a 30°C até que se atingisse a coloração turva e película característica, o que aconteceu entre 24 a 48 horas (Figura 3). Após esse período foram mantidos em geladeira, no intuito de inibir o crescimento de células.

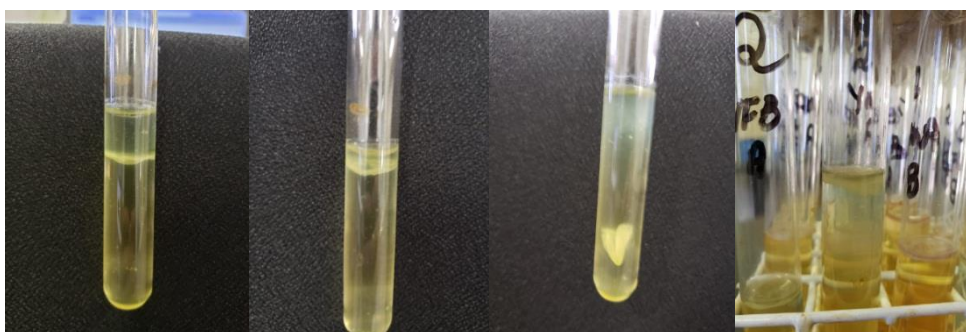


Figura 3 – Coloração turva e formação de película característica em tubos de ensaio contendo caldo nutriente e inóculos de microrganismos isolados para avaliação de fixação/solubilização.

Fonte: O autor.

c) Seleção de estirpes

Para o caso das espécies fixadoras de nitrogênio o método de seleção foi o acúmulo de nitrogênio no meio de cultivo. Foram separadas 10 colônias para avaliação do potencial de fixação de N_2 atmosférico. Os pré-inóculos foram então inseridos em meio NFB (fixação biológica de nitrogênio) seletivo (DÖBEREINER *et al.*, 1995), isento de ágar, para a determinação de fixação de nitrogênio. Foram pipetados $650 \mu\text{L}$ de cada um dos 10 pré-inóculos em erlenmeyers contendo 15 mL de meio semi-sólido NFB, previamente esterilizados. Como controle, foi utilizado somente o meio NFB, sem inóculo; todos os tratamentos sendo feitos em triplicata. Os erlenmeyers foram alocados em mesa agitadora com 100 rpm durante 5 dias, podendo ser observada a mudança de coloração previamente amarelada para tonalidades de verde/azul.

Após completar a agitação de 5 dias as amostras foram mantidas congeladas até o início das análises de densidade óptica e análise de nitrogênio. Procedeu-se à ruptura das células para liberação do conteúdo celular, retirando os tubos do congelador e aguardando o descongelamento em temperatura ambiente.

d) Densidade óptica

Para determinação da densidade celular na suspensão foi utilizado o método de densidade óptica, onde se utilizou um espectrofotômetro para leitura das absorbâncias das amostras com e sem conteúdo celular (Figura 4). Para tal, foi zerado o equipamento com água destilada e ajustado para 600 nm de comprimento de onda. Logo após, foram feitas as leituras das densidades, iniciando com uma amostra contendo meio caldo nutriente, isenta de inóculo. O cálculo da densidade óptica foi realizado utilizando a fórmula: $D.O = Li - Lo$, proposto por Nicolau (2014), onde Li é a leitura da absorbância de cada amostra turva com suspensão de inóculo e Lo é a leitura da absorbância apenas de meio, sem suspensão celular.

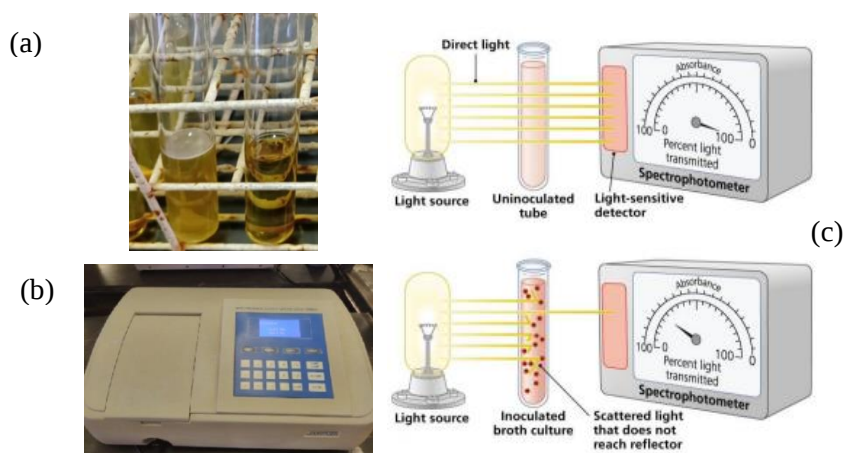


Figura 4 – A densidade óptica de uma suspensão celular, usando como referência um tubo de meio não inoculado, lida num espectrofotômetro, a um comprimento de onda fixo (600 nm) (b). A diferença de absorbância entre o tubo com suspensão celular e o tubo com meio estéril possibilita a determinação da densidade celular na suspensão (c). Fonte: (c) adaptado de NICOLAU, 2014; (a e b). O autor.

e) Análise de nitrogênio

Da solução contida nos erlenmeyers foram extraídos 9,5 mL para macro tubos de digestão (TEDESCO *et al.*, 1995) contendo previamente 0,7 g de mistura catalisadora (KUSS *et al.*, 2007) composta por: [100,0 g de Na_2SO_4 (sulfato de sódio); 10,0 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de cobre pentahidratado); 1,0 g de Na_2SeO_3 (selenito de sódio anidro) macerados em almofariz e pistilo até formato homogêneo]. Após adição da solução na mistura os macros tubos foram alocados em bloco digestor já adaptado em capela de exaustão. Foram adicionados em seguida 1 mL de H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e 2,0 mL de H_2SO_4 (ácido sulfúrico) sucessivamente. Os tubos foram então aquecidos em temperatura de 180°C por 2 h e a mesma foi elevada até 360°C, sendo mantida até que a mistura atingiu a cor verde-palha. Após atingir coloração desejada aguardou-se o resfriamento dos tubos para temperatura ambiente e foram

adicionados 10 mL de água destilada em cada tubo. Procedeu-se à destilação utilizando o destilador de nitrogênio tipo Kjeldahl segundo Tedesco *et al.* (1995). Acoplado o tubo ao destilador, foi introduzido 25 mL de NaOH (hidróxido de sódio) 50 %. Após esgotamento da solução básica iniciou-se o processo de destilação extraindo o destilado em frasco erlenmeyer de 250 mL contendo previamente 10 mL de ácido bórico com indicador misto [20 g de H_3BO_3 ; 1 L de água destilada; 15 mL de verde de bromocresol 0,1% (diluído em solução alcoólica); 6,0 mL de vermelho de metila a 0,1% (diluído em solução alcoólica)]. O ponto final da destilação foi realizado ao coletar no mínimo 20 mL de destilado, tempo necessário para se destilar toda a amônia presente (Figura 5).



Figura 5 – Destilação em destilador de nitrogênio tipo Kjeldahl com adição de NaOH 50% e Solução de H_3BO_3 com indicador misto.
Fonte: O autor.

f) Titulação

Essa etapa foi realizada preparando primeiramente uma solução de H_2SO_4 0,05 N padronizada. Os aparatos de titulação foram preparados, utilizando bureta de 50 mL. Titularam-se então todas as amostras e anotou o volume de ácido sulfúrico gasto, o que ocorreu quando a solução contida no erlenmeyer correspondesse à mudança da cor verde para vermelho claro. O volume utilizado no cálculo foi o correspondente à média de cada amostra analisada. Para o cálculo de N-total na amostra foi considerado que 1,0 mL do ácido padronizado gasto na titulação corresponde a 0,7 mg de N total na amostra. A quantidade de Nt (nitrogênio total)

fixado na amostra foi expressa em $\mu\text{g mL}^{-1}$ de meio. Dessa forma, foram isoladas duas espécies com maior potencial de fixação de nitrogênio, para posterior aplicação em sistemas agrícolas.

2.3.5 Estirpes de solubilização de fosfato (NAUTIYAL, 1999)

Para o caso das espécies solubilizadoras de fosfatos, a variável de seleção foi o diâmetro do halo formado, medido em (cm) (Figura 6), onde quanto maior o diâmetro da transparência em volta da colônia maior a atividade de solubilização de fosfatos, conforme Júnior *et al.* (2010). Para Silva Filho e Vidor (2001) o uso de microrganismos solubilizadores de fosfatos depende de suas características e do meio ambiente. Para os autores, em estudo realizado com vários isolados solubilizadores de fosfato, em resposta a fontes de nitrogênio e teores de Fe, Ca e K, o comportamento do halo e da colônia sugere que a solubilização depende do crescimento. Padrões tipo halo: colônia=1 é considerado de baixa eficiência, sugerindo assim que quanto maior essa relação mais intensa é a solubilização da espécie. O potencial de solubilização de cada UFC foi calculado com a fórmula: (diâmetro halo:diâmetro colônia).

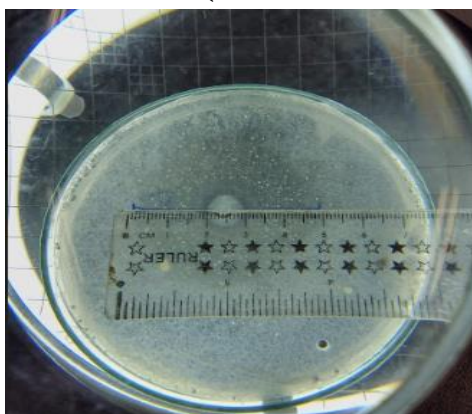


Figura 6 – Medição de halo formado por colônia solubilizadora de fosfato em meio característico após 15 dias de incubação a 30°C. Os resultados foram expressos em cm.

Fonte: O autor.

Foi utilizado o meio sólido NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate Growth Medium). Para o preparo do meio foram pesados: [10,0 g de $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (glicose); 5,0 g de $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$ (hidroxiapatita de cálcio); 5,0 g de MgCl_2 (cloreto de magnésio); 0,25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de magnésio pentahidratado); 0,2 g de KCl (cloreto de potássio); 0,1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (sulfato de amônia); 15,0 g de ágar bacteriológico; 1 L de água destilada, pH 7,0. Foi acrescido ao meio $1,0 \text{ mL L}^{-1}$ antigumgico visando a não-contaminação por fungos. As placas de Petri previamente esterilizadas foram incubadas pelo método pour-plate e alocadas

em estufas BOD a 30°C, durante 15 dias, sendo então contadas as UFCs. Os microrganismos foram selecionados de acordo com o maior tamanho de halo formado.

2.4 Análises estatísticas

Os dados obtidos no experimento foram submetidos à análise de variância pelo Teste ANOVA e de comparação de médias pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$), utilizando-se os Softwares Minitab 17 e Statistic. Todos os resultados analíticos utilizados para correlação foram realizados em triplicata, sendo dados quantitativos discretos, independentes entre si, com repetições verdadeiras.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O conhecimento do equilíbrio dinâmico e dos efeitos das práticas agrícolas sobre as populações na comunidade microbiana é importante, dadas às inúmeras funções que esses microrganismos desempenham. Embora existam várias pesquisas envolvendo os solos do cerrado, estudos que envolvem a microbiota ainda são escassos. Há poucos dados comparáveis entre as populações microbianas presentes em solos de ecossistemas naturais e em agroecossistemas, em especial sobre a dinâmica da comunidade microbiana da rizosfera das plantas cultivadas e de ambientes preservados de cerrado.

O pH é um atributo do solo muito determinante quanto à presença de espécies no ambiente. Wenjun *et al.* (2020) destacou o pH e a umidade pela sazonalidade como fatores que impulsionam a montagem da comunidade bacteriana em agroecossistemas. Segundo os autores esses atributos traçam o papel ecológico central do núcleo microbioma e garantem a manutenção da teia de interações bacterianas complexas. Os resultados de pH e umidade encontrados nas amostras analisadas foram representados (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores de pH e umidade, realizados em quadruplicatas em amostras de solos coletados em período de estio (2020), em área de solos agrícolas com plantio de cana-de-açúcar. Os resultados estão apresentados como médias $\pm$ desvio padrão

Fundos Agrícolas	Valores de pH	Valores de umidade atual (%)
Fazenda Mata da Chuva	6,06 $\pm$ 0,70	1,83 $\pm$ 0,96
Fazenda Marmeleiro	5,78 $\pm$ 0,65	9,61 $\pm$ 3,09
Fazenda Bom Jardim	5,27 $\pm$ 0,42	14,31 $\pm$ 0,80
Fazenda Salin	6,92 $\pm$ 0,04	8,28 $\pm$ 2,30
Fazenda Tia Pal	5,65 $\pm$ 0,45	2,27 $\pm$ 1,41
Fazenda Canatech	7,24 $\pm$ 0,14	18,10 $\pm$ 1,36

Os cálculos granulométricos (Tabela 3) foram determinados para a escolha de qual solução extratora fosse aplicada. Optar pelo mais eficiente processo de extração se faz necessário para a melhor quantificação microbiológica em amostras de solos.

Tabela 3 – Médias dos atributos granulométricos para determinação das frações de areia, silte e argila em amostras de solos agrícolas

Atributos granulométricos	Mata da Chuva	Marmeleiro	Bom Jardim	Salin	Tia Pal	Canatech
Umidade residual, em kg.kg^{-1}	0,006	0,026	0,012	0,014	0,001	0,013
m_i = massa inicial da amostra, em g	20,000	20,000	20,000	20,000	20,000	20,000
m_{at} = Massa de areia total, em g	14,560	8,090	2,850	10,930	15,350	4,500
m_{af} = Massa de areia fina, em g	12,570	7,260	2,680	9,140	14,030	3,370
m_{br} = Massa do controle, seca (g)	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
m_{sa} = Massa silte + argila seca (g)	0,161	0,307	0,259	0,213	0,092	0,393
m_{ar} = Massa de argila, seca em estufa (g)	0,092	0,205	0,184	0,166	0,065	0,225
R_v = Razão vol pipetado : vol proveta	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
f = fator correção umidade - massa inicial	1,006	1,026	1,012	1,014	1,006	1,013
S_m = Somatório massa das frações, em g.	0,982	0,991	0,968	0,955	0,927	0,998
T_{af} = concentração areia fina, em g kg^{-1}	615,840	374,780	233,460	485,390	760,680	168,470
T_{ag} = concentração areia grossa, em g kg^{-1}	97,520	45,790	20,540	95,030	71,920	56,710
T_s = concentração de silte, em g kg^{-1}	136,530	201,700	230,010	98,240	59,440	344,020
T_{ar} = concentração de argila, em g kg^{-1}	150,110	377,730	515,990	321,340	107,960	430,800

Pelas análises de umidade e granulometria ficou evidenciado que solos argilosos possuem características de reter a umidade nos poros de argila; a fazenda Mata da Chuva apresentou um percentual alto de areia em sua textura e obteve o menor percentual de umidade atual. A partir dos resultados da tabela 3 foram determinadas as frações das partículas formadoras de cada solo (Figura 7).

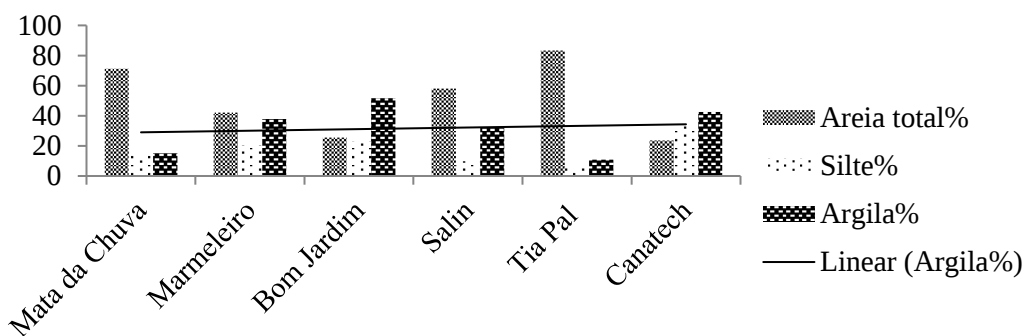


Figura 7 – Percentuais das frações de areia, silte e argila em solos submetidos ao plantio de cana de açúcar e de Mata Nativa no Cerrado de Minas Gerais

Os resultados das frações de areia, silte e argila foram determinantes na classificação segundo Triângulo de Classes Texturais (MANUAL TÉCNICO DE PEDOLOGIA, IBGE, 2015). Os solos foram classificados em Mata da Chuva – Franco-arenoso; Marmeleiro – Franco-argiloso; Bom Jardim – Argila; Salin – Franco-argilo-arenoso; Tia Pal – Areia franca; Canatech – Argila.

As soluções extratoras utilizadas para as análises microbiológicas foram respectivamente:

- ✓ $\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 + \text{C}_{64}\text{H}_{124}\text{O}_{26}$ para os solos (Mata da Chuva e Tia Pal).
- ✓ $\text{H}_2\text{O} + \text{C}_{64}\text{H}_{124}\text{O}_{26}$ para os solos (Marmeleiro, Bom Jardim, Salin e Canatech).

Em relação às análises microbiológicas, a fazenda Canatech apresentou maior concentração de fungos totais, as fazendas Salin e Canatech apresentaram as maiores UFCs na avaliação de bactérias totais; quanto às colônias fixadoras de nitrogênio o destaque ficou com a fazenda Mata da Chuva e a fazenda Bom Jardim, que obtiveram maiores populações de solubilizadoras de fosfato (Tabela 4). Bactérias diazotróficas endofíticas possuem a habilidade de colonização de tecidos vegetais da cana-de-açúcar e obtenção de nutrientes (ESTRADA *et al.*, 2013); o uso dessas bactérias desencadeia processos na planta-solo tais como fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato e zinco, produção de fitormônios e melhoria na defesa do vegetal contra pragas e patógenos (FISCHER *et al.*, 2012). Daí a importância desses microrganismos na interação planta-microrganismo-solo.

Tabela 4 – Médias dos valores de unidades formadoras de colônia (UFC g⁻¹) após o tempo de incubação de acordo com metodologias aplicadas, submetidas à 30°C.

Fazendas	Fungos totais 10 ³	Bactérias totais 10 ⁶	Fixadoras N 10 ⁶	Solubilizadoras P 10 ⁸
Mata Chuva	17,00 ± 3,61 b	83,33 ± 16,50 b	276,70 ± 97,10 a	246,67 ± 11,50 c
Marmeleiro	32,67 ± 7,51 b	28,00 ± 3,00 c	33,67 ± 7,57 c	676,70 ± 166,50 b
Bom Jardim	26,33 ± 3,21 b	42,33 ± 9,29 bc	161,00 ± 17,06 ab	1507,00 ± 291,00 a
Salin	19,00 ± 3,61 b	168,70 ± 27,30 a	34,33 ± 14,01 c	476,70 ± 68,10 bc
Tia Pal	30,00 ± 3,61 b	46,00 ± 14,53 bc	23,67 ± 2,52 c	122,00 ± 15,62 c
Canatech	79,67 ± 10,26 a	141,00 ± 33,20 a	85,00 ± 26,50 bc	365,30 ± 46,00 bc
Valor P ¹	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005

¹Valor P referente ao teste de Análise de Variância (ANOVA) a P<0,05. ²Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas pelos testes de comparação múltipla post-hoc de Tukey a P<0,05.

Entender a interação da microbiota em solos agrícolas com o mesmo sistema de uso da terra é algo desafiador, já que a dinâmica microbiológica pode ser alterada pelo pH, temperatura, disponibilidade de água e textura do solo, além da presença ou não de nutrientes disponíveis. Cada solo possui um sistema complexo, resultando da combinação entre a geologia parental, o tempo de formação, o histórico do manejo de uso da terra, da estrutura topográfica e da interação da biota (TECON; OR, 2017). Segundo Sousa (2020) o pH mais próximo ao neutro é um facilitador para o estabelecimento de grupos bacterianos; tal afirmação está em conformidade com os resultados desse trabalho que encontrou maiores concentrações de bactérias em solos com pH 7,24 e 6,92 das fazendas Canatech e Salin, respectivamente.

Os percentuais de umidade nos solos desse estudo parecem terem sido mais relevantes para a presença de fungos, da fazenda Canatech e na quantificação de bactérias solubilizadoras de fosfato, nesse caso para a fazenda Bom Jardim. Fungos normalmente são conhecidos como aeróbicos obrigatórios, com capacidade de sobrevivência em grande variedade de ambientes. Os fungos são mais abundantes em sistemas agrícolas; acredita-se que, ao invés das bactérias, os fungos sejam mais importantes para a decomposição da matéria orgânica, principalmente em ambientes ácidos (THORMANN, 2006). O solo franco-arenoso com baixo teor de umidade da fazenda Mata da Chuva apresentou resultado desafiador quando relacionado às concentrações de UFCs fixadoras de nitrogênio. É sabido que a disponibilidade de água aumenta a presença de minerais aos grãos de areia/argila dos solos.

Quanto aos resultados de UFCs de fungos totais relacionados ao pH da fazenda Canatech, fica evidenciado que solos agrícolas, com um bom manejo aplicado, favorecem mudanças e adaptações desses microrganismos, já que a literatura enfatiza a preferência dos mesmos para ambientes mais ácidos (THORMANN, 2006). A (Figura 8) traz uma correlação

entre as variáveis analisadas (pH e Umidade) e as quantidades de UFCs encontradas em cada solo.

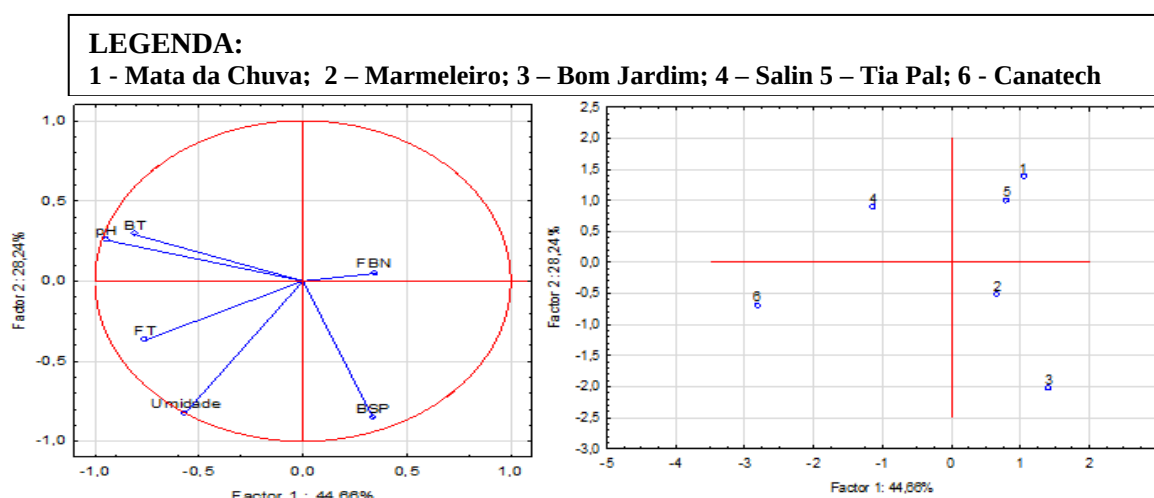


Figura 8 – Análise de PCA componentes principais e correlação das amostras de solos agrícolas com os componentes (pH, Umidade, Fungos totais (FT), Bactérias totais (BT), Bactérias fixadoras de nitrogênio (FBN) e Bactérias solubilizadoras de fosfato (BSP)

Os resultados demonstraram que a presença de fungos nesses ambientes agrícolas foi ampliada pela frequência de umidade, em pH mais elevado, perto da neutralidade. Para o teor de bactérias totais, o pH e a umidade também influenciaram, estes preferem ambientes úmidos com pHs mais neutros. As fixadoras de nitrogênio do presente estudo foram encontradas em ambientes mais secos, com a menor taxa de umidade e pH com média de 6,06.

Para o caso das solubilizadoras de fosfato, a umidade foi influente, colaborando com a presença desses microrganismos. O pH da Fazenda Bom Jardim (apresentou maior UFC para esse atributo) foi avaliado como o de mais baixo valor, porém vale ressaltar que esse resultado está em conformidade com o estudo de Oliveira e Pavan (1996) que encontraram maiores concentrações de nutriente fosfatado em solos com pHs alterados de 4,0 para 5,5. A solubilização de fosfatos é intensificada quando há liberações de ácidos orgânicos, assim a presença de microrganismos com metabolismo para produção desses compostos, pode contribuir para melhorar esse processo (OWEN *et al.*, 2015).

Da análise de componentes principais (Figura 9) os dados dos fatores 1 e 2 representaram 69,92% do comportamento. A análise associou a presença de bactérias totais aos valores de pH e da fazenda Salin. Os percentuais de umidade foram relacionados à presença de fungos totais, valores encontrados em maiores escalas na fazenda Canatech. Coube à fazenda Marmeleiro a maior interação com as bactérias fixadoras de nitrogênio, seguida pela fazenda

Tia Pal. As concentrações em UFCs para as bactérias solubilizadoras de fosfato foram associadas à Fazenda Bom Jardim, que apresentou maiores populações dessas espécies com capacidade de solubilização.

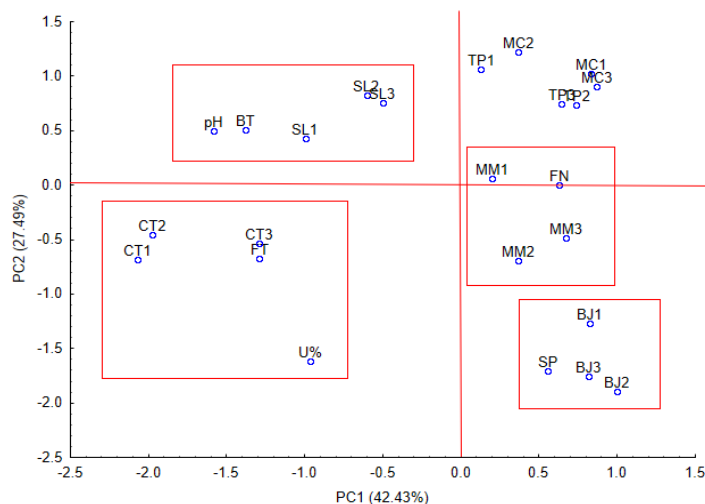


Figura 9 - Análise de componentes principais das variáveis FT (fungos totais); BT (bactérias totais); FN (bactérias fixadoras de nitrogênio); SP (bactérias solubilizadoras de fosfato); pH e percentual de umidade

Após avaliação das UFCs em cada ambiente agrícola, foi necessário o isolamento de colônias para análise quantitativa. A seleção foi realizada em placas (Figura 10), isolando as espécies em tubos contendo meio nutriente. Dessa forma, colônias de diferentes formas, aspectos, coloração e tamanhos foram selecionadas e repicadas, sendo então transferidas para tubos de ensaio contendo meio caldo nutriente.

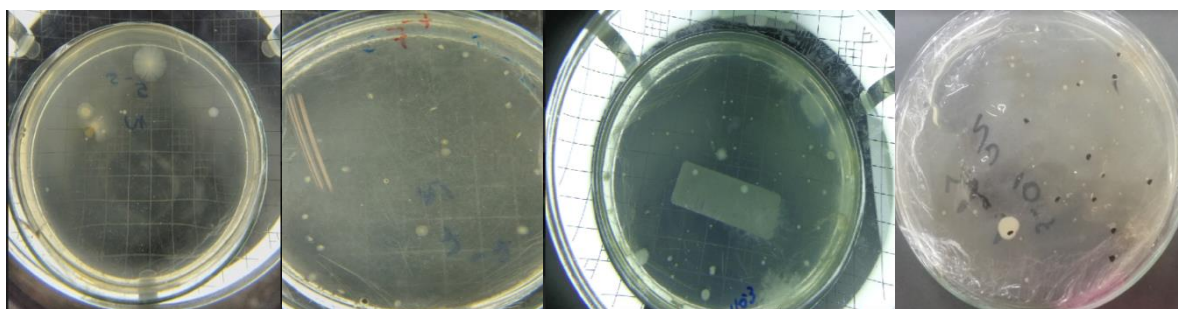


Figura 10 - Crescimento de colônias em meio FNB para seleção de microrganismos fixadores de nitrogênio. Unidades formadoras de colônias com 7 dias de incubação.

Fonte: O autor.

As espécies selecionadas que cresceram em meio NFB foram então separadas para avaliação da fixação de nitrogênio. Após cinco dias em mesa agitadora, a coloração azul foi perceptível nas amostras quando em comparação com o branco (Figura 11).



Figura 11 - Fixação de nitrogênio em inóculos isolados aos 5 dias de agitação 100 rpm e em meio semi-sólido NFB, com temperatura ambiente.
Fonte: O autor.

Das UFCs em meio NFB selecionadas pelo formato, aspecto, cor e tamanho diferentes foi realizada a análise de fixação de nitrogênio (Tabela 5). Os meios que apresentaram maiores concentrações desse nutriente específico foram considerados aqueles com as espécies de maior atividade de interesse, permitindo a reutilização em áreas de baixa fertilidade. A coloração azul perceptível em meio contendo indicador azul de bromotimol possibilitou a visualização de mudança de cor como consequência das etapas de fixação de N_2 , como a redução de nitrato para amônia, acidificando o meio. Atualmente não se sabe quantos microrganismos diferentes fixam o nitrogênio nos solos. O processo é de suma importância em solos limitados pelo N, já que no resultado final do processo a amônia é incorporada à matéria orgânica do solo (ELSAS *et al.*, 2019). Assim, os inoculantes com maior potencial para aplicação agrícola para fixação de nitrogênio foram retirados das fazendas Canatech A e Salin B (subdivisões criadas no isolamento das cepas selecionadas).

Tabela 5 – Atividade nitrogenase medida em teor de nitrogênio total na amostra.

Fazendas	Teor de Nt na amostra (mg)	Fazendas	Teor de Nt na amostra (mg)
Mata da Chuva	0,327 ± 0,020	Salin B	0,408 ± 0,132
Marmeleiro	0,187 ± 0,040	Salin C	0,373 ± 0,107
Bom Jardim A	0,268 ± 0,020	Tia Pal	0,222 ± 0,020
Bom Jardim B	0,303 ± 0,081	Canatech A	0,420 ± 0,140
Salin A	0,268 ± 0,020	Canatech B	0,338 ± 0,053

¹Valor P referente ao teste de Análise de Variância (ANOVA) a $P < 0,05$. ²Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas pelos testes de comparação múltipla post-hoc de Tukey a $P < 0,05$.

A análise comparativa entre os resultados apresentados na (Tabela 5) com a média de valores de densidade óptica estão expressos na (Figura 12). Na avaliação ficou evidenciado que a fixação de nitrogênio não depende da densidade celular, mas sim, da característica da espécie, a qual pode possuir maior ou menor capacidade de produção de nitrogênio.

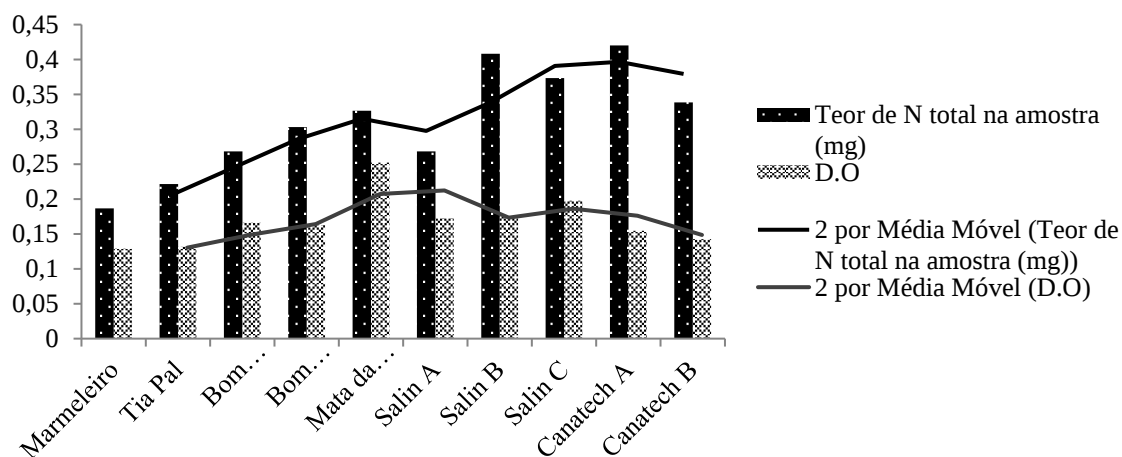


Figura 12 – Comparação entre teores de nitrogênio total (mg) e densidade óptica (DO) em amostras de solos analisadas.

Com relação ao potencial de solubilização de fosfato, a escolha das colônias de interesse foi feita após o crescimento, por formação de halo de solubilização (Figura 13).

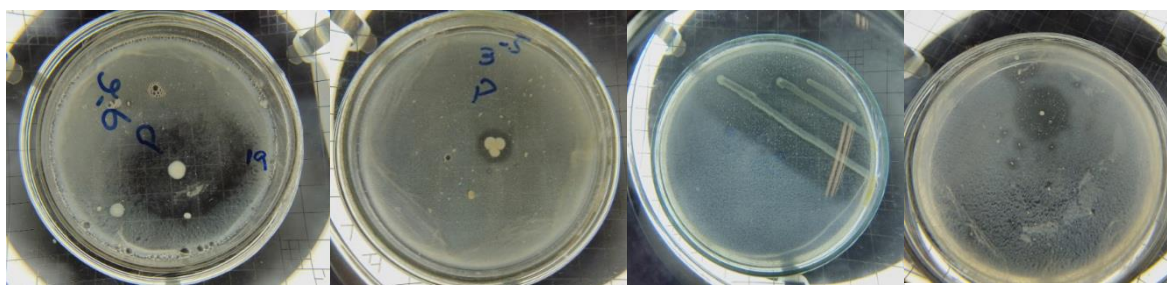


Figura 13 – Placas contendo meio seletivo para bactérias solubilizadoras de fosfato, apresentando os halos das unidades formadoras de colônia.
Fonte: O autor.

As colônias de bactérias solubilizadoras de fosfato foram selecionadas conforme o tamanho do halo gerado e o cálculo do potencial de solubilização (diâmetro de solubilização/diâmetro da colônia) conforme descrito por (SILVA FILHO; VIDOR, 2001) (Tabela 6). Diante do resultado as espécies com maior solubilização de fosfato foram a da Fazenda Mata da Chuva (halo de 5,0 cm; potencial de solubilização = 5,0) e da Fazenda Salin (halo de 6,0 cm; potencial do solubilização = 5,0), as que apresentaram maiores potenciais de interesse.

Tabela 6 – Medição em (cm) dos diâmetros dos halos de solubilização após inoculação de amostras de solos analisadas em meio seletivo para bactérias solubilizadoras de fosfato.

Fazendas	Mata da Chuva	Marmeleiro	Bom Jardim	Salin	Tia Pal	Mata Nativa
Diâmetros das colônias (cm)	0,4 – 5,0	1,0 – 2,9	1,2 – 3,0	0,6 – 6,0	1,5 – 2,0	0,4 – 1,7

Dessa forma, quatro espécies de microrganismos autóctones com potencial para aplicação para reinoculação na cultura de cana-de-açúcar foram selecionados sendo elas:

- ✓ 1 espécie fixadora de N₂ da Fazenda Salin
- ✓ 1 espécie fixadora de N₂ da Fazenda Canatech
- ✓ 1 espécie solubilizadora de fosfato da Fazenda Salin
- ✓ 1 espécie solubilizadora de fosfato da Fazenda Mata da Chuva

4 CONCLUSÃO

Diferentes fundos agrícolas do Cerrado, mesmo submetidos ao mesmo sistema de uso da terra, possuem diferentes resultados de atividade microbiana essa atividade de interesse agrônomo não está vinculada à quantidade de populações, mas sim, na capacidade de fixar ou solubilizar nutrientes, disponibilizando-os às plantas.

Os inoculantes microbianos isolados nesse trabalho podem ser alternativas viáveis para substituição ou complementação ao consumo de insumos químicos, já que apresentaram alta atividade de fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato.

A aplicação de microrganismos na agricultura pode trazer ganhos ambientais e econômicos. Assim, faz-se necessário o isolamento e a caracterização de microrganismos autóctones que são mais adaptados ao ambiente de produção e que permaneçam por mais tempo no solo.

REFERÊNCIAS

ABHILASH, P. C. C.; DUBEY, R. K.; TRIPATHI, V.; GUPTA, V. K.; SINGH, H. B. Plant Growth-Promoting Microorganisms for Environmental Sustainability. **Trends in Biotechnology**, v. 34, p. 847-850, 2016. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167779916300518>. Acesso em: 12 nov. 2021.

BOND, W. J.; WOODWARD, F. I.; MIDGLEY, G. F. The global distribution of ecosystems

in a world without fire. **New Phytologist**, v.165, p. 525-538, 2004. Disponível em: <http://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1469-8137.2004.01252.x>. Acesso em: 13 nov. 2021.

BRESOLIN, J. D.; BUSTAMANTE, M. M. C.; KRÜGER, R. H.; SILVA, M. R. S. S.; PEREZ, K. S. Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian Cerrado. **Brazilian Journal of Microbiology** v. 41, p. 391-403, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/bjm/a/jFSMqLTKPLWF7LSMjNRvH3p/?lang=en>. Acesso em: 10 nov. 2021.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (Brasil). **Acompanhamento da safra brasileira: Cana-de-açúcar**, SAFRA 2019/20 - Segundo levantamento Brasília: Conab, v. 6, n. 2, 2019. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>. Acesso em: 12 dez. 2020.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI; Itaguaí: Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia. p. 60, 1995.

ESTRADA, G. A.; BALDANI, V. L. D.; OLIVEIRA, D. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. **Plant and Soil**, v. 369, p. 115-129, 2013. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11104-012-1550-7>. Acesso em: 11 dez. 2021.

FERREIRA, J. **Original história de Frutal**: Registros de fatos pessoais e de conhecimentos históricos de Frutal. Frutal: Oficina das Artes, Adebrac, 2002.

FISCHER, D.; PFITZNER, B.; SCHMID, M.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; REIS, V. M.; PEREIRA, W.; ORMEÑOORRILLO, E., HAI, B.; HOFMANN, A.; SCHLOTTER, M.; MARTINEZ-ROMERO, E., BALDANI, J. I.; HARTMANN, A. Molecular characterization of the diazotrophic bacterial community uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum* sp). **Plant and Soil**, v. 356, p. 83-99, 2012. Disponível: <http://www.proquest.com/docview/1021342155>. Acesso em: 15 jan. 2021.

HEIJDEN, M. G. A.; VAN, D. E. R.; DARDGETT, R. D.; STRAALLEN, N. M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. **Ecology Letters**, v. 11, p. 296-310. 2008. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x>. Acesso em: 15 jan. 2021.

HU, X. F., CHEN, J.; GUO, J. F. Two phosphate and potassium solubilizing bacteria isolated from Tiannu mountain, Zhejiang, China. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 983-990, 2006. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11274-006-9144-2>. Acesso em: 16 jan. 2021.

HUNTER-CEVERA, J. C. The value of microbial diversity. **Current Opinion in**

Microbiology, Amsterdam, v. 1, n. 3, p. 278-285, 1998. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369527498800301>. Acesso em: 10 jan. 2021.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Manual técnico de pedologia**: Guia prático de campo. Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <http://pt.scribd.com/document/305768716/Manual-Tecnico-de-Pedologia-Guia-Pratico-de-Campo>. Acesso em: 20 jan. 2021.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; WANI, P. A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - A review. **Agronomy for Sustainable Development**, Springer Verlag/EDP Sciences/INRA, v. 27 n. 1, p. 29-43, 2007. Disponível em: <http://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00886352/document>. Acesso em: 14 mai. 2022.

LOPES, C. A. É possível produzir alimentos para o Brasil sem agrotóxicos? **Ciência e cultura**, v. 69, n. 4, p. 52-55, 2017. Disponível em: http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252017000400016. Acesso em: 25 jan. 2021.

MARTIN, J. P. Use of acid, rose bengal, and estreptomycin in the plate method for estimating soil fungi. **Soil Science Society of America Journal**, v. 69, p. 215-232, 1950. Disponível em: http://journals.lww.com/soilsci/Citation/1950/03000/USE_OF_ACID,_ROSE_BENGAL,_AND_STREPTOMYCIN_IN_THE.6.aspx. Acesso em: 10 jan. 2021.

MCLEOD, M. L.; CLEVELAND, C. C.; LEKBERG, Y.; MARON, J. L.; PHILIPPOT, L.; BRU, D.; CALLAWAY, R. M. Exotic invasive plants increase productivity, abundance of ammonia-oxidizing bacteria and nitrogen availability in intermountain grasslands. **Journal of Ecology**, v. 104, n. 3, p. 994-1002, 2016. Disponível em: <http://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/1365-2745.12584>. Acesso em: 18 jan. 2021.

MENDES, I. C.; FERNANDES, F. M.; CHAER, G. M.; REIS JUNIOR, F. B. Biological functioning of Brazilian Cerrado soils under different vegetation types. **Plant and Soil**, v. 352, p. 183-195, 2012. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11104-012-1195-6>. Acesso em: 26 jan. 2021.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170. p. 265-270, 1999. Disponível em: <http://academic.oup.com/femsle/article/170/1/265/454487>. Acesso em: 11 jan. 2021.

NOOJIPADY, P.; MORTON, D.; MACEDO, M.; VICTORIA, D.; HUANG, C.; GIBBS, H.; BOLFE, E. Forest carbon emissions from cropland expansion in the Brazilian Cerrado biome. **Environmental Research Letters**, v. 12, p. 1-12, 2017. Disponível em: <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1748-9326/aa5986/pdf>. Acesso em: 14 mai. 2022.

OLSEN, R. A.; BAKKEN, L. R. Viability of soil bacteria: optimization of plate counting technique and comparison between total counts and plate counts within different size groups.

Microbial Ecology, v.13, p. 59-74, 1987. Disponível em:
<http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24213103/>. Acesso em: 12 dez. 2021.

OWEN, D.; WILLIAMS, A.; GRIFFITH, G.; WITHERS, P. Use of commercial bioinoculants to increase agricultural production through improved phosphorous acquisition. **Applied Soil Ecology**, v. 86, p. 41-54, 2015. Disponível em:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0929139314002698>. Acesso: 13 mar. 2022.

PIETRO SOUZA, W.; CAMPOS PEREIRA, F.; MELLO, I. S.; STACHACK, F. F. F.; TEREZO, A. J.; CUNHA, C. N.; WHITE, J. F., LI, H.; SOARES, M. A.. Mercury resistance and bioremediation mediated by endophytic fungi. **Chemosphere**, v. 240, p. 1-42, 2020. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653519321137>. Acesso em: 14 abr. 2022.

PIRES, E. C. C. **Microbiologia do ciclo do nitrogênio em solos do cerrado**. 2016. Dissertação (Mestrado em Biologia Microbiana) - Universidade de Brasília, Brasília, 2016. Disponível em: http://mestrados.uemg.br/images/ppgciamb/docs/12_normas_dissertacao.pdf. Acesso em: 13 mai. 2022.

RAI, P. K.; SINGH, M.; ANAND, K.; SAURABH, S.; KAUR, T.; KOUR, D.; YADAY, A. N.; KUMAR, M. Role and potential applications of plant growthpromoting rhizobacteria for sustainable agriculture. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, p. 49-60, 2020. Disponível em:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012820526600004X>. Acesso em: 25 fev. 2022.

REIS, T.; RUSSO G.; RIBEIRO, V.; MOUTINHO, P.; GUIMARÃES, A.; STABILE, M.; ALENCAR A.; CRISOSTOMO, A. C.; SILVA, D.; SHIMBO, J. **Climate challenges and opportunities in the Brazilian Cerrado**. IPAM: Documentos e Relatórios p.11, 2017. Disponível em: <http://ipam.org.br/wp-content/uploads/2017/11/PB-Cerrado-COP23-web.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2021.

SANO, E. E.; RODRIGUES, A. A.; MARTINS, E. S.; BETTIOL, G. M.; BUSTAMANTE, M. M. C.; BEZERRA, A. S.; COUTO JUNIOR, A. F.; VASCONCELOS, V.; SCHULER, J.; BOLFE, E. L. Cerrado ecoregions: a spatial framework to assess and prioritize Brazilian savanna environmental diversity for conservation. **Journal of Environmental Management**. v. 232, p. 818-828, 2019. Disponível em:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479718313732>. Acesso em: 19 mar. 2022.

SILVA, V. N. **Interação de microrganismos na solubilização de fósforo e potássio de rochas para produção de biofertilizantes**. 2013. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2013. Disponível em:
http://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/12652/1/InteracaoMicroorganismosSolubilizacao_Silva_2013.pdf. Acesso em: 20 mar. 2022.

SINGH, S.; SINGH, V.; PAL, K. Importance of microorganisms in agriculture. **Climate and**

Environmental changes: Impact, Challenges and Solutions, v. 1, p. 93-117, 2017.

Disponível em: http://www.researchgate.net/profile/Satybhan-Singh/publication/322926367_IMPORTANCE_OF_MICRO_ORGANISMS_IN_AGRICULTURE/links/5a772abb45851541ce5a5a34/IMPORTANCE-OF-MICRO-ORGANISMS-IN-AGRICULTURE.pdf. Acesso em: 14 mai. 2022.

SIX, J.; FREY, S.; THIET, R.; BATTEN, K. Bacterial and fungal contributions to carbon sequestration in agroecosystems. **Soil Science Society of America Journal**, v. 70, p. 555-569, 2006. Disponível em:

<http://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2136/sssaj2004.0347>. Acesso em: 29 fev. 2022.

SORHEIM, R.; TORSVIK, V. L.; GOKSOYR, J. Phenotypical divergences between populations of soil bacteria isolated on different media. **Microbial Ecology**, v. 17, p. 181-192, 1989. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/4251047>. Acesso em: 15 mar. 2021.

TECON, R.; OR, D. Biophysical processes supporting the diversity of microbial life in soil. **Microbiology Reviews**, v. 41, p. 599-623, 2017. Disponível em:

<http://academic.oup.com/femsre/article/41/5/599/4082850>. Acesso em: 15 mar. 2021.

TEIXEIRA, P. C.; DONAGEMMA, G. K.; FONTANA, A.; TEIXEIRA, W. G. **Manual de métodos de análises de solo**. Brasília, DF: EMBRAPA, 2017. Disponível em:

<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1085209/manual-de-metodos-de-analise-de-solo>. Acesso em: 14 jan. 2021.

THORMANN, M. N. Diversity and function of fungi in peatlands: A carbon cycling perspective. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 86, p. 281-293, 2006. Disponível em:

<http://cdnsiencepub.com/doi/abs/10.4141/S05-082>. Acesso em: 14 mai. 2022.

UNKOVICH, M. Isotope discrimination provides new insight into biological nitrogen fixation. **New Phytol New Phytologist**, v. 198, p. 643-646, 2013. Disponível em:

<http://www.jstor.org/stable/newphytologist.198.3.643>. Acesso em: 18 mai. 2022.

VAN DER HEIJDEN, M. G. A.; BARDGETT, R. D.; VAN STRAALLEN, N. M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. **Ecology Letters**, v. 11, p. 296-310, 2008. Disponível em:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x>. Acesso em: 13 jun. 2021.

CAPÍTULO 5 – BACTÉRIAS AUTÓCTONES PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE CANA-DE-AÇÚCAR: ALTERNATIVA PARA MELHORAR A RENTABILIDADE E MINIMIZAÇÃO DO USO DE FERTILIZANTES

RESUMO

Um dos desafios da agricultura é o manejo sustentável do solo, sendo necessárias práticas agrícolas que não impactuem negativamente este ambiente. Neste contexto, microrganismos autóctones podem contribuir para manutenção ou aumento da produtividade com habilidades de promoção de crescimento de plantas, em especial gramíneas como a cana-de-açúcar, com redução no consumo de agroquímicos. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a viabilidade da utilização de bactérias autóctones promotoras fixadoras de nitrogênio e solubilizadoras de fosfato sobre o desenvolvimento da cultura de cana-de-açúcar. Para tal, bactérias isoladas de ambiente de cana-de-açúcar foram testadas isoladamente e/ou combinadas, em condições de vaso, para avaliar a relação microrganismo-solo-planta. O plantio nos vasos foi feito manualmente, utilizando gemas com idade fisiológica de 10 meses da variedade CTC4. O experimento foi realizado em blocos inteiramente casualizados. Foram utilizados 28 tratamentos no solo, com quatro repetições, em períodos de 60 e 90 dias, totalizando 224 vasos. Nos vasos, por meio de amostra composta, foi avaliada a interação microrganismo-solo-planta, pelas características microbiológicas do solo. Nas mudas de cana-de-açúcar foi feita a biometria, sendo os resultados eficientes para promoção de crescimento, associados à adubação microbiana. Os tratamentos que tiveram inoculação microbiana, tanto de bactérias fixadoras de nitrogênio quanto solubilizadoras de fosfato, reduziram a adubação em até 50% sem afetar o desenvolvimento das mudas, sendo os resultados de biometria da cultura superiores à adubação convencional (100%). Os resultados obtidos neste trabalho são importantes para o desenvolvimento de um bioproduto isolado do ambiente de produção da cana-de-açúcar, que permaneça por maior tempo no solo, o que pode melhorar a rentabilidade e o aumento da produtividade, aliados a uma maior economia e à sustentabilidade.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a agricultura mundial passa por uma transição, pela qual se busca reduzir a dependência de fertilizantes químicos por técnicas que possibilitem aumento da produtividade agrícola, com baixo impacto ambiental. Neste contexto, os inoculantes

microbianos podem atender essa necessidade, promovendo a fixação biológica do nitrogênio, a solubilização do fosfato, e liberação de reguladores metabólicos de crescimento.

Atualmente o Brasil é o principal produtor de cana-de-açúcar do mundo. Seus produtos são largamente utilizados para fabricação de açúcar, etanol, biodiesel e energia. Por ser uma planta de crescimento rápido, exige muito do solo, o que pode causar o empobrecimento deste. Além disso, altas dosagens de adubos minerais na agricultura canavieira proporcionam altos custos na produtividade e impactos negativos ao meio ambiente, como a redução de matéria orgânica e contaminação dos lençóis freáticos, reduzindo a qualidade de água nos mananciais (MATOSO *et al.*, 2020). Os fertilizantes convencionais apresentam alta solubilidade, o que acarreta em altos potenciais de perdas (40-70%) de N, P e K para o meio ambiente. Quantidades inadequadas de fertilizantes inviabilizam o processo de produção da cultura devido à elevação dos custos. Em solos tropicais, essa realidade é ainda mais relevante, já que apresentam, em sua maioria, baixa fertilidade química natural.

A busca incessante por maiores produtividades na agricultura tem levado à utilização de altas dosagens de insumos químicos na tentativa de elevar a fertilidade do solo. No entanto, práticas assim podem causar salinização do solo, toxicidade aos vegetais, redução na absorção dos nutrientes aplicados, possíveis riscos ambientais; isso tudo associado aos altos custos de produção (SHAVIV, 2001). As bactérias promotoras de crescimento trazem ganhos tanto ambientais como econômicos, uma vez que são capazes de reduzir o custo com agroquímicos e auxiliam no aumento da produtividade, de forma mais sustentável.

As bactérias diazotróficas endofíticas colonizam o interior dos tecidos vegetais e disponibilizam nitrogênio para as plantas (ESTRADA *et al.*, 2013). As bactérias endofíticas promotoras de crescimento em plantas (BPCP) são aquelas que vivem não somente nas raízes, mas também no seu interior, ou seja, possuem a capacidade de colonizar a superfície das raízes, rizosfera, filosfera e tecidos internos das plantas, sem causar danos às mesmas (HALLMANN *et al.*, 1997; TAULÉ *et al.*, 2012). Essas bactérias contribuem com efeitos benéficos no desenvolvimento das plantas (LAZARETTI; BETTIOL, 1997) e ainda reduzem os custos com o uso de insumos agrícolas (LAVIE; STOTZKY, 1986). O uso dessas bactérias desencadeia processos na planta e no solo, pela fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios, solubilização de fósforo e zinco e melhoria no sistema de defesa da planta contra patógenos e pragas (PEDULA *et al.*, 2016), porém a eficiência desses processos benéficos à planta dependerá do genótipo plantado e dos níveis de fertilidade do solo (PEREIRA *et al.*, 2013).

As BPCP atuam no crescimento das plantas por diversas formas, tais como: possuem capacidade de fixação biológica de nitrogênio (HUERGO *et al.*, 2008); produzem hormônios como auxinas, citocininas (TIEN; GASKINS; HUBBELL 1979), giberelinas (BOTTINI *et al.*, 1989), etileno (STRZELCZYK *et al.*, 1994) além de várias outras moléculas (PERRIG *et al.*, 2007); são capazes também solubilizar fosfato (RODRIGUEZ *et al.*, 2004), além de possuir a função de agente de controle biológico de patógenos (CORREA *et al.*, 2008).

Na literatura bactérias do gênero *Azospirillum* são relatadas como organismos capazes de reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados e fosfatados, já que possibilitam um maior aproveitamento desses adubos, com consequente redução de gastos (FERREIRA *et al.*, 2017). Conforme Gordillo-Delgado, Marín e Calderón (2016) espécies de *Azospirillum brasilienses* possuem a característica de produzir fitormônios e solubilização de bases fosfatadas. Já as espécies de *Bacillus subtilis*, ao interagirem com as raízes, proporcionam o crescimento da planta pela síntese de metabólitos secundários, antibióticos, hormônios, antioxidantes e enzimas degradadoras de células, solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio (HASHEM; BABY; ELSAYED, 2019). *Pseudomonas fluorescens* auxiliam na nutrição de fósforo para as plantas, pois ao solubilizarem fosfato inorgânico produzem ácidos (cítrico, oxálico e glucônico), ocasionando também a redução do pH (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

A fonte de carbono, de fosfato disponível e a de nitrogênio podem ter participação decisiva nos processos de solubilização de nutrientes. Em geral, o potencial de solubilização aumenta quando há absorção de fontes amoniacais e diminui com as fontes nítricas. Da mesma forma, as bases fosfatadas de cálcio favorecem a solubilização de nutrientes quando comparadas com as bases de ferro e alumínio (SILVA FILHO; VIDOR, 2001). Todos os processos enzimáticos que favorecem ou ocasionam a liberação de ácidos orgânicos por microrganismos no meio favorecem o processo de solubilização em geral.

Embora o potencial de bactérias promotoras de crescimento tenha sido relatado para o uso generalizado na agricultura, há uma carência de produtos biológicos específicos para o ambiente de produção da cana-de-açúcar. A eficiência no uso desses microrganismos depende do conhecimento de suas características, as quais podem variar de acordo com o microrganismo utilizado e as variações do meio ambiente (SILVA FILHO; VIDOR, 2001). Assim, faz-se necessário o isolamento e a caracterização de microrganismos autóctones que são mais adaptados ao ambiente de produção e permanecem por mais tempo no solo. Diante desse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade da utilização de bactérias

autóctones promotoras fixadoras de nitrogênio e solubilizadoras de fósforo sobre o desenvolvimento da cultura de cana-de-açúcar.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivo das bactérias autóctones

Antes do plantio, foi realizada a multiplicação das espécies para inoculação nos tratamentos. A seleção foi feita conforme o potencial de fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato das espécies analisadas. Dessa forma, de cada espécie escolhida foi isolada uma colônia e inoculada em tubo de ensaio contendo 10,0 mL de meio caldo nutriente. Os tubos foram mantidos em incubadora BOD por 30°C até que apresentassem turbidez do meio e uma película sobrenadante característica do crescimento microbiano. Em seguida, o volume total de cada tubo foi disperso em frasco erlenmeyer contendo 90 mL de meio caldo nutriente e mantido por 24 horas em mesa agitadora a 150 rpm. Os 100 mL de inóculo formados foram quarteados em alíquotas de 25 mL e transferidos para novos erlenmeyers contendo 225 mL de caldo nutriente por mais 24 horas. Essa concentração (10 % de inóculo) foi respeitada e mantida até que fosse atingido o volume necessário para o plantio. A concentração bacteriana final para inoculação no plantio das gemas de cana-de-açúcar, foi superior à ordem de 10^7 UFC mL⁻¹ de inóculo.

2.2 Área experimental e instalação dos vasos

O solo utilizado no experimento foi obtido em área sem cultivo prévio e sem nenhuma cultura (solo virgem). Os vasos foram colocados em estufa de área nivelada e sem vegetação arbórea próxima, evitando interferências da exposição dos vasos à radiação solar. Foram utilizados vasos perfurados para drenagem e para evitar a perda de solo, os quais possuíam o volume máximo de 3 L, sendo cada vaso considerado como uma unidade experimental (parcela). O plantio foi feito manualmente, utilizando gemas com idade fisiológica de 10 meses da variedade CTC 4.

O experimento foi realizado em blocos inteiramente casualizados, sendo inoculadas 2 estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio e 2 solubilizadoras de fósforo, sendo estas avaliadas de forma isolada e combinadas. Após o enchimento dos vasos com o solo virgem, realizou-se o processo de adubação, abrindo um sulco no centro do vaso e depositando em seguida a quantidade proporcional de adubo, mediante cada tratamento. O padrão de cálculo de adubo utilizado na região prevê a utilização de 180 Kg de fósforo por hectare, para o plantio de

cana-de-açúcar. O adubo utilizado corresponde ao percentual de 06-30-10 de NPK, respectivamente. Como um hectare equivale a 6.666 metros lineares, necessita-se uma quantidade de 27 gramas de fósforo por metro linear. O sulco aberto no vaso foi de aproximadamente 10 cm, caracterizando em 2,7 g de adubo. Esse valor foi arredondado para 3,0 gramas e essa é a representação correspondente à adubação (100%), conforme ocorre nos canaviais da região atualmente. Para os tratamentos de 80% e 50% foram realizadas as equivalências que constituíram em 2,4 e 1,5 gramas por vaso, respectivamente.

Após inserção do adubo, realizou-se homogeneização em torno do sulco e o plantio das gemas. Sobre cada gema plantada foram adicionados 5,0 mL de cada inóculo correspondente ao tratamento, sendo que os tratamentos combinados de duas espécies receberam 2,5 mL de cada inóculo. Os tratamentos foram assim realizados em quadruplicatas conforme (Tabela 1).

Tabela 1 – Tratamentos em condição de vaso utilizando solo virgem, quanto às adubações aplicadas e microrganismos inoculados

Tratamentos (porcentagem de adubação)			
100%	80%	50%	0%
Controle 100%	Controle 80%	Controle 50%	Controle 0%
P ₁ 100%	P ₁ 80%	P ₁ 50%	P ₁ 0
P ₂ 100%	P ₂ 80%	P ₂ 50%	P ₂ 0
N ₁ 100%	N ₁ 80%	N ₁ 50%	N ₁ 0
N ₂ 100%	N ₂ 80%	N ₂ 50%	N ₂ 0
P ₁ N ₁ 100%	P ₁ N ₁ 80%	P ₁ N ₁ 50%	P ₁ N ₁ 0%
P ₂ N ₂ 100%	P ₂ N ₂ 80%	P ₂ N ₂ 50%	P ₂ N ₂ 0%

*P₁- Estirpe 1 de bactéria solubilizadora de fósforo; P₂- Estirpe 2 de bactéria solubilizadora de fósforo; N₁- Estirpe 1 de bactéria fixadora de nitrogênio; N₂- Estirpe 2 de bactéria fixadora de nitrogênio; P₁N₁- Estirpe 1 de bactéria fixadora de nitrogênio + - Estirpe 1 de bactéria solubilizadora de fósforo; P₂N₂- Estirpe 2 de bactéria fixadora de nitrogênio + Estirpe 2 de bactéria solubilizadora de fosfato.

Dessa forma, foram plantados 224 vasos, disponibilizando 3 gemas em cada recipiente e sendo o desbaste realizado após 12 dias, deixando apenas uma muda em cada vaso. Avaliou-se também a influência da adubação sobre a atividade destes microrganismos em promover o crescimento das mudas de cana-de-açúcar. Após o período de 60 dias ocorreu a primeira análise, pela qual se avaliou a interação microrganismos-solo-planta.

2.3 Avaliações das características microbiológicas do solo

Foram avaliadas então 29 amostras de solo aos 60 e 90 dias após plantio, dentre elas 28 tratamentos e 1 solo virgem, que não recebeu nenhum tipo de adubação e/ou inoculação. Ressalta-se que se avaliou a amostra composta de cada tratamento, por meio da homogeneização de cada repetição, obtendo assim 28 tratamentos. Estas foram secas, peneiradas e mantidas resfriadas à temperatura de 6°C, a fim de inibir a atividade microbiana.

Para as análises microbiológicas as amostras foram retiradas da geladeira e mantidas à temperatura ambiente, no escuro por 24 h. Utilizou-se 5,0 gramas de solo e 45 mL de solução extratora para solo argiloso (0,1% de pirofosfato de sódio em água destilada), sendo então colocadas sob agitação à rotação de 150 rpm em mesa agitadora por 30 minutos, em temperatura ambiente. Após a extração, foram feitas diluições seriadas em tubos de ensaio contendo 9,0 mL de água de diluição (solução salina (NaCl) 0,9% m/v). Foram realizadas então as análises microbiológicas de cada tratamento, com a avaliação das unidades formadoras de colônia em meio ágar nutriente para bactérias totais, meio seletivo para bactérias fixadoras de nitrogênio e para solubilizadoras de fosfato. Todo o plaqueamento foi realizado com inoculação por profundidade, adicionando primeiramente o inóculo (0,1 mL) e em seguida o meio seletivo, conforme o microrganismo de interesse.

2.3.1 Bactérias totais (OLSEN; BAKKEN, 1987; SORHEIM *et al.*, 1989)

Para contagem do número total de bactérias foi utilizado o meio de cultura Ágar Nutriente, preparado conforme orientação na embalagem, incubados em estufa BOD (*Biochemical Oxygen Demand*), com temperaturas de 30°C, em ausência de luz. Foi adicionado ao meio 1,0 g L⁻¹ de antifúngico com a intenção de evitar a contaminação por fungos. Foram inseridos 0,1 mL de inóculo em cada placa de Petri estéril e adicionado aproximadamente 15 mL de meio, realizado em seguida a homogeneização. As contagens das UFCs (unidades formadoras de colônias) foram realizadas 48 horas após a inoculação em um contador de colônias com 6x de aumento.

2.3.2 Bactérias fixadoras de Nitrogênio (DÖBEREINER *et al.*, 1995)

As diluições selecionadas foram inoculadas (0,1 mL) em meio NFB semi-sólido, isento de nitrogênio. Para o preparo do meio foram pesados: 5,0 g de C₄H₆O₅ (ácido málico); 0,5 g de K₂HPO₄ (fosfato de potássio dibásico); 0,2 g de MgSO₄.7H₂O (sulfato de magnésio heptahidratado); 0,1 g de NaCl (cloreto de sódio); 0,02 g de CaCl₂ (cloreto de cálcio); 2,0 mL de solução de micronutrientes: [0,04 g CuSO₄.5H₂O (sulfato de cobre pentahidratado); 1,2 g ZnSO₄.7H₂O (sulfato de zinco heptahidratado); 1,4 g H₃BO₃ (ácido bórico); 1,0 g Na₂MoO₄.2H₂O (molibdato de sódio dihidratado); 1,175 g de MnSO₄.H₂O (sulfato de manganês hidratado); em 200 mL de água destilada]; 1,0 mL de solução de vitaminas: [100 mg de biotina; 200 mg de piridoxol-HCl; 200 mL água destilada]; 2,0 mL de C₂₇H₂₈Br₂O₅ (azul de bromotimol) a 0,5 % diluído em KOH (hidróxido de potássio) 0,2 N; 4,0 mL de C₁₀H₁₂N₂O₈FeNa.3H₂O (EDTA férrico) em solução aquosa a 1,64 %; 18,0 g de ágar

bacteriológico; 1000 mL de água destilada. As placas de Petri previamente esterilizadas foram incubadas pelo método *pour-plate* e alocadas em estufas BOD a 30°C, durante 7 dias.

2.3.3 Bactérias solubilizadoras de fosfato (NAUTIYAL, 1999)

Foi utilizado o meio sólido NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate Growth Medium). Para o preparo do meio foram pesados: [10,0 g de $C_6H_{12}O_6$ (glicose); 5,0 g de $Ca_5(OH)(PO_4)_3$ (hidroxiapatita de cálcio); 5,0 g de $MgCl_2$ (cloreto de magnésio); 0,25 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (sulfato de magnésio pentahidratado); 0,2 g de KCl (cloreto de potássio); 0,1 g de $(NH_4)_2SO_4$ (sulfato de amônia); 15,0 g de ágar bacteriológico; 1 L de água destilada. Foi acrescido ao meio 1,0 mL L⁻¹ de actidione visando a não-contaminação por fungos. As placas de Petri previamente esterilizadas foram incubadas pelo método *pour-plate* e alocadas em estufas BOD a 30°C, durante 15 dias, sendo então contadas as UFCs.

2.4 Determinação das características químicas do solo

A caracterização química do solo virgem utilizado no experimento foi realizada avaliando os seguintes elementos: P, K, Ca, Mg, Al, H⁺, Al, MO (RAIJ *et al.*, 2001). Além disso, por cálculo foram obtidos a SB, CTC e V%, realizadas no Laboratório de Fertilidade do Solo Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (FERTLAB) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus Jaboticabal/SP.

2.5 Biometria das mudas de cana-de-açúcar

A altura (cm) das mudas de cana-de-açúcar foi determinada medindo-se da base da planta até a lígula da folha +1 (sistema de numeração de Kuijper) utilizando régua graduada. O comprimento das raízes também foi determinado em (cm). Os pesos de massas secas das raízes e da parte aérea foram expressos em (g), sendo as mesmas colocadas na estufa a 65°C e pesadas a cada 24h até que não houvesse alteração no peso – matéria seca (MS). Essas foram pesadas em balança com precisão de 0,1 g e acondicionadas em saco de papel kraft.

Para interpretação do experimento, os dados microbiológicos e de biometria da cana-de-açúcar foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) utilizando o *Software* Minitab-2017. O *Software* Statistic também foi utilizado no intuito de comparação de todos os atributos avaliados detectando ou não possíveis linearidades estatísticas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Da avaliação do número de bactérias totais o tratamento que apresentou maior quantificação de UFCs 60 dias após o plantio, foi com associação de microrganismos de N e P

utilizando 50% de adubação (P2N2). Aos 90 dias após inoculação, na ausência de adubação, o tratamento P2 apresentou diferença significativa no número de colônias (Tabela 2).

Tabela 2 – Interação microrganismos-solo - Unidades formadoras de colônia de bactérias totais 60 e 90 dias após a inoculação de bactérias autóctones com diferentes adubações, em condição de vasos com plantio de cana-de-açúcar

Tratamentos	100%	80%	50%	0%
Tempo 60 dias				
UFC x 10⁶ g⁻¹ solo seco de bactérias totais				
P1	80,0 ± 10,0 def	15,33 ± 4,0 gh	34,0 ± 8,89 efgh	4,0 ± 1,0 h
P2	133,3 ± 35,1 cd	83,3 ± 30,5 de	25,3 ± 5,5 efgh	3,0 ± 1,0 h
N1	153,33 ± 15,27 c	18,0 ± 3,6 fgh	27,0 ± 2,65 efgh	5,33 ± 2,08 h
N2	120,0 ± 30,0 cd	12,33 ± 2,5 h	16,3 ± 3,0 gh	5,33 ± 0,57 h
P1N1	115,0 ± 16,6 cd	70,0 ± 28,3 defgh	116,7 ± 15,3 cd	25,0 ± 12,7 efgh
P2N2	76,7 ± 30,5 defg	35,0 ± 7,1 efgh	286,7 ± 37,8 a	26,0 ± 4,6 efgh
Controle	12,33 ± 0,58 h	29,67 ± 9,6 efgh	80,33 ± 21,31 def	9,0 ± 2,6 h
Tempo 90 dias				
UFC x 10⁶ g⁻¹ solo seco de bactérias totais				
P1	9,67 ± 4,72 h	6,0 ± 1,7 h	1,67 ± 1,1 h	15,0 ± 7,0 gh
P2	80,0 ± 17,3 def	10,0 ± 2,0 h	17,0 ± 5,3 gh	220,0 ± 43,5 b
N1	9,67 ± 4,72 h	4,33 ± 3,2 h	16,33 ± 0,58 gh	25,75 ± 14,1 efgh
N2	13,33 ± 5,8 h	8,67 ± 2,5 h	36,0 ± 6,0 efgh	19,0 ± 7,1 efgh
P1N1	36,7 ± 11,6 efgh	1,3 ± 0,6 h	10,0 ± 3,6 h	5,67 ± 2,5 h
P2N2	36,0 ± 2,6 efgh	7,7 ± 2,1 h	14,7 ± 5,5 gh	6,3 ± 0,6 h
Controle	7,67 ± 4,33 h	20,67 ± 6,65 fgh	4,0 ± 1,0 h	12,0 ± 4,0 h
Valor P¹	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005

¹Valor P referente ao teste de Análise de Variância (ANOVA) a P<0,05. ²Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas pelos testes de comparação múltipla post-hoc de Tukey a P<0,05.

Observou-se efeito significativo para a interação entre fertilizante e bactérias totais, todos os tratamentos com adubação 100% e 80% apresentarem redução populacional aos 90 dias após o plantio das mudas, quando comparado ao apresentado aos 60 dias. Esse resultado favorece um pressuposto de certa toxicidade quanto a altas concentrações de fertilizante. Essa informação está de acordo com Silva (2012) que relatou sobre a adição de nutrientes em áreas de Cerrado, causando variações na abundância de espécies bacterianas, principalmente naquelas com menor frequência relativa. Elsas (2019) também defende em seu trabalho que altas doses de nutrientes afetam negativamente a biomassa microbiana.

Em se tratando das fixadoras de nitrogênio, independente da estirpe de bactéria testada, foi evidenciado que todos os tratamentos, com exceção aos de 100%, favoreceram o crescimento de populações aos 90 dias após o plantio (Tabela 3) quando comparado aos de 60 dias. As maiores dosagens de fertilizante não apresentaram o pressuposto de toxicidade na determinação de unidades formadoras de colônias, já que suas avaliações desenvolveram um comportamento linear irregular.

Tabela 3 – Interação microrganismos-solo - Unidades formadoras de colônia de bactérias fixadoras de nitrogênio 60 e 90 dias após a inoculação de bactérias autóctones com diferentes adubações, em condição de vasos com plantio de cana-de-açúcar

Tratamentos	100 %	80 %	50 %	0 %
Tempo 60 dias	UFC x 10⁶ g⁻¹ solo seco de bactérias fixadoras de nitrogênio			
P1	45,3 ± 16,7 g	11,3 ± 20,8 fg	18,7 ± 5,5 g	9,7 ± 1,0 g
P2	10,3 ± 13,2 g	47,7 ± 3,5 g	21,33 ± 0,6 g	19,0 ± 2,6 b
N1	81,0 ± 5,2 g	11,7 ± 6,8 g	22,3 ± 9,4 g	19,7 ± 208 bcde
N2	67,7 ± 25,8 fg	10,0 ± 15,7 g	26,0 ± 2,6 g	9,3 ± 1,5 g
P1N1	76,3 ± 17,1 defg	29,0 ± 1,7 g	63,7 ± 1,5 g	15,0 ± 17,3 g
P2N2	56,33 ± 7,6 g	19,3 ± 1,5 g	136,7 ± 5,7 a	16,33 ± 1,1 g
Controle	10,3 ± 3,5 g	25,7 ± 1,1 g	32,3 ± 3,2 g	10,3 ± 1,5 g
Tempo 90 dias	UFC x 10⁶ g⁻¹ solo seco de bactérias fixadoras de nitrogênio			
P1	33,0 ± 18,0 g	1103,3 ± 32,9 cdef	1700,0 ± 45,8 abc	81,0 ± 4,3 fg
P2	9,7 ± 0,6 g	78,3 ± 9,0 fg	96,0 ± 12,0 fg	2180,0 ± 38,0 ab
N1	13,3 ± 5,8 g	107,3 ± 22,0 fg	190,3 ± 33,0 fg	76,2 ± 8,1 g
N2	7,0 ± 1,0 g	360,0 ± 15,6 defg	147,3 ± 20,6 fg	91,5 ± 14,8 fg
P1N1	8,3 ± 2,5 g	109,7 ± 13,5 fg	829,0 ± 63,5 cdefg	148,0 ± 32,8 fg
P2N2	213,3 ± 17,9 efg	259,7 ± 19,2 efg	2333,3 ± 37,9 a	80,0 ± 14,0 fg
Controle	5,7 ± 1,5 g	68,0 ± 19,0 g	1333,3 ± 15,3 abcd	65,7 ± 8,7 g
Valor P¹	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005

¹Valor P referente ao teste de Análise de Variância (ANOVA) a P<0,05. ²Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas pelos testes de comparação múltipla post-hoc de Tukey a P<0,05.

Observou-se que após 90 dias de plantio/inoculação a associação de bactérias tratamento (P2N2) com 50% de adubação permitiu alta contagem de UFCs, seguidos pelos tratamentos P2 0% e P1 50%. Silva Filho e Vidor (2001) defendem em seu trabalho que isolados de solubilização de fosfatos apresentam maior relação (halo:colônia) quando há presença de fonte nitrogenada, principalmente de bases amoniacais. Dessa forma, a combinação de isolados nesse trabalho, nesse caso o tratamento P2N2, facilita a disponibilidade de nutrientes de bases nitrogenadas e fosfatadas, para utilização microrganismos-planta.

Na contagem de UFCs de bactérias solubilizadoras de fósforo (Tabela 4) aos 60 dias, os maiores valores observados nos tratamentos foram N2, P2, e a associação de bactérias de N e P (P2N2). Os menores valores foram observados no controle aos 60 dias com 50% de adubação e aos 90 dias todos os controles apresentaram números de UFCs limitados.

Tabela 4 – Interação microrganismos-solo - Unidades formadoras de colônia de bactérias solubilizadoras de fósforo 60 e 90 dias após a inoculação de bactérias autóctones com diferentes adubações, em condição de vasos com plantio de cana-de-açúcar

Tratamentos	100%	80%	50%	0%
Tempo 60 dias	UFC x 10⁸ g⁻¹ solo seco de bactérias solubilizadoras de fosfato			
P1	28,4 ± 5,5 ghijk	73,3 ± 22,0 defg	2,0 ± 0,3 jk	74,7 ± 12,8 defg
P2	4,8 ± 0,9 jk	34,9 ± 6,5 fghijk	3,3 ± 0,5 jk	127,7 ± 8,0 ab
N1	44,2 ± 12,9 fghijk	49,2 ± 16,8 efghij	41,3 ± 25,2 fghijk	7,0 ± 0,2 jk
N2	95,7 ± 24,4 bcde	37,3 ± 15,4 fghijk	2,3 ± 0,02 jk	148,0 ± 10,6 a
P1N1	43,5 ± 16,7 fghijk	40,0 ± 2,1 fghijk	4,0 ± 0,6 jk	13,0 ± 0,3 ijk
P2N2	35,5 ± 6,9 fghijk	12,7 ± 2,5 ijk	99,9 ± 26,6 bcd	134,3 ± 5,1 ab
Controle	36,8 ± 13,2 fghijk	6,4 ± 2,4 jk	1,1 ± 0,1 k	35,7 ± 10,8 fghijk
Tempo 90 dias	UFC x 10⁷ g⁻¹ solo seco de bactérias solubilizadoras de fosfato			
P1	124,7 ± 5,0 abc	3,4 ± 0,6 jk	2,0 ± 0,3 jk	28,4 ± 5,5 fghijk
P2	107,3 ± 8,2 abcd	5,4 ± 1,0 jk	3,3 ± 0,5 jk	5,5 ± 0,7 jk
N1	66,7 ± 6,1 defgh	1,3 ± 0,1 k	41,3 ± 25,2 fghijk	42,8 ± 10,7 fghijk
N2	72,7 ± 16,8 defg	19,1 ± 6,3 hijk	2,3 ± 0,02 jk	61,0 ± 1,4 defghi
P1N1	8,0 ± 0,6 ijk	1,2 ± 0,4 k	4,0 ± 0,6 jk	5,4 ± 0,7 jk
P2N2	98,9 ± 9,9 bcd	5,4 ± 2,9 jk	99,9 ± 26,6 bcd	2,9 ± 0,2 jk
Controle	5,7 ± 0,2 jk	3,0 ± 0,2 jk	1,1 ± 0,1 k	1,3 ± 0,5 k
Valor P¹	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005

¹Valor P referente ao teste de Análise de Variância (ANOVA) a P<0,05. ²Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas pelos testes de comparação múltipla post-hoc de Tukey a P<0,05.

Alguns testes com bactérias solubilizadoras de fosfatos realizados por Silva Filho e Vidor (2001) apresentaram resultados de maior potencial de solubilização quando da presença de maiores níveis de K no meio. Neste trabalho o solo virgem apresentou quantidades significantes desse nutriente (Tabela 5), porém ainda com valores insatisfatórios para a cultura da cana-de-açúcar que é no mínimo 80 kg.K₂O ha⁻¹ (BHATT; SINGH; KASHYAP, 2022), visando alta produtividade da cultura.

Tabela 5 – Caracterização química de Latossolo Vermelho, utilizado no experimento, em condições de vaso.

Solo virgem	P resina	Mo	pH	Ca ²⁺	K ⁺	Mg ²⁺	H+Al	SB	CTC	V
	mg /dm ³	g/dm ³	CaCl ₂			mmol/dm ³			potencial	%
	3	27	5,3	0,8	47	17	42	65	107	61

P resina = Fósforo extraído do solo por resina trocadora de íons MO 31= matéria orgânica pH em CaCl₂ = pH determinado em solução centimolar de cloreto de cálcio K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ e Al³⁺ = respectivamente potássio, cálcio, magnésio e alumínio trocáveis H+Al = acidez potencial SB = soma de bases (Ca²⁺ + Mg²⁺ + K⁺) CTC = capacidade de troca de cátions = SB + (H+Al) V = índice de saturação por bases = 100SB/CTC S-SO₄²⁻ = enxofre na forma de sulfato extraído com solução de Ca (H₂PO₄)₂ 0,01 mol/L.

Estabelecer os níveis críticos de MO no solo para garantir maiores produtividades é um desafio, já que esta exerce grande influência na capacidade produtiva, impactando a nutrição

das plantas e a produção agrícola. Para tal, os índices satisfatórios de MO nos solos são em torno de 2% (DORAN *et al.*, 1996), nível esse encontrado no solo virgem desse trabalho. Na análise de biometria da cana-de-açúcar, quanto à avaliação do comprimento da raiz, houve diferença significativa entres os tratamentos avaliados aos 60 dias, P1N1 com 50% de adubação e em P2N2 sem adubação, quando comparados a outros tratamentos (P1N1 100%, N1 50%, N2 50%, P2 0% e N1 0%) (Figura 1).

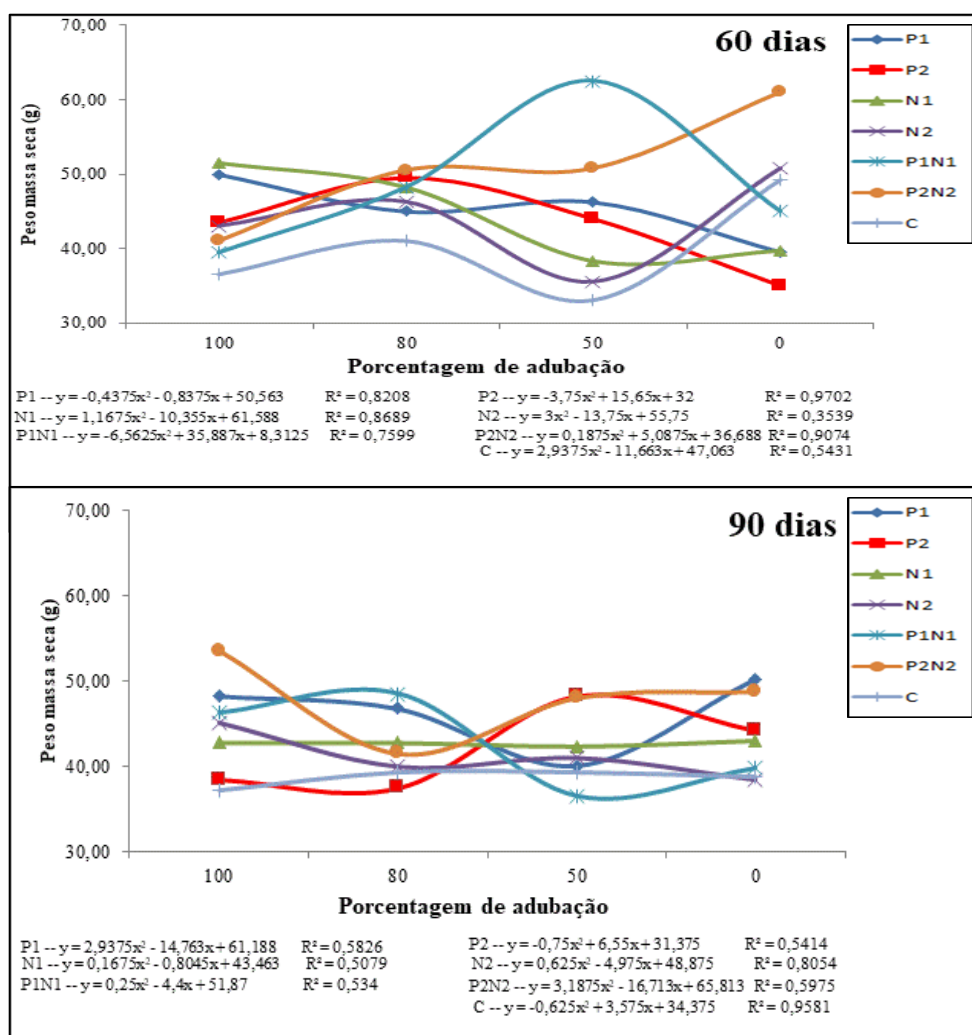


Figura 1 – Análise da biometria da cana-de-açúcar: Comprimento da raiz em (cm) aos 60 e 90 dias após o plantio das gemas e a inoculação de bactérias autóctones com diferentes adubações, em condição de vasos

Ao analisar a Figura 1 pode-se perceber a influência do comportamento dos dados na formação de uma parábola, fato esse que definiu o modelo matemático com maior afinidade para elaboração da equação da reta e do R-quadrado. Quanto ao parâmetro comprimento da raiz já era esperado que não houvesse diferença significativa aos 90 dias, pois as raízes cresceram entre os orifícios de drenagem dos vasos, invadindo as camadas do solo. Ao retirar os vasos para as

análises ocorreu a ruptura de raízes, reduzindo o seu comprimento e comprometendo esse parâmetro avaliado.

As análises de massa seca das raízes tiveram diferença estatística para 80 % de adubo no tratamento P2N2 aos 90 dias após o plantio (Figura 2). Não houve coerência de atributos comprimento da raiz – Peso massa seca da raiz, nos quais os tratamentos P1N1 50 % e P2N2 0 % tiveram destaque na análise de comprimento da raiz. Esses atributos nem sempre apresentam proporcionalidade, já que raízes de menor crescimento podem também apresentar maior densidade ocasionando elevação na (MSR).

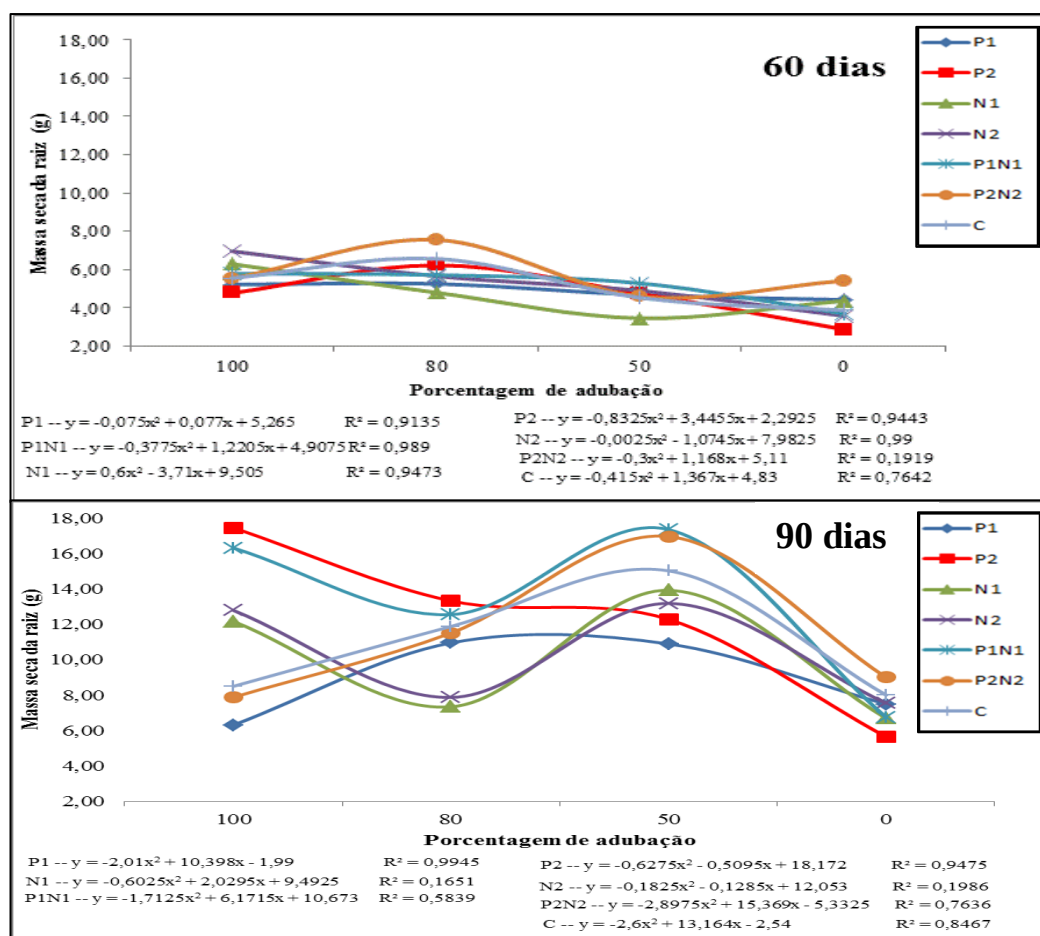


Figura 2 – Análise da biometria da cana-de-açúcar: Massa seca da raiz em (g) aos 60 e 90 dias após o plantio das gemas e a inoculação de bactérias autóctones com diferentes adubações, em condições de vasos

Não é de se impressionar que o tratamento combinado P2N2 fosse significativo nos parâmetros biométricos avaliados, já que foi o tratamento que mais proporcionou a riqueza de microrganismos fixadores/solubilizadores. Apesar do tratamento P2N2 (0% de adubação) ter sido significativo no parâmetro comprimento da raiz, pode-se observar no parâmetro Massa seca da raiz (MSR) que essas necessitam complementação de adubação química para o seu

desenvolvimento, já que todos os resultados de MSR sem adubação, foram menores quando comparado aos demais.

O fósforo é o segundo nutriente mais exigido pela planta e seu metabolismo; sua presença está proporcionalmente associada ao crescimento, produtividade e qualidade traduzida em açúcares totais recuperáveis (ATR) da cana-de-açúcar. A disponibilidade desse nutriente para as plantas através das raízes depende de vários fatores físico-químicos como a textura, o pH e a umidade do solo (BHATT, 2020). Existe uma tendência de aplicação de doses mais altas desse nutriente em culturas de cana-de-açúcar, já que sua aplicação tem aumentado à produtividade e qualidade da cultura e o fato dos fertilizantes fosfatados possuírem disponibilidade de P disponível diferentes. Latossolos vermelhos geralmente são notificados como deficientes de P, porém, em longo prazo altas doses de fertilizantes fosfatados podem comprometer a sustentabilidade com sérias implicações ecológicas (BHATT; OLIVEIRA; SILVA, 2021).

Os gêneros de bactérias (*Acetobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Klebsiella* e *Serratia*) foram designados como capazes de promover o desenvolvimento vegetal, aumento na produtividade de grãos, incremento na emergência de sementes, adição de biomassa vegetal, resistência às pragas e doenças e acréscimo no rendimento de colheita (KANG *et al.*, 2019). Os vegetais podem também aumentar e rearranjar seus sistemas radiculares, aumentar a eficiência dos transportadores de P nos tecidos, sintetizar as enzimas fosfatases ou estimular microrganismos produtores da mesma (RAMAEKERS *et al.*, 2010). Na análise de biometria da cana-de-açúcar (Figura 3), a interação entre a atividade de microrganismos e o desenvolvimento do sistema radicular da planta foram determinantes no comprimento e no peso de massa seca das raízes.

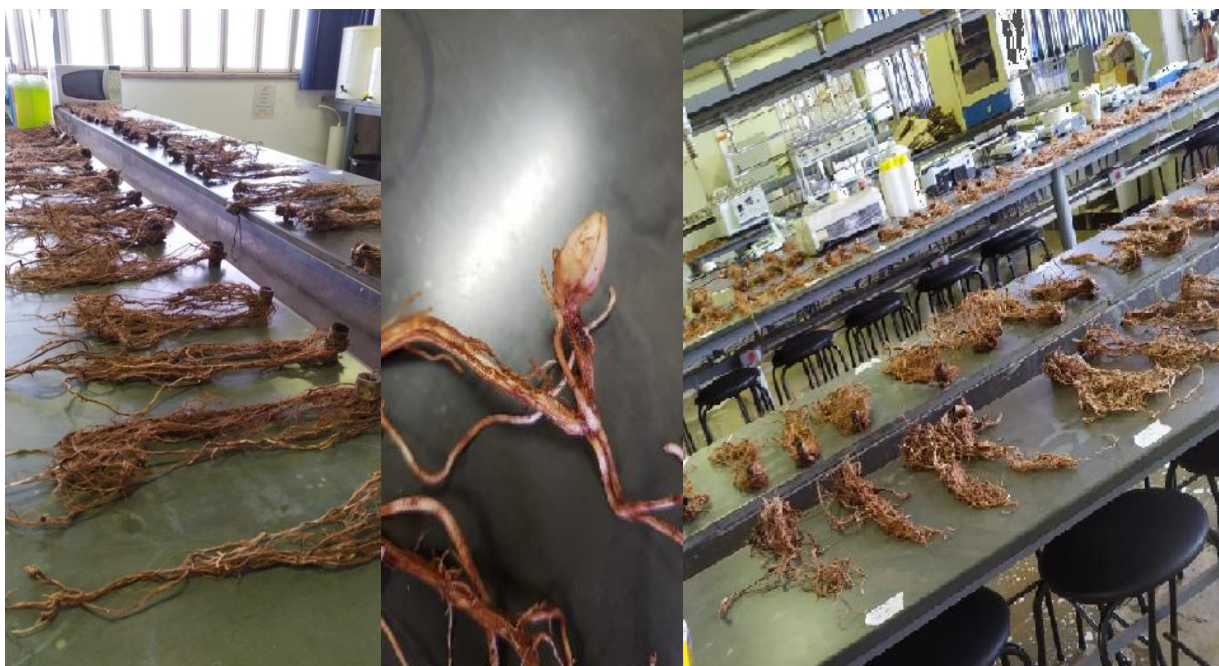


Figura 3 – Biometria da cana-de-açúcar aos 90 dias após plantio: Raízes na avaliação de comprimento e massa seca.

Fonte: o autor.

Uma grande diversidade de funções microbianas foi descoberta para o enriquecimento dos solos, tais como fixadores de nitrogênio, oxidantes de amônia, redutores de nitrato, sulfato e ferro, fermentadores e degradadores aeróbicos de carbono orgânico. Dessa forma o solo tem se apresentado como um local de grandes e diferentes funcionalidades microbianas (ELSAS *et al.*, 2019).

Os microrganismos trabalharam como promotores de crescimento da cultura de cana-de-açúcar, destacando-se para os tratamentos com 50 % de adubação (Figura 4). O nitrogênio apresenta alta correlação entre o número de perfilhos (Figura 5) e a produtividade do canavial (VITTI *et al.*, 2007). A carência desse nutriente reflete diretamente na redução da síntese de clorofila e aminoácidos essenciais, e também na energia para a produção de carboidratos e esqueleto carbônico, o que reduz diretamente o desenvolvimento e produtividade da planta (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997). A mineralização resulta em maior disponibilidade de N no solo, porém depende de vários fatores como textura do solo, precipitação recebida, conteúdo de matéria orgânica, variações na temperatura e intensidade no preparo do solo (BHATT; SINGH; KASHYAP, 2022). Além disso, estudo realizado por Oliveira *et al.*, (2018) destacou a relevância da disponibilidade de P para melhor absorção relativa de N pela planta. Canas com suprimento suficiente de P apresentaram maior eficiência de extrair nitrato da solução do solo, apresentando também maior absorção pelo acúmulo de proteína nas folhas e

raízes (RUFTY; MACKOWN; ISRAEL, 1990). Nesse trabalho, verificou-se a necessidade da análise de nitrogênio da planta para correlação com os resultados de biometria da cana-de-açúcar e da microbiota.

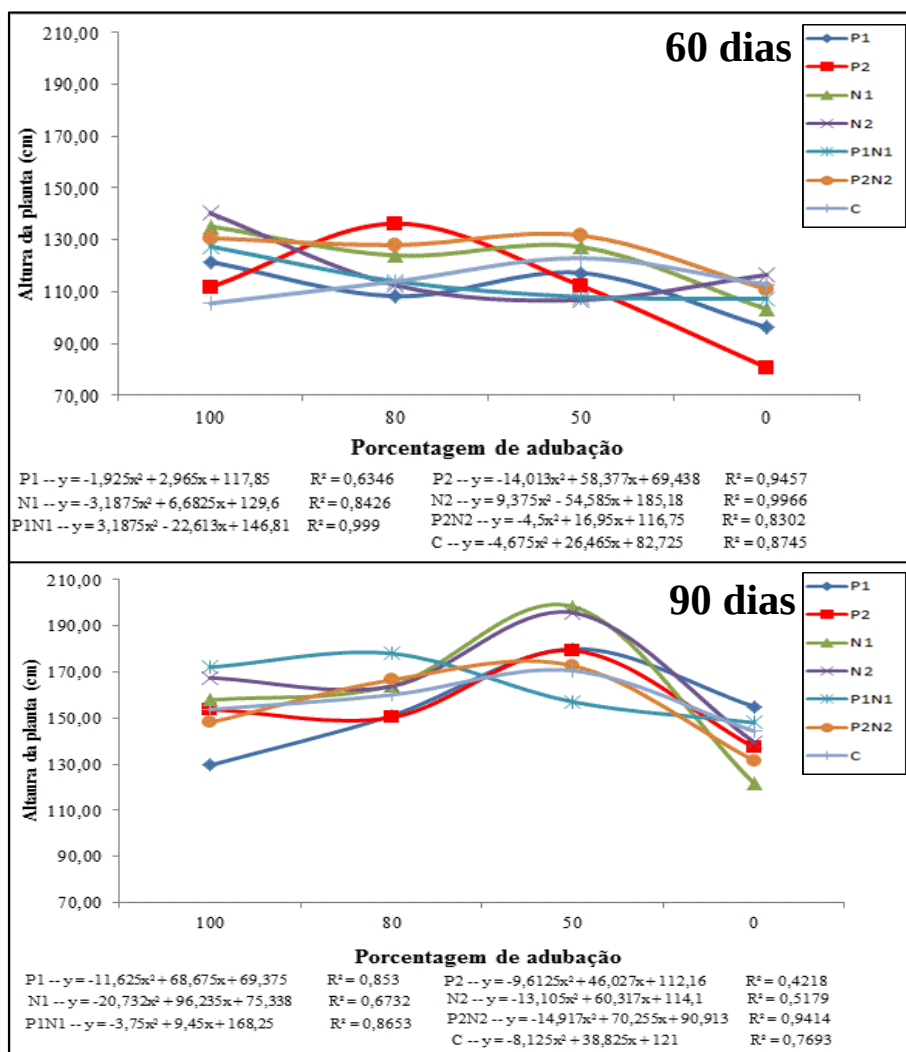


Figura 4 – Análise da biometria da cana-de-açúcar: Altura da planta em (cm) aos 60 e 90 dias após o plantio das gemas e a inoculação de bactérias autóctones com diferentes adubações, em condição de vasos



Figura 5 – Cana-de-açúcar aos 60 dias após plantio para análise de biometria.

Fonte: o autor.

A produção e utilização de microrganismos promotores de crescimento no mercado são ainda limitadas, por questões inconsistentes de trabalhos científicos e pela dificuldade de aplicação em campo; essa realidade necessita estudos aprofundados que contribuam para o avanço científico e com aplicabilidade nos sistemas agrícolas (KANG *et al.*, 2015). A gestão no desenvolvimento desse mercado de promotores biológicos de crescimento da cultura é muito importante, de acordo com Sharma *et al.*, (2013) o microrganismo que apresenta melhor atividade *in vitro* pode não desenvolver o esperado no campo; além disso espécies de determinados tipos de solos podem não ser tão eficientes em ambientes diferentes.

Os resultados de Massa seca da planta (MSP) corresponderam aos resultados de altura (Figura 4), atribuindo diferença significativa no tratamento com 50 % de adubação, para a análise de 90 dias após plantio. Para o peso da biomassa da cultura (Figura 6), o tratamento N1 50% de adubação foi o que apresentou maior resultado, em conformidade com o atributo analisado Altura da planta. A carência de nitrogênio nutriente reflete diretamente na redução da síntese de clorofila e aminoácidos essenciais, e também na energia para a produção de carboidratos e esqueleto carbônico, o que reduz diretamente o desenvolvimento e produtividade da planta (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997). Embora não tenham sido realizadas as análises de teor de nitrogênio nas amostras, pode ser sugerido que alguns tratamentos tiveram a presença desse nutriente, refletindo no desenvolvimento da cultura.

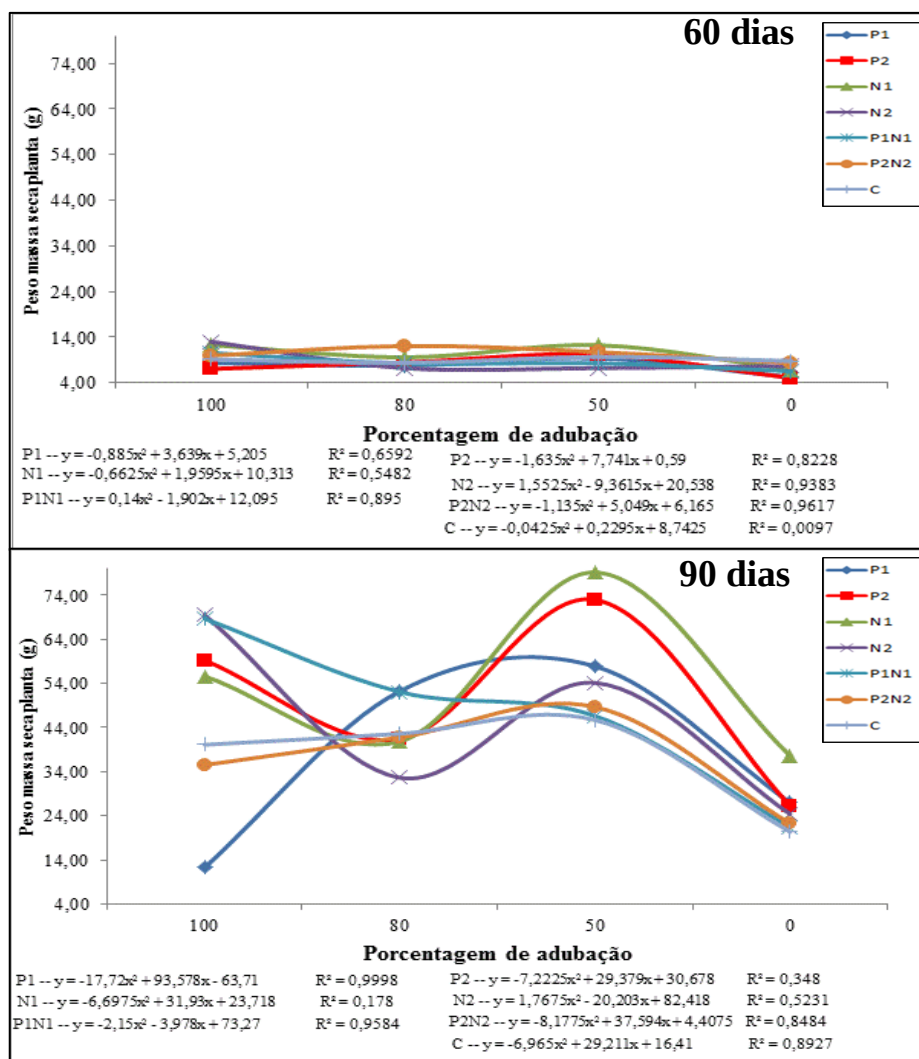


Figura 6 – Análise da biometria da cana-de-açúcar: Massa seca da planta em (g) aos 60 e 90 dias após o plantio das gemas e a inoculação de bactérias autóctones com diferentes adubações, em condição de vasos.

Pode-se pressupor que as curvas dos gráficos das figuras 5 e 6 induzem a uma inclinação mais intensa quando associada à adubação 50%. Os resultados das análises de massa seca da planta em gramas apresentou coerência com as alturas em centímetros, principalmente aos 90 dias após plantio/inoculação. Tal característica demonstra maior desenvolvimento da planta, nessas condições de adubação, tanto relacionado à altura, quanto ao perfilhamento e espessura dos colmos.

Na análise de componentes principais (PCA), a associação dos fatores 1 e 2 justificaram em mais de 52 % o comportamento dos dados. A densidade populacional dos microrganismos estudados não alterou os parâmetros avaliados de biometria da cana-de-açúcar. Esses resultados demonstram que as interações microrganismos-solo-planta são muito mais complexas e podem

ocorrer diversas variáveis num sistema de interação. Para a análise de componentes principais (Figuras 7 e 8) foi necessária uma legenda indicativa para melhor visualização dos tratamentos no gráfico gerado pelo software (Tabela 6).

Tabela 6 – Legenda numérica dos tratamentos para visualização nas análises PCA

	100%	80%	50%	0%
P1	1	8	15	22
P2	2	9	16	23
N1	3	10	17	24
N2	4	11	18	25
P1N1	5	12	19	26
P2N2	6	13	20	27
Controle	7	14	21	28

Os fatores 1 e 2 da PCA explicam 58,23% dos resultados dos comportamentos analíticos, frente às análises de 60 dias após o plantio (Figura 7). Ficou evidenciado que os parâmetros de AP, PMSP e PMSR foram correspondentes, apresentando linearidades estatísticas. Aos 60 dias a densidade populacional dos microrganismos avaliados não foi proporcional com a biometria da cultura.

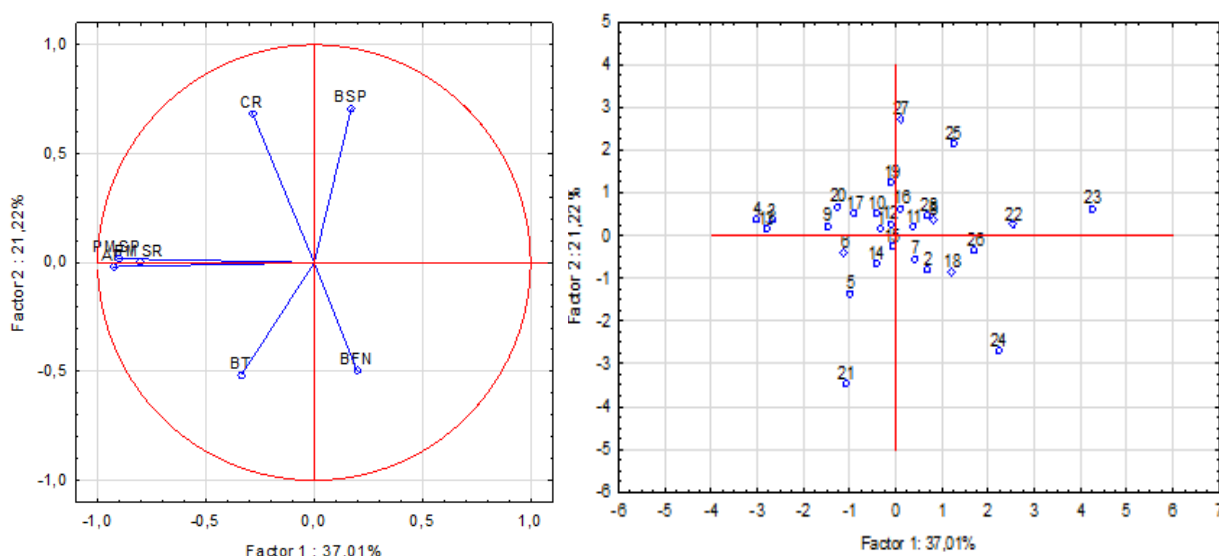


Figura 7 – Análise de Componentes Principais e correlação dos tratamentos 60 dias após o plantio

O tratamento 3(N1 100%), 4(N2 100%) e 13(P2N2 80%) foram associados às variáveis (PMSR; AP; PMSP) (Figura 7); o 21(Controle 50%) ao número de Bactérias totais; coube ao tratamento 24(N1 0%) a apresentação de maiores UFCs para fixadoras de nitrogênio; e os tratamentos 25(N2 0%) e 27(P2N2 0%) os que obtiveram grandes populações de indivíduos

solubilizadores de fosfatos. Todos os tratamentos correlacionados na análise de PCA, com exceção do tratamento 21(Controle 50%), foram adubados com uma das estirpes fixadoras de nitrogênio, vale ressaltar sobre a importância desse nutriente na cultura de cana-de-açúcar e a concordância desse resultado com Silva Filho e Vidor (2001) ao relatarem sobre o desenvolvimento de colônias solubilizadoras de fosfatos em presença de bases nitrogenadas, principalmente fontes amoniacais.

A PCA realizada com os resultados de 90 dias após o plantio também não relaciona densidade populacional da microbiota dos tratamentos com a biometria da cultura. Essa análise explica 56,16% do comportamento dos dados, pelos fatores 1 e 2.

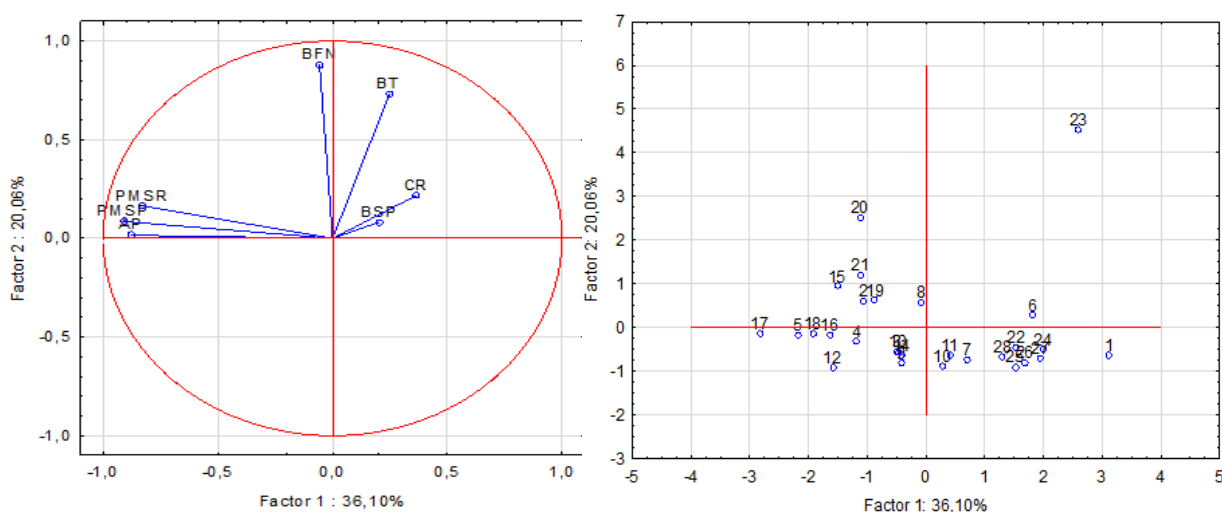


Figura 8 – Análise de Componentes Principais e correlação dos tratamentos 90 dias após o plantio

A maior taxa de crescimento populacional para bactérias totais foi associada ao tratamento 23(P2 0%); o tratamento 20(P2N2 50%) foi correlacionado com as fixadoras de N_2 atmosférico.

O maior desenvolvimento da cultura observado pelas análises de biometria aos 90 dias após plantio ficou para os tratamentos (5, 12, 15, 16, 17 e 18), estes correspondem a P1N1 100%, P1N1 80%, P150 %, P250 %, N150 % e N250 %, respectivamente.

De forma geral, nesse trabalho, todas as bactérias de forma isolada ou combinadas, proporcionaram desenvolvimento para a cultura de cana-de-açúcar. A capacidade de promoção de crescimento foi constatada quando tratamentos com redução de 50% de fertilizantes foram eficientes e responderam às expectativas do experimento. Os tratamentos combinados foram mais relacionados ao desenvolvimento de raízes, com adubações variando entre 80 e 50%.

4 CONCLUSÃO

As bactérias autóctones demonstraram ser eficientes para promoção de crescimento de mudas de cana-de-açúcar, podendo ser uma alternativa viável do ponto de vista econômico e ambiental.

Os tratamentos que tiveram inoculação microbiana, tanto de bactérias fixadoras de nitrogênio quanto solubilizadoras de fosfato, reduziram a adubação em até 50 % sem afetar o desenvolvimento das mudas, sendo os resultados de biometria da cultura superiores à adubação convencional (100 %).

REFERÊNCIAS

- BHATT, R.; OLIVEIRA, M. W.; SILVA, V. S. G. Sugarcane nutrition for food and environmental security, **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 6, p. 64431-64467, 2021. Disponível em: <http://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJD/article/view/32109/pdf>. Acesso em: 12 jan. 2022.
- BHATT, R.; P. SINGH; KASHYAP, L. Effect of irrigation and potash levels on growth, yield and quality of spring sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 92, p. 663-666, Punjab Agricultural University, Ludhiana, Punjab 143 521, India, 2022. Disponível em: <https://epubs.icar.org.in/index.php/IJAgS/article/view/124803>. Acesso em: 20 ago. 2022.
- BHATT, R. Resources Management for Sustainable Sugarcane Production. In: KUMAR, S.; MEENA, R. S.; JHARIYA, K. **Springer book**, Singapure, p. 650-685, 2020. Disponível em: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-15-6953-1_18. Acesso em: 14 jun. 2021.
- BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R. Identification of gibberelins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *A. lipoferum*. **Plant Physiology**, v. 90, p. 45-47, 1989. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1061674/pdf/plntphys00640-0055.pdf>. Acesso em: 22 fev. 2022.
- CORREA, O. S.; ROMERO, A. M.; SORIA, M. A.; DE ESTRADA, M. **Azospirillum brasilense-plant genotype interactions modify tomato response to bacterial diseases, and root and foliar microbial communities**. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) *Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina*. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, p.87-95, 2008. Disponível em: file:///C:/Users/Lab-biologia/Downloads/Azospirillum_Cell_physiology_plant_response_agronomic_and_environmental_research_in_Argentina.pdf. Acesso em: 16 abr. 2022.
- DORAN, J. W.; SARRANTONIO, M.; LIEB, M. A. Soil realth and sustainability. **Advances**

in **Agronomy**, v. 56, p. 1-54, 1996. Disponível em:

[http://vro.agriculture.vic.gov.au/dpi/vro/vrosite.nsf/0d08cd6930912d1e4a2567d2002579cb/71de891c76430335ca2576cb00031fdd/\\$FILE/ATTCZ2RM/Soil_quality_hands_land_manager.pdf#page=58](http://vro.agriculture.vic.gov.au/dpi/vro/vrosite.nsf/0d08cd6930912d1e4a2567d2002579cb/71de891c76430335ca2576cb00031fdd/$FILE/ATTCZ2RM/Soil_quality_hands_land_manager.pdf#page=58). Acesso em: 23 jun. 2022.

ELSAS, J. D. Van; TREVORS, J. T.; ROSADO, A. S.; NANNIPIERI, P. **Modern soil microbiology**. 3 ed., CRC Press, 472 p, 2019. ISBN 9780429607929 (pdf). Disponível em:

<http://www.taylorfrancis.com/books/edit/10.1201/9780429059186/modern-soil-microbiology-third-edition-jan-dirk-van-elsas-jack-trevors-alexandre-soares-rosado-paolo-nannipieri>. Acesso em 12 jan. 2022.

ESTRADA, G. A.; BALDANI, V. L. D.; OLIVEIRA, D. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. **Plant and Soil**, v. 369, p. 115-129, 2013. Disponível em: https://www.jstor.org/stable/42952605#metadata_info_tab_contents. Acesso em: 28 mar. 2022.

FERREIRA, J. P.; NUNES R. F.; SILVA R. B.; DAL BEM E. A.; GARCIA D. P.; SABUNDJIAN M. T.; SOUZA F. M. L. *Azospirillum* brasilense via foliar e doses de nitrogênio em cobertura na cultura do trigo na região de Itapeva-SP. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 11, p. 154-163, 2017. Disponível em:

<https://seer.tupa.unesp.br/index.php/BIOENG/article/view/516/328>. Acesso em: 01 abr. 2022.

GORDILLO-DELGADO, F.; MARÍN, E. & CALDERÓN, A. Effect of *Azospirillum brasilense* and *Burkholderia unamae* Bacteria on Maize Photosynthetic Activity Evaluated Using the Photoacoustic Technique. **International Journal of Thermophysics**, v. 37, p. 1-11, 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10765-016-2101-x>. Acesso em: 15 jan. 2022.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895-914, 1997. Disponível em: <http://cdnsiencepub.com/doi/abs/10.1139/m97-131?journalCode=cjm#:~:text=Historically%2C%20endophytic%20bacteria%20have%20been,against%20plant%20pathogens%20and%20parasites>. Acesso em: 03 mai. 2022.

HASHEM, A.; BABY, T.; ELSAYED, F. A. A. *Bacillus subtilis*, A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. **Journal of Biological Sciences**, v. 26, p. 1291-1297, 2019. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X19300890>. Acesso em: 28 jan. 2022.

HUERGO, L. F.; MONTEIRO, R. A.; BONATTO, A. C.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Regulação da fixação de nitrogênio em *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. *Azospirillum* sp.: Fisiologia celular, as interações de plantas e pesquisa agrônoma na Argentina. **Associação Argentina de Microbiologia**, Argentina, 2008. Disponível em:

<https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/4643/tese%20Luciano%20Huergo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 16 abr. 2022.

KANG, S.; JEONG, H. Y. Sorption of a nonionic surfactant Tween 80 by minerals and soils. **Journal of Hazardous Materials**, v. 284, p. 143-150, 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304389414009108>. Acesso em: 29 jun. 2022.

LAVIE, S.; STOTZKY, G. Adhesion of the Clay Minerals Montmorillonite, Kaolinite, and Attapulgite Reduces Respiration of *Histoplasma capsulatum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, p. 61-73, 1986. Disponível em: <http://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/aem.51.1.65-73.1986>. Acesso em: 25 fev. 2022.

LAZZARETI, E.; BETTIOL, W. Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado a base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 54, p. 89-96, 1997. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/153331/1/1997AP036-Bettiol-Tra>tamento-3372.PDF. Acesso em: 09 jul. 2022.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional de plantas: princípios e aplicações**. 2. Ed. Piracicaba: Potafos, 1997.

MATOSO, E. S.; AVANCINI, A. R.; MACIEL, K. F. K.; ALVES, M. C.; SIMON, E. D. T.; SILVA, M. T. Influência do uso de um mix de bactérias diazotróficas na biometria e no conteúdo de clorofila de plantas de cana-de-açúcar. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, p. 7261-7274, 2020. Disponível em: <http://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/6878/6065>. Acesso em: 05 mai. 2022.

OLIVEIRA, M. A.; ZUCARELI, C.; FERREIRA, A. S.; DOMINGUES, A. R.; SPOLAOR, L. T. E.; NEVES, C. S. V. J. Adubação fosfatada e rizobactérias no desempenho do milho. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, p. 18-25, 2015. Disponível em: <file:///C:/Users/LabIV/Downloads/16864-Texto%20do%20manuscrito-55237-1-10-20190121.pdf>. Acesso em: 06 mar. 2022.

OLIVEIRA, M. W.; MACÊDO, G. A. R.; MARTINS, J. A.; SILVA, V. S.; OLIVEIRA, A. B. Mineral Nutrition and Fertilization of Sugarcane. In: Alexandre Bosco de Oliveira. (Org.). Sugarcane - Technology and Research. 1 ed. Londres: INTECH - **Open Science**, v. 1, p. 169-191, 2018.

PEDULA, R. O.; SCHULTZ, N.; MONTEIRO, R. C.; PEREIRA, W.; ARAÚJO, A. P.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Growth analysis of sugarcane inoculated with diazotrophic bacteria and nitrogen fertilization. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, p. 2786-2795, 2016. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20163272441>. Acesso em: 26 mar. 2022.

PEREIRA, W.; LEITE, J. M.; HIPÓLITO, G. S.; SANTOS, C. L. R.; REIS, V. M. Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, p. 363-370, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/rca/a/pbLWzvMLbDgy7gQ5yTqFmVQ/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 09 jan. 2022.

PERRIG, D.; BOIERO, L.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; CASSÁN, F.; LUNA, V. Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 1143-1150, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17345081/>. Acesso em: 11 mai. 2022.

RAMAEKERS, L.; REMANS, R.; RAO, I. M.; BLAIR, M. W.; VANDERLEYDEN, J. Strategies for improving phosphorus acquisition efficiency of crop plants. **Fields Crop Research**, v. 117, p. 169-176, 2010. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378429010000596#:~:text=Therefore%2C%20the%20main%20strategy%20for,Lynch%20and%20Ho%2C%202005>). Acesso em: 22 jun. 2022.

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum spp.* **Environmental Microbiology Group**, v. 91, p. 552-555, 2004. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00114-004-0566-0>. Acesso em: 12 jan. 2022.

RUFTY, T. W.; MACKOWN, C. T.; ISRAEL, D. W. Phosphorus stress effects on assimilation of nitrate. **Plant Physiology**, v. 94, p. 328-333, 1990. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1077228/>. Acesso em: 24 fev. 2022.

SHARMA, B. S.; SAYYED, R. Z.; TRIVEDI, M. H.; GOBI, T. A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils, **Springer Open**, v. 2, n. 587, 2013. Disponível em: <http://link.springer.com/content/pdf/10.1186/2193-1801-2-587.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2022.

SHAVIV, A. Advancer in controlled-release fertilizer. **Advances in Agronomy**, v.71, p. 1-49, 2001. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/222697055_Advances_in_controlled-release_fertilizers. Acesso em: 29 abr. 2022.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 12, p. 1495-1508, dez. 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/pab/a/VQ4pVFMWrfJWZwG8x6sbRYP/?lang=pt>. Acesso em: 12 fev. 2022.

SILVA, V. N. **Interação de microrganismos na solubilização de fósforo e potássio de rochas para produção de biofertilizantes**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, RN, 2013. Disponível em: http://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/12652/1/InteracaoMicroorganismosSolubilizacao_Silva_2013.pdf. Acesso em: 26 jun. 2022.

STRZELCZYK, E.; KAMPER, M.; LI, C. Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. **Microbiological Research**, v. 149, p. 55-60, 1994. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0944501311801369>. Acesso em: 25 jun. 2022.

TAULÉ, C.; MAREQUE, C.; BARLOCCO, C.; HACKEMBRUCH, F.; REIS, V. M.; SICARDI, M.; BATTISTONI, F. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1, p. 35-49, 2012. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11104-011-1023-4>. Acesso em: 03 jul. 2022.

TIEN, T. M.; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1016-1024, 1979. Disponível em: <http://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.37.5.1016-1024.1979>. Acesso em: 06 jul. 2022.

VITTI, A. C.; TRIVELIN, P. C. O.; GAVA, G. J. C.; PENATTI, C. P.; BOLOGNA, I. R.; FARONI, C. E.; FRANCO, H. C. J. Produtividade da cana-de-açúcar relacionada ao nitrogênio residual da adubação e do sistema radicular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 2, p. 249-256, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/pab/a/Gbnqw7pVYWTw48xLhBT8Pmz/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 14 mai. 2022.

APÊNDICES

SUMÁRIO

	Página
1 Ap - Análise da biometria da cana-de-açúcar: Comprimento da raiz em (cm) aos 60 e 90 dias após o plantio das gemas e a inoculação de bactérias autóctones com diferentes adubações, em condição de vasos.....	108
2 Ap - Análise da biometria da cana-de-açúcar: Massa seca da raiz em (g) aos 60 e 90 dias após o plantio das gemas e a inoculação de bactérias autóctones com diferentes adubações, em condição de vasos.....	109
3 Ap - Análise da biometria da cana-de-açúcar: Altura da planta em (cm) aos 60 e 90 dias após o plantio das gemas e a inoculação de bactérias autóctones com diferentes adubações, em condição de vasos.....	110
4 Ap - Análise da biometria da cana-de-açúcar: Massa seca da planta em (g) aos 60 e 90 dias após o plantio das gemas e a inoculação de bactérias autóctones com diferentes adubações, em condição de vasos.....	111

1 Ap - Análise da biometria da cana-de-açúcar: Comprimento da raiz em (cm) aos 60 e 90 dias após o plantio das gemas e a inoculação de bactérias autóctones com diferentes adubações, em condição de vasos

T	Comprimento da raiz (cm)			
	100 %	80 %	50 %	0 %
Tempo 60 dias				
P1	50,00±6,78 abc	45,00 ± 8,60 abc	46,25 ± 5,32 abc	39,50 ± 7,23 bc
P2	43,50±3,87 abc	49,50 ± 8,81 abc	44,00 ± 8,21 abc	35,00 ± 8,04 c
N1	51,50±6,45 abc	48,25 ± 3,86 abc	38,33 ± 3,21 bc	39,75 ± 3,10 bc
N2	43,00 ± 5,10 abc	46,25 ± 7,89 abc	35,50 ± 10,34 c	50,75 ± 2,22 abc
P1N1	39,50 ± 7,85 bc	48,25 ± 4,35 abc	62,50 ± 5,45 a	45,00 ± 4,40 abc
P2N2	41,00 ± 1,41 abc	50,50 ± 8,23 abc	50,75 ± 5,91 abc	61,00 ± 10,52 a
Controle	36,50 ± 22,90 c	41,0 ± 6,98 abc	33,00 ± 5,48 c	49,25 ± 13,60 abc
Valor P ¹	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Tempo 90 dias				
P1	48,25 ± 13,33 a	46,75 ± 6,40 a	40,00 ± 1,30 a	50,25 ± 9,54 a
P2	38,50 ± 14,36 a	37,50 ± 6,61 a	48,25 ± 7,41 a	44,25 ± 13,30 a
N1	42,75 ± 4,43 a	42,75 ± 4,79 a	42,33 ± 4,51 a	43,00 ± 7,81 a
N2	45,00 ± 7,53 a	40,00 ± 4,40 a	41,00 ± 8,19 a	38,50 ± 5,07 a
P1N1	39,75 ± 5,25 a	36,50 ± 7,42 a	48,50 ± 4,12 a	46,25 ± 2,22 a
P2N2	53,50 ± 5,97 a	41,50 ± 3,00 a	48,00 ± 6,24 a	48,75 ± 14,86 a
Controle	37,25 ± 10,24 a	39,25 ± 6,40 a	39,25 ± 10,53 a	38,75 ± 9,11 a
Valor P ¹	0,239	0,239	0,239	0,239

¹Valor P referente ao teste de Análise de Variância (ANOVA) a P<0,05. ²Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas pelos testes de comparação múltipla post-hoc de Tukey a P<0,05.

2 Ap - Análise da biometria da cana-de-açúcar: Massa seca da raiz em (g) aos 60 e 90 dias após o plantio das gemas e a inoculação de bactérias autóctones com diferentes adubações, em condição de vasos

T	Massa seca raiz (g)			
	100 %	80 %	50 %	0 %
Tempo 60 dias				
P1	5,22 ± 1,23 abc	5,26 ± 1,36 abc	4,68 ± 1,14 abc	4,42 ± 1,55 abc
P2	4,78 ± 0,79 abc	6,23 ± 0,60 abc	4,76 ± 1,16 abc	2,88 ± 0,52 c
N1	6,29 ± 1,18 abc	4,80 ± 0,93 abc	3,46 ± 6,45 abc	4,37 ± 0,53 abc
N2	6,96 ± 1,88 ab	5,66 ± 0,64 abc	4,90 ± 2,52 abc	3,59 ± 0,57 bc
P1N1	5,79 ± 0,93 abc	5,72 ± 1,03 abc	5,29 ± 1,69 abc	3,71 ± 0,50 bc
P2N2	5,54 ± 1,93 abc	7,56 ± 1,36 a	4,60 ± 0,47 abc	5,42 ± 0,93 abc
Controle	5,56 ± 2,93 abc	6,57 ± 2,11 abc	4,53 ± 0,95 abc	3,88 ± 0,99 abc
Valor P ¹	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Tempo 90 dias				
P1	6,33 ± 2,07 fg	10,97 ± 1,99 bcdefg	10,91 ± 0,73 bcdefg	7,51 ± 1,23 defg
P2	17,47 ± 2,14 a	13,34 ± 0,84 abcd	12,30 ± 0,79 abcdef	5,66 ± 1,63 g
N1	12,18 ± 3,94 abcdef	7,36 ± 0,57 defg	13,94 ± 1,89 abcd	6,71 ± 1,30 fg
N2	12,80 ± 1,96 abcde	7,89 ± 0,72 defg	13,20 ± 0,93 abcde	7,56 ± 0,95 defg
P1N1	16,33 ± 3,31 ab	12,57 ± 2,27 abcde	17,37 ± 2,42 a	6,76 ± 0,95 efg
P2N2	7,90 ± 1,40 defg	11,53 ± 3,57 bcdefg	16,98 ± 0,73 ab	9,02 ± 0,79 cdefg
Controle	8,52 ± 1,16 defg	11,90 ± 3,05 abcdef	15,04 ± 0,61 abc	8,02 ± 2,50 defg
Valor P ¹	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005

¹Valor P referente ao teste de Análise de Variância (ANOVA) a P<0,05. ²Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas pelos testes de comparação múltipla post-hoc de Tukey a P<0,05.

3 Ap - Análise da biometria da cana-de-açúcar: Altura da planta em (cm) aos 60 e 90 dias após o plantio das gemas e a inoculação de bactérias autóctones com diferentes adubações, em condição de vasos

T	Altura da planta (cm)			
	100 %	80 %	50 %	0 %
Tempo 60 dias				
P1	121,50±9,81 ab	108,25±16,42 ab	117,25±8,38 ab	96,30±23,80 ab
P2	111,75±12,07 ab	136,30±20,70 ab	112,30±20,90 ab	80,80±27,60 b
N1	135,25±7,97 ab	124,00±7,79 ab	127,30±21,70 ab	103,30±23,30 ab
N2	140,30±25,60 a	112,50±14,89 ab	106,80±25,30 ab	116,50±21,90 ab
P1N1	127,50±16,58 ab	114,00±9,38 ab	108,00±6,83 ab	107,25±9,22 ab
P2N2	130,75±14,10 ab	128,00±14,49 ab	131,75±6,60 ab	111,00±10,98 ab
Controle	105,50±48,50 ab	114,00±12,75 ab	123,00±16,02 ab	112,80 ± 29,00 ab
Valor P ¹	0,014	0,014	0,014	0,014
Tempo 90 dias				
P1	129,50±30,10 cd	151,00±11,58abcd	180,00±12,73 abc	155,00±20,80 abcd
P2	153,75±18,55abcd	150,25±8,81abcd	179,25±3,77 abc	137,30±25,40 cd
N1	157,80±21,00 abcd	164,00±20,1abcd	198,33±11,50 a	121,60±9,53d
N2	167,50±27,30 abcd	163,75±8,81abcd	195,67±7,57 ab	139,50±9,18 bcd
P1N1	172,00±26,80 abc	178,00±17,34 abc	157,0±18,0abcd	148,00±12,78abcd
P2N2	148,00±25,90 abcd	166,50±19,89abcd	172,67±11,68 abc	131,50±28,60 cd
Controle	153,75±10,05abcd	160,00±33,6abcd	170,5±19,26abcd	144,25±15,88abcd
Valor P ¹	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005

¹Valor P referente ao teste de Análise de Variância (ANOVA) a P<0,05. ²Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas pelos testes de comparação múltipla post-hoc de Tukey a P<0,05.

4 Ap - Análise da biometria da cana-de-açúcar: Massa seca da planta em (g) aos 60 e 90 dias após o plantio das gemas e a inoculação de bactérias autóctones com diferentes adubações, em condição de vasos

T	Massa seca planta			
	100%	80%	50%	0%
	Tempo 60 dias			
P1	8,36 ± 1,74 a	7,74 ± 1,21 a	9,36 ± 0,76 a	5,20 ± 1,49 a
P2	7,05 ± 2,31 a	8,47 ± 1,59 a	10,16 ± 4,90 a	5,04 ± 2,38 a
N1	12,28 ± 1,89 a	9,57 ± 2,52 a	12,24 ± 4,65 a	6,88 ± 2,56 a
N2	13,00 ± 5,95 a	7,21 ± 2,19 a	7,24 ± 3,12 a	7,66 ± 3,36 a
P1N1	10,54 ± 2,41 a	8,23 ± 1,84 a	8,27 ± 2,04 a	6,52 ± 0,39 a
P2N2	9,96 ± 2,79 a	12,08 ± 3,66 a	10,74 ± 2,07 a	8,32 ± 1,67 a
Controle	9,14 ± 5,64 a	8,40 ± 3,33 a	9,68 ± 3,79 a	8,77 ± 4,78 a
Valor P ¹	0,029	0,029	0,029	0,029
T	Tempo 90 dias			
	100%	80%	50%	0%
P1	12,26 ± 3,00 h	52,23 ± 10,45 abcdef	57,88 ± 2,16 abcdef	26,97 ± 1,44 fgh
P2	59,22 ± 9,90 abcd	41,39 ± 3,91 defg	72,97 ± 16,77 ab	26,25 ± 4,88 fgh
N1	55,6 ± 22,40 abcde	40,84 ± 3,41 defg	79,18 ± 8,76 a	37,63 ± 5,89 defg
N2	69,46 ± 17,48 abc	32,65 ± 5,80 efgh	54,15 ± 3,18 abcdef	24,41 ± 3,25 fgh
P1N1	68,69 ± 13,05 abc	52,07 ± 10,44 abcdef	46,63 ± 5,27 cdefg	21,41 ± 2,93 fgh
P2N2	35,52 ± 8,64 defgh	41,80 ± 10,61 defg	48,68 ± 10,33 bcdefg	22,25 ± 5,58 fgh
Controle	40,11 ± 3,17 defg	42,61 ± 9,55 defg	45,72 ± 10,42 defg	20,36 ± 6,69 fgh
Valor P ¹	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005

¹Valor P referente ao teste de Análise de Variância (ANOVA) a P<0,05. ²Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas pelos testes de comparação múltipla post-hoc de Tukey a P<0,05.