

Universidade Brasil
Campus de Fernandópolis

RITA DE CÁSSIA BONASSI

APLICAÇÃO DE *Nitrospirillum amazonense* EM CANA-PLANTA VIA
ADUBAÇÃO BIOLÓGICA MICROGEO®

Nitrospirillum amazonense APPLICATION IN SUGARCANE PLANT THROUGH
MICROGEO® BIOLOGICAL FERTILIZER

Fernandópolis, SP

2021

Rita de Cássia Bonassi

APLICAÇÃO DE *Nitrospirillum amazonense* EM CANA PLANTA VIA ADUBAÇÃO
BIOLÓGICA MICROGEO®

Orientador: Prof. Dr. Acacio Aparecido Navarrete
Co-orientadora: Profa. Dra. Gisele Herbst Vazquez

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Brasil, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Fernandópolis, SP
2021

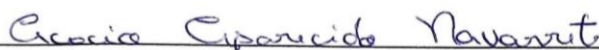


TERMO DE APROVAÇÃO

RITA DE CÁSSIA BONASSI

“Aplicação de *Nitrospirillum amazonense* em cana-planta via adubação biológica Microgeo[®]”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre** no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:



Prof(a). Dr(a) Acacio Aparecido Navarrete (presidente-orientador)



Prof(a). Dr(a). Luiz Sergio Vanzela (Universidade Brasil)



Prof(a). Dr(a). Elisângela de Souza Loureiro (UFMS)

Fernandópolis, 04 de fevereiro de 2021
Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a) Acacio Aparecido Navarrete



Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: "Aplicação de *Nitrospirillum amazonense* em cana-planta via adubação biológica Microgeo®"

Autor(es):

Discente: Rita de Cássia Bonassi.

Assinatura: Rita de Cássia Bonassi

Orientador: Acacio Aparecido Navarrete

Assinatura: Acacio Aparecido Navarrete

Co-Orientadora: Gisele Herbst Vazquez

Assinatura: Gisele Herbst Vazquez

Data: 04/fevereiro/2021

Dedicatória

Aos meus pais, João e Maria Sueli, por sempre acreditarem em mim e por terem me apoiado em todos os momentos em prol das realizações e da felicidade de seus filhos.

A Deus pela dádiva da vida e por me permitir realizar tantos sonhos nesta existência.

Aos Professores Acacio e Gisele pela orientação, competência, profissionalismo e dedicação tão importantes. Obrigada por acreditarem em mim e por tantos incentivos. Tenho certeza que não chegaria neste ponto sem o apoio de vocês.

AGRADECIMENTOS

Na condição de autora deste estudo, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) – Proc. 23038.006927/2014-35 / Prêmio 116/2017 pelo apoio financeiro; e à empresa Microgeo® biotecnologia agrícola - Microbiol Indústria e Comércio Ltda. por conceder o Microgeo® para compostagem líquida continuada. Agradeço, também, ao corpo docente do Programa de Pós Graduação - Universidade Brasil, Campus de Fernandópolis, pela partilha de conhecimentos técnico-científicos e à Dra. Miriam Gonçalves de Chaves pelo apoio na etapa de crescimento da bactéria *Nitrospirillum amazonense* no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), da Universidade de São Paulo (USP), Campus de Piracicaba. Minha gratidão aos técnicos Matheus Henrique Doria Siqueira e Mateus Leonardo Welika dos Santos e à Profa. Dra. Andréia Cristiane Sanches pelo suporte técnico e científico durante a execução do experimento em casa-de-vegetação na Universidade Brasil, Campus de Fernandópolis.

APLICAÇÃO DE *Nitrospirillum amazonense* EM CANA-PLANTA VIA ADUBAÇÃO BIOLÓGICA MICROGEO®

RESUMO

Os efeitos da aplicação do adubo biológico Microgeo® acrescido da bactéria *Nitrospirillum amazonense* foram avaliados em cana-de-açúcar a partir dos seguintes tratamentos estabelecidos em casa-de-vegetação em um experimento inteiramente casualizado: i) adubo biológico produzido com Microgeo® acrescido de *N. amazonense*; ii) adubo biológico produzido com Microgeo® sem *N. amazonense*; iii) inoculação de *N. amazonense*; e iv) aplicação de fertilizante mineral. O adubo biológico foi aplicado no sulco de plantio (200 Lha^{-1}) e na fase de pós-emergência (100 Lha^{-1}). Duas doses (100 e 200 mLha^{-1}) de *N. amazonense* (2×10^8 células viáveis mL^{-1}) foram quantificadas em cada tratamento contendo esta bactéria. Foram avaliados os seguintes parâmetros: número de perfilhos, altura das plantas, diâmetro dos colmos, número de colmos, comprimento da folha +3, largura da folha +3, número de folhas verdes, área foliar, massa verde de folha, massa seca de folha. Logo após a realização das determinações biométricas, procedeu-se a retirada de amostras de solo e de foliar para a análise química. Constatou-se nos fatores químicos do solo o aumento do teor de enxofre nas folhas de cana que cresceram nos vasos que receberam *N. amazonense* (100 mLha^{-1}) combinado com adubo biológico. Observou-se aumento na largura da folha +3 e número de folhas verdes no tratamento com o adubo biológico Microgeo® e *N. amazonense*, demonstrando efeito positivo dessa combinação, mesmo considerando apenas o ciclo parcial da cultura.

PALAVRAS-CHAVE: bactéria promotora de crescimento; microbiota do solo; sustentabilidade agroambiental.

***Nitrospirillum amazonense* APPLICATION IN SUGARCANE PLANT THROUGH MICROGEO® BIOLOGICAL FERTILIZER**

ABSTRACT

The effects of biological fertilizer prepared using Microgeo® (Microgeo® technology) and *N. amazonense* strain application were evaluated on sugarcane plant based on the following treatments established in a greenhouse entirely randomized experiment: i) biological fertilizer prepared with Microgeo® plus *N. amazonense*; ii) biological fertilizer prepared with Microgeo® without *N. amazonense*; iii) inoculation of *N. amazonense*; iv) mineral fertilizer. The biological fertilizer was applied in the planting furrow (200 Lha⁻¹) and in the post-emergence phase (100 Lha⁻¹). Two doses (100 and 200 mLha⁻¹) of *N. amazonense* (2×10⁸ viable cells mL⁻¹) were quantified in each treatment containing this bacterium. The following parameters were evaluated. Number of tillers, plant height, stem diameter, number of stems, leaf length +3, leaf width +3, number of green leaves, leaf area, green leaf mass, dry leaf mass. Immediately after carrying out the biometric measurements, soil and leaf samples were taken for chemical analysis. There was an increase in the sulfur content of the sugarcane leaves that grew in the pots that received *N. amazonense* (100 mLha⁻¹) combined with biological fertilizer. An increase in leaf width +3 and number of green leaves was observed in the treatment with Microgeo® technology and *N. amazonense*, demonstrating a positive effect of this combination even considering only the partial cycle of the culture.

KEYWORDS: growth-promoting bacteria, soil microbiota, agro-environmental sustainability

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	Revisão de literatura.....	15
3	Biofertilizantes	15
4	Tecnologia Microgeo®	16
5	Fixação biológica de nitrogênio	17
6	OBJETIVO GERAL	18
7	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
8	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
9	Experimento em casa-de-vegetação	21
10	Composição morfológica – avaliação destrutiva (biometria) ... Erro! Indicador não definido.	
11	Análises químicas de amostras de solo e foliar	29
12	Análises estatísticas.....	29
13	Resultados e discussão	30
14	Conclusão	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.....	31
Tabela 2.....	33
Tabela 3.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	18
Figura 2	18
Figura 3	19
Figura 4	20
Figura 5	21
Figura 6	Erro! Indicador não definido. 2
Figura 7	Erro! Indicador não definido.
Figura 8	23
Figura 9	24
Figura 10	Erro! Indicador não definido.

1 INTRODUÇÃO

O cultivo da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) inclui cerca de 10 milhões de hectares no Brasil, com um rendimento médio de 70 toneladas por hectare (Conab, 2021). A cana-de-açúcar é uma gramínea semi-perene pertencente à família *Poaceae* e ao gênero *Saccharum* e é altamente adaptada ao clima tropical (MENEZES et al., 2012), sendo uma das culturas com maior importância econômica no Brasil, utilizada principalmente para produzir açúcar e etanol.

O etanol é um combustível renovável, sendo o biocombustível mais consumido no Brasil e considerado uma melhor alternativa aos combustíveis derivados de petróleo, como gasolina e diesel. Muitos estudos apontam redução significativa no lançamento de poluentes na atmosfera com o seu uso (AGARWAL, 2007; CHEN et al., 2011; GHAZIKHANI et al., 2013; YAO et al., 2013; BILLAH et al., 2014; IODICE; SENATORE, 2014; NAJAFI et al., 2015).

Um dos principais objetivos do uso dos biocombustíveis é a troca de combustíveis fósseis por recursos renováveis e a contenção das emissões de gases de efeito estufa. A queima de combustíveis fósseis representa, aproximadamente, 82% das emissões dos gases causadores do efeito estufa (Lal, 2004). Portanto, seja pela questão ambiental global, seja pela importância em reduzir a dependência externa de energia, o etanol de cana-de-açúcar, que já aponta resultados ambientais muito bons quando comparado a outras opções de biocombustíveis, representa uma alternativa viável na substituição de combustíveis fósseis.

Segundo Casa Grande (1996), a cana-de-açúcar é uma planta de metabolismo C4. Ou seja, ela é considerada altamente eficiente na conversão de energia solar em energia química. Os processos de transformação de energia na cana-de-açúcar são efetivamente mais afetados pelos seguintes parâmetros ambientais: luz (intensidade e quantidade), concentração de CO₂, disponibilidade de água, nutrientes e calor. Entretanto, o uso de água no processo possui implicações relevantes, pois, para fixar por meio da fotossíntese uma mesma quantidade de CO₂ que uma planta C3, a planta C4, por acumular esse gás nas referidas células, pode manter a abertura estomática menor, o que,

necessariamente, implica em menores perdas de água. Com isso, pode-se dizer que as plantas C4 possuem maior eficiência de uso de água. Essas condições propiciam a maior fixação de carbono pela planta refletida pelo aumento da produção de biomassa total (raízes, colmo e folhas) e, portanto, na produtividade. Mudanças climáticas propiciam alteração no balanço de carbono da cultura, retirando mais gás carbônico da atmosfera, fixando-o em maior proporção. A cana-de-açúcar tem capacidade para absorção de carbono e maior produtividade em condições de alta concentração de CO₂.

Os micro-organismos que usam nitrogênio na forma de gás, como substrato para a enzima nitrogenase, são conhecidos como fixadores de nitrogênio ou diazotróficos. Esses micro-organismos pertencem ao Domínio Bactéria e, dentre estes, vários gêneros foram descritos durante mais de 30 anos de pesquisa.

De acordo com Scudeletti (2016), há evidências de que o cultivo da cana-de-açúcar seja mais eficiente quando há interação com bactérias diazotróficas, principalmente as do gênero *Azospirillum* (*Nitrospirillum amazonense*, anteriormente *Azospirillum amazonense*). *N. amazonense* pertencentes ao Filo Proteobacteria, Classe alfa-proteobacteria que, além da fixação de nitrogênio atmosférico, podem produzir fitormônios que promovem, na maioria dos casos, efeitos positivos no crescimento vegetal e no rendimento. Além de bactérias do gênero *Nitrospirillum*, espécies pertencentes a três outros gêneros foram selecionadas pela EMBRAPA Agrobiologia para formulação de inoculante para cana-de-açúcar, reduzindo o uso de fertilizantes nitrogenados, todas isoladas de tecidos de diferentes variedades de cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al., 2002, 2006, REIS et al., 2009).

A utilização de bactérias na agricultura pode ser uma alternativa para diminuir o uso de fertilizantes agrícolas e gerar aumento na produtividade (HUNGRIA et al., 2010). A facilitação da aplicação de inoculantes microbianos por parte dos agricultores pode aumentar o uso dos mesmos, principalmente em grandes extensões de áreas cultivadas, como é o caso da cultura canavieira no Brasil.

A inoculação à base de bactérias diazotróficas em áreas de cultivo de cana-de-açúcar tem poucos estudos combinados com tratamentos culturais, tais como

aplicações de defensivos e outras práticas de manejo adotadas com a cultura canavieira. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito no solo e na cana-planta da aplicação do adubo biológico Microgeo® acrescido da bactéria *N. amazonense* no solo durante o plantio e via foliar na fase de pós-emergência das plantas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biofertilizantes

Os biofertilizantes sólidos e líquidos são todos aqueles materiais de origem vegetal ou animal, alguns considerados resíduos ou rejeitos que podem ser utilizados para adubar os solos e assim nutrir as culturas. Eles devem ter alto valor agregado e baixo custo de aquisição e produção. Podem ser produzidos a partir de matérias primas próprias ou adquiridos de terceiros e se diferenciam dos fertilizantes convencionais pela sua ação e atuação sobre o solo, as plantas e o ambiente, onde normalmente têm efeitos positivos, produzindo menor impacto comparado aos convencionais (NUNES, 2016).

Os biofertilizantes são indicados para potencializar a fertilidade e promover a elevação da atividade biológica do solo. Dentre os muitos produtos que podem ser indicados como adubo orgânico, destacam-se os esterco, camas de aviário, palhas, restos vegetais e compostos (KIEHL, 1985).

Segundo Magro (1994), biofertilizantes são compostos bioativos, resíduo final da fermentação de compostos orgânicos, contendo células vivas ou latentes de micro-organismos (bactérias, leveduras, algas, protozoários e fungos filamentosos) e por seus metabólitos, além de quelatos organominerais. São produzidos em biodigestores por meio de fermentação aeróbica e/ou anaeróbica de material orgânico. Esse composto é rico em enzimas, antibióticos, vitaminas, toxinas, fenóis, ésteres e ácidos de ação hormonal.

O adubo biológico tem como objetivo restabelecer o microbioma do solo, ou seja, restaurar o conjunto de micro-organismos que vivem e interagem com as plantas e solo. Ao restaurar a biodiversidade microbiana do solo e estimular

seu microbioma, promove benefícios que atuam no condicionamento das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, seja para agricultura, pecuária ou reflorestamento (MICROGEO, 2021).

2.2 Tecnologia Microgeo®

O Microgeo® é um componente balanceado que, junto com esterco bovino ou conteúdo ruminal e água, é utilizado para a produção do Adubo Biológico por meio do Processo de Compostagem Líquida Contínua (CLC®) em Biofábricas CLC® instaladas diretamente nas propriedades agrícolas. Esta tecnologia é recomendada com a finalidade de restabelecer o microbioma do solo, sendo constituída por uma ampla biodiversidade microbiana autóctone da localidade de aplicação do produto, a qual é proveniente de esterco bovino ou conteúdo ruminal (MICROGEO, 2021).

De fácil manuseio, pode ser aplicado em pulverização, fertirrigação e hidroponia, sob qualquer temperatura, luminosidade e umidade, aliado com defensivos químicos, fertilizantes biológicos, insumos foliares e vinhaça.

Destaca-se como benefícios da adubação biológica: a reestruturação do solo, a redução da compactação e da erosão, o aumento da infiltração e a retenção de água no solo, a melhora no estande de plantio e enraizamento, a potencialização da eficiência dos fertilizantes, o aumento da produtividade e da lucratividade (MICROGEO, 2021).

A Biofábrica CLC® são tanques destinados à produção contínua do adubo biológico com Microgeo®, é de fácil instalação e operação em área que receba luz solar direta e próxima de água não clorada. Deve ser dimensionada para atender à dose de aplicação do adubo biológico, além de nutrientes e metabólitos. A tecnologia Microgeo® é direcionada para agricultura, pecuária e reflorestamento. O Microgeo® é um produto que contém preparados biodinâmicos elaborados a partir de plantas medicinais (milfolhas, camomila, urtiga, casca-de-carvalho, dente-de-leão e valeriana) que organizam os processos de fermentação do composto e dos biofertilizantes e é recomendado com a finalidade de nutrir as plantas cultivadas (D'ANDREA, 2003).

2.3 Fixação Biológica do Nitrogênio

O nitrogênio é fundamental para o desenvolvimento das plantas e essencial na constituição dos ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas, expansão da parte aérea e sistema radicular das plantas e ganho da matéria seca. Esse elemento é encontrado com maior quantidade no ar atmosférico e ocupa quase 80% do mesmo. Na forma de N_2 , que representa 99,96%, o mesmo é indisponível aos eucariontes, portanto, não pode ser utilizado pelas plantas. Apenas 0,04% encontra-se presente na forma orgânica ou inorgânica (ROSWALL, 1979).

Rees et al. (2005) afirmam que a fixação de nitrogênio representa uma das facetas do ciclo do nitrogênio que incide a interconversão global do nitrogênio entre diferentes estados de oxidação. Posteriormente ao o ciclo metabólico através da biosfera, este mesmo nitrogênio retorna ao reservatório atmosférico por meio do processo de desnitrificação. Este ciclo necessita de um contínuo reabastecimento de nitrogênio 'fixado' ou convertido nas formas solúveis a partir, principalmente, dos micro-organismos fixadores.

O gás nitrogênio (N_2) é pouco reativo, somente algumas espécies de micro-organismos procarióticos possuem o complexo enzimático chamado nitrogenase necessário para convertê-lo em amônia, que é sucessivamente assimilada em aminoácidos e proteínas. Essa reação é chamada de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (NEVES e RUMJANEK, 1998), a qual se compõe na principal via de entrada, fornecendo nitrogênio aos sistemas vivos. A participação da FBN no ciclo biogeoquímico do nitrogênio é especialmente importante visto que a ação das bactérias diazotróficas é responsável por cerca de 60% do nitrogênio anualmente fixado na Terra (KIM & REES, 1994).

Entre as bactérias associadas à cana-de-açúcar destacam-se as espécies *Gluconacetobacter diazotrophicus* (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988), *Azoarcus* spp. (REINHOLD-HUREK et al., 1993), *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI et al., 1986), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (GILLIS et al., 1991; BALDANI et al., 1996) e *Burkholderia* spp. (YABUUCHI et al., 1992; BALDANI et al., 1997).

Espécies *Nitrospirillum amazonense*, anteriormente pertencente ao gênero *Azospirillum*, classificado como *Azospirillum amazonense* (LIN et al.,

2014), é uma bactéria que pode fixar nitrogênio e, de muitas outras maneiras, realizar o crescimento das plantas que coloniza. Em outros estudos, promoção do crescimento, independentemente da contribuição para suprimento de nitrogênio, foi responsável pelo aumento de massa e teor de açúcar das variedades de cana inoculado com uma mistura de cinco cepas bacterianas, incluindo *N. amazonense* (SCHULTZ et al., 2014, 2016). Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o crescimento, o desenvolvimento e o rendimento de cana depois de aplicação da bactéria diazotrófica *N. amazonense*.

3 OBJETIVO GERAL

Este estudo foi delineado com o objetivo de avaliar o efeito no solo e na cana-planta da aplicação da tecnologia Microgeo[®], acrescido da estirpe de *N. amazonense* no solo no momento do plantio e via foliar na fase de pós-emergência das plantas.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Analisar fatores químicos do solo cultivado com cana-de-açúcar em tratamentos experimentais contendo adubo biológico Microgeo[®] e *N. amazonense*;
- ii) Avaliar características morfológicas e fenológicas de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em solo contendo adubo biológico Microgeo[®] e *N. amazonense*;
- iii) Avaliar características químicas foliares de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em solo contendo adubo biológico Microgeo[®] e *N. amazonense*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Crescimento da Estirpe de *N. amazonense* em Laboratório

A estirpe BR11145 de *N. amazonense*, proveniente da coleção de cultura do Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (CRB-JD) da EMBRAPA Agrobiologia, foi inicialmente crescida em meio LGI (Figura 1). O meio LGI foi preparado de acordo com o documento EMBRAPA nº 110 Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia (Döbereiner, 1999). Todo material utilizado no cultivo e preparo da curva de crescimento foi previamente esterilizado por meio de autoclavagem.



Figura 1– Estirpe de *Nitrospirillum amazonense* fornecida pelo Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (CRB-JD) da EMBRAPA-Agrobiologia

A replicação da bactéria *N. amazonense* foi realizada no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo (USP), *Campus* de Piracicaba. As placas foram incubadas em câmara de germinação tipo BOD a 30°C por cerca de dois dias até o crescimento das colônias (Figura 2).



Figura 2– Placa de Petri contendo meio de cultura LGI e colônias de *Nitrospirillum amazonense* após sete dias de incubação em BOD a 30°C

As colônias bem definidas foram transplantadas com palito de madeira estéril para três frascos *erlenmeyer* de 100 mL contendo 50 mL de meio LGI líquido. Um frasco foi mantido como controle (branco), o qual continha somente o meio de cultura, no sentido de monitorar quaisquer contaminações ao longo do procedimento. Foram utilizadas “rolhas de gaze” como tampa para facilitarem a aeração. Esses frascos de pré-cultura no meio líquido foram incubados em BOD a 30°C sob agitação constante a 120 rpm durante 24 horas. Para a preparação da cultura definitiva, a qual foi utilizada para a elaboração da curva de crescimento, foi transferido 1 mL da pré-cultura para novos frascos *erlenmeyer* contendo 50 mL de meio LGI e mantidos sob as mesmas condições. Um frasco foi mantido sem inoculação da pré-cultura e utilizado como controle.

Para elaboração da curva de crescimento de *N. amazonense* foram coletados dez pontos da cultura durante 22 horas de incubação, partindo-se do tempo 0 (minuto inicial após a transferência da pré-cultura) ao longo de 22 horas, mantendo-se um intervalo de quatro a seis horas, aproximadamente, entre eles. Em cada ponto foi medido a OD (densidade óptica) a 540 nm em aparelho espectrofotômetro Nanodrop (Nanodrop ND-1000, Nanodrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) e realizada diluição seriada em solução NaCl 0,9% com plaqueamento em meio sólido para contagem de UFCs (unidades formadoras de colônias).

A estirpe BR11145 de *N. amazonense* foi crescida em meio de cultura LGI por 96 horas, no escuro a 30 °C (Figura 2). A coloração azulada do meio contendo indicador azul de bromofenol revela elevação do pH resultante do metabolismo de *N. amazonense* (Figura 3).



Figura 3- Crescimento da estirpe BR11145 de *Nitrospirillum amazonense* em meio de cultura LGI

A concentração de 2×10^8 células viáveis mL^{-1} foi determinada por densidade óptica a 640 nm do meio de cultura com base em curva de crescimento de *N. amazonense* ao longo de 40 horas de incubação a 30 °C e 180 rpm de agitação (Figura 4).

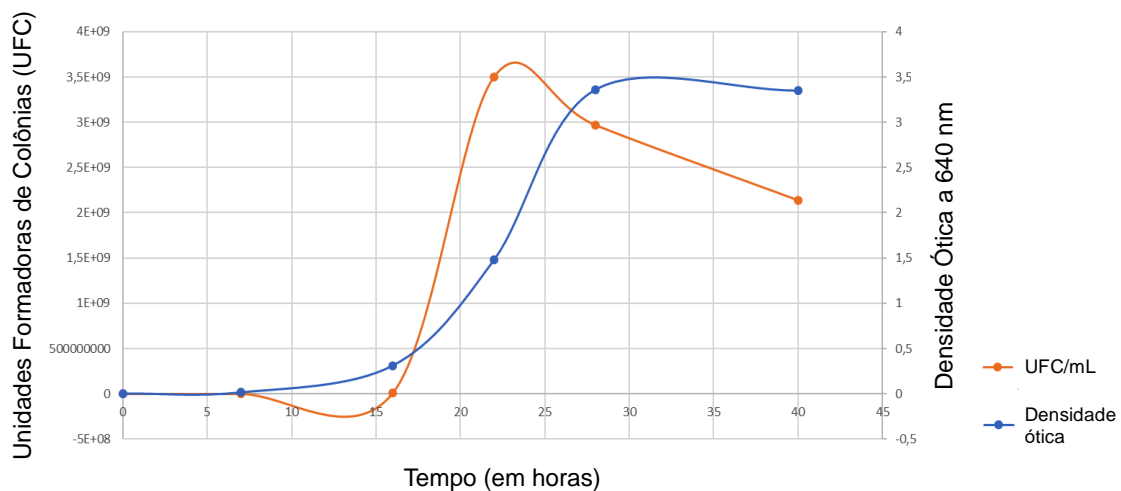


Figura 4- Curva de crescimento de *Nitrospirillum amazonense* cultivada em meio líquido LGI a 30°C e 180 rpm de agitação

5.2. Experimento em casa-de-vegetação

Entre os meses de agosto de 2019 e fevereiro de 2020, em casa-de-vegetação pertencente a Universidade Brasil, *Campus Fernandópolis/SP*,

localizada entre as coordenadas 20°16' latitude sul e 50°17' longitude oeste, foi realizado o plantio de cana-de-açúcar com a aplicação do adubo biológico Microgeo® e da bactéria *N. amazonense*.

De acordo com a classificação Köppen, o clima da região é tropical úmido, visto que possui inverno seco e ameno e verão quente e chuvoso (ROLIM et al., 2007), com precipitação média anual de 1.321 mm e 8 meses de déficits hídricos (LIMA et al., 2009).

O adubo biológico Microgeo® foi produzido por meio do Processo de Compostagem Líquida Contínua – CLC®. Para tanto, no dia 26 de julho de 2019, instalou-se uma biofábrica CLC® em uma área sob incidência de luz solar direta, utilizando-se um tanque plástico de 180 litros ao qual foi adicionado 15% de esterco bovino proveniente do rebanho da Universidade Brasil, 2,5% de Microgeo® START (recomendação do fabricante) e água limpa não clorada (Figura 5). O adubo biológico foi diariamente agitado com o auxílio de uma haste de madeira e, após 15 dias da instalação, estava pronto para ser utilizado.



Figura 5 - Biofábrica para compostagem líquida contínua (CLC) instalada no *Campus* de Fernandópolis da Universidade Brasil

Vinte e quatro vasos plásticos de 110 litros de capacidade foram preenchidos com 90 kg de solo classificado como Argissolo Vermelho Amarelo eutrófico abrupto, textura arenosa/média (OLIVEIRA et al., 1999), após a adição de fina camada de pedra britada recoberta com tela de sombrite no fundo do recipiente.

No momento do plantio, no dia 31 de agosto de 2019, o solo dos vasos foi adubado com 27 kg ha⁻¹ de N, 135 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 135 kg ha⁻¹ de K₂O, utilizando-se ureia como fonte nitrogenada, superfosfato simples como fonte fosfatada e cloreto de potássio como fonte potássica, segundo recomendação de Raij et al. (1997). A quantidade de adubo foi calculada levando-se em consideração a área de vaso, sendo o fertilizante incorporado ao solo na região onde as mudas de cana-de-açúcar foram plantadas.

Assim, em cada vaso, foram plantadas três mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar da cultivar IACSP01-5503, com cerca de 30 cm de altura, sendo estabelecidos os seguintes tratamentos:

- i) aplicação do adubo biológico Microgeo[®] acrescido de *N. amazonense* no momento da aplicação;
- ii) aplicação do adubo biológico Microgeo[®] sem acréscimo de *N. amazonense*;
- iii) inoculação de *N. amazonense* no sulco durante o plantio das mudas;
- iv) fertilização mineral do solo sem aplicação de adubo biológico Microgeo[®] e *N. amazonense*.

A adubação biológica foi realizada na dose de 100 L ha⁻¹ no sulco de plantio (dose em experimento de teste) e 200 L ha⁻¹ nos pós emergência (dose recomendada pela Embrapa). Duas doses (100 e 200 mL ha⁻¹) de *N. amazonense* (2×10⁸ células viáveis mL⁻¹) foram avaliadas em cada tratamento envolvendo esta bactéria.

Para tanto, uma alíquota de 0,5 L de Microgeo[®] foi retirada da biofábrica e as partículas em suspensão foram eliminadas. Para a aplicação de Microgeo[®] e da bactéria *N. amazonense* nas doses avaliadas, utilizou-se uma pipeta volumétrica automática (Figura 6). Em todos os tratamentos, a dose foi dividida igualmente entre as três plantas de cana-de-açúcar imediatamente após o plantio.



Figura 6 – Aplicação do adubo biológico Microgeo® e da bactéria *Nitrospirillum amazonense* no momento do plantio das mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar

Os vasos foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado no interior da casa-de-vegetação, conforme ilustrado na Figura 7. Os tratamentos com a bactéria *N. amazonense* nas doses 100 e 200 mL ha⁻¹ foram instalados com três repetições e os demais com seis repetições cada, totalizando 24 vasos (Figura 8).

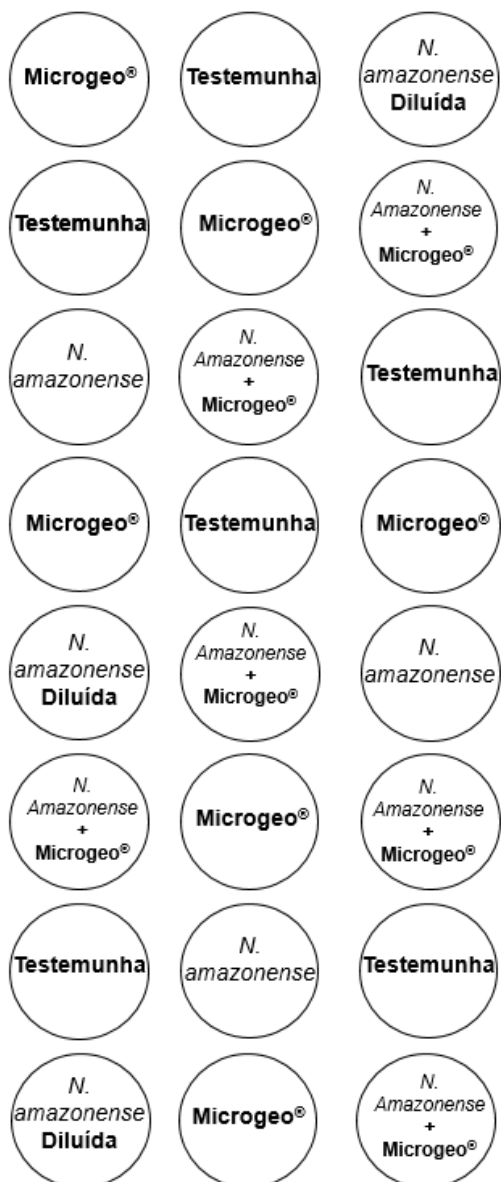


Figura7 – Croqui da disposição dos vasos contendo os tratamentos experimentais no interior da casa-de-vegetação



Figura 8–Imagem do experimento registrada em 4 de setembro de 2019 na Universidade Brasil, *Campus* de Fernandópolis

A irrigação foi manual e realizada em dias alternados com 1,4 L de água não clorada por vaso durante os primeiros 30 dias após o plantio (DAP). Dos 30 aos 60 DAP, utilizou-se 2,8 L/vaso e, após, 5,0 L/vaso de água, também em dias alternados. Essa programação foi determinada com base na capacidade de água disponível média do solo utilizado ($0,63 \text{ mm cm}^{-1}$), a partir do modelo de van den Berg (2000), e na evapotranspiração média da cultura ($4,0 \text{ mm dia}^{-1}$) (LIMA et al., 2009).

O adubo biológico no interior da biofábrica, foi constantemente agitado e aos 43 dias após a instalação da biofábrica, foi reinoculado com 3 kg de Microgeo® e, em seguida, homogeneizado.

No dia 24 de outubro de 2019 (54 DAP), foi realizada uma segunda aplicação de Microgeo® na dose de 200 L ha^{-1} via foliar, apenas no tratamento contendo Microgeo®, utilizando-se um pulverizador manual.

Aos 60 DAP, foi realizada uma adubação de cobertura com 40 kg ha^{-1} de nitrogênio, utilizando-se ureia como fonte nitrogenada em todos os vasos.

As plantas se desenvolveram sem intercorrência de pragas ou doenças, e, quando necessário, foi realizada uma capina manual para a retirada de plantas daninhas dos vasos.

5.2.1. Avaliações Biométricas

O experimento foi finalizado no dia 11 de fevereiro de 2020 (164 DAP), sendo realizadas as seguintes avaliações morfológicas:

- número de perfilhos: contagem direta dos perfilhos em cada planta aos 45, 110 e 164 DAP, obtendo-se, em seguida, a média por vaso;
- altura das plantas: realizada com auxílio de uma régua graduada do colo da planta até a inserção da folha +1, em todos os perfilhos de cada planta, obtendo-se, em seguida, a média por vaso em cm;
- diâmetro dos colmos: realizada a cerca de 5 cm do nível do solo na região central do internódio com uso de um paquímetro digital (Figura 9), obtendo-se as medidas de todos os colmos de cada planta, calculando-se, em seguida, a média por vaso em mm;



Figura 9– Avaliação do diâmetro do colmo utilizando paquímetro digital

- número de colmos: contagem direta dos colmos visíveis em cada planta, obtendo-se, em seguida, a média por vaso;
- comprimento da folha +3: efetuado com o uso de uma trena, determinando-se o comprimento da folha +3 em todos os perfilhos de cada planta (Figura 10), calculando-se, em seguida, a média por vaso em cm.



Figura 10– Técnico da Universidade Brasil determinando o comprimento da folha em planta crescida nas condições avaliadas no experimento em casa-de-vegetação

- largura da folha +3: efetuado com o uso de um paquímetro digital, determinando-se a largura da folha +3 na porção mediana em todos os perfilhos de cada planta, calculando-se, em seguida, a média por vaso em mm;
- número de folhas verdes: contagem de folhas totalmente expandida com um mínimo de 20% de área verde, contada a partir da folha +1 em todos os perfilhos de cada planta, calculando-se, em seguida, a média por vaso;
- área foliar: foi estimada por meio da contagem do número de folhas verdes e pelas medições nas folhas +3 (comprimento e largura), segundo metodologia descrita por Hermann & Câmara (1999): $AF = C \times L \times 0,75 \times (N + 2)$, em que C é o comprimento da folha +3, L é a largura da folha +3, 0,75 é o fator de correção para área foliar da cultura, e N é o número de folhas abertas com pelo menos 20% de área verde;
- massa verde de folha: as folhas de todas as plantas de cada vaso foram retiradas e pesadas em balança com precisão de 0,01 gramas;
- massa seca de folha: as folhas de cada vaso foram acondicionadas em sacos de papel, secas em estufa de circulação de ar (72°C até massa constante) e pesadas em balança com precisão de 0,01 gramas.

5.2.2. Análises Químicas de Amostras de Solo e Foliar

Logo após a realização das determinações biométricas, procedeu-se a retirada de amostras de solo e de foliar para a análise química. A amostra de solo consistiu na retirada com um trado de três subamostras por vaso que foram, posteriormente, homogeneizadas e reduzidas para a remessa ao laboratório do Instituto Brasileiro de Análises - IBRA, localizado na cidade de Sumaré/SP.

O pH do solo foi medido em uma suspensão solo: água 1: 2,5. Al, Ca e Mg trocáveis foram extraídos com KCl 1 M. Cálcio e Mg foram determinados por espectrometria de absorção atômica e Al por titulação ácido-base. O fósforo e o K foram extraídos por resina de troca iônica. A acidez potencial (H + Al) foi estimada por uma equação baseada no pH determinado em solução tampão SMP (pH SMP). Os micronutrientes disponíveis (Fe, Mn, Zn e Cu) foram extraídos por Mehlich 1 e determinados por espectrofotometria de absorção atômica. O boro foi extraído com água quente e determinado por espectrofotometria com azometina-H a 420 nm. Alguns dos resultados permitiram o cálculo de outros parâmetros como bases trocáveis (SB), a soma de Ca, Mg e K; capacidade de troca catiônica (CTC), a soma de Ca, Mg, K, Al e H; saturação por bases (V%), relação percentual entre SB e CTC; e saturação de Al (m%), a relação percentual entre Al trocável e CTC (RAIJ, 2001).

As amostras de folhas foram coletadas aos 164 DAP, no momento da determinação da biometria das plantas. De cada vaso foram retiradas doze folhas abertas com pelo menos 20% de área verde (quatro folhas de cada planta do vaso). Os materiais vegetais foram moídos separadamente, identificadas, embaladas em sacos de papel e encaminhadas ao laboratório do Instituto Brasileiro de Análises – IBRA para determinação de N (g/kg), P (g/kg), K (g/kg), Ca (g/kg), Mg (g/kg), S (g/kg), B (mg/kg), Cu (mg/kg), Fe (mg/kg), Mn (mg/kg), Zn (mg/kg) e Al (mg/kg), segundo metodologia descrita em Bataglia et al. (1983).

5.2.3. Análise Estatística

Todos os dados obtidos foram analisados estatisticamente por meio da análise de variância, com o teste F. Quando houve significância, foi aplicado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade para a comparação de médias. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Fatores químicos do solo

Na Tabela 1, foram apresentados os resultados dos fatores químicos do solo cultivado com cana-de-açúcar em diferentes tratamentos. Os dados indicam aumento significativo no teor de enxofre no solo dos tratamentos com *Nitrospirillum amazonense* (100 mL ha⁻¹) e em maior quantidade no adubo biológico Microgeo® + *N. amazonense*.

Tabela 1. Fatores químicos do solo cultivado com cana-de-açúcar em tratamentos experimentais contendo adubo biológico Microgeo® e *Nitrospirillum amazonense*

Fatores químicos do solo	Tratamentos experimentais					Estatística (ANOVA)
	Adubo biológico Microgeo®	<i>Nitrospirillum amazonense</i> (200 mLha ⁻¹)	<i>Nitrospirillum amazonense</i> (100 mL ha ⁻¹)	Adubo biológico Microgeo® + <i>N. amazonense</i>	Testemunha	
P	13,8 ^δ A ±7,2	11,3aA±1,1	8,3aA±1,5	18,0 AA ±11,8	13,3 aa ±3,5	
MO	14,5 A ±0,8	15,0aA±1,0	14,3aA±1,5	14,7 AA ±0,5	14,0 aa ±0,9	
pH (CaCl ₂)	5,1 A ±0,1	5,07aA±0,1	5,1aA±0	5,2 AA ±0,1	5,2 aa ±0,1	**
K	2,3 A ±0,4	2,3aA±0,3	2,2aA±0,2	2,2 AA ±0,6	2,1 aa ±0,2	**
Ca	22,0 A ±1,7	23,0aA±1,0	23,0aA±2,0	25,0 AA ±6,0	24,5 aa ±3,9	
Mg	11,0 A ±1,3	10,7bA±0,6	12,7aA±0,6	12,2 AA ±1,6	13,7 aa ±3,1	
Na	1,25 A ±0,2	1,3aA±0,1	1,5aA±0,2	1,2 AA ±0,3	1,3 aa ±0,1	**
H+Al	23,7 A ±0,8	23,7aA±1,1	22,7aA±0,6	23,3 AA ±1,0	23,2 aa ±1,3	**
CTC	60,1 A ±2,8	60,9aA±2,8	62,0aA±3,1	64,0 AA ±7,8	65,0 aa ±6,1	
SB	36,4 A ±2,5	37,3aA±1,8	39,4aA±2,5	40,6 AA ±7,1	41,9 aa ±6,7	*
V%	60,5 A ±1,8	61,0aA±1,0	63,7aA±1,1	63,3 AA ±3,1	64,0 aa ±4,6	**
S	12,7 A ±7,2	15,0aA±3,6	7,7bB±1,5	12,8 AA ±3,9	18,8 aa ±4,9	**
B	0,7 A ±0,1	0,7aA±0,2	0,8aA±0,2	0,8 AA ±0,2	0,8 aa ±0,1	
Cu	0,7 A ±0,1	0,6aA±0,1	0,6aA±0,1	0,7 AA ±0,1	0,6 aa ±0,1	
Fe	37,2 A ±7,5	38,3aA±4,2	38,0aA±3,5	35,0 AA ±4,3	35,3 aa ±3,7	**
Mn	11,7 A ±1,9	11,2aA±0,9	12,0aA±0,9	11,3 AA ±1,5	10,9 aa ±1,1	*
Zn	1,5 A ±0,3	1,3aA±0,2	1,0aA±0,2	1,8 AA ±0,7	1,5 aa ±0,3	

^δMédia calculada com base nas replicadas.

Teste Tukey ($P < 0.05$) foi conduzido considerando: adubo biológico produzido com Microgeo® vs. adubo biológico produzido com Microgeo® + *N. amazonense* (letras maiúsculas em negrito), *N. amazonense* 200 mL/ha vs. *N. amazonense* 100 mL/ha (letras minúsculas sem negrito), *N. amazonense* (200 e 100 mL/ha) vs. adubo biológico produzido com Microgeo® + *N. amazonense* (letras maiúsculas sem negrito), adubo biológico produzido com Microgeo® + *N. amazonense* vs. Testemunha (letras minúsculas em negrito), adubo biológico produzido com Microgeo® vs. Testemunha (letras minúsculas sem negrito em itálico). As comparações são interpretáveis nas linhas.

N (g/kg), P (g/kg), K (g/kg), Ca (g/kg), Mg (g/kg), S (g/kg), B (mg/kg), Cu (mg/kg), Fe (mg/kg), Mn (mg/kg), Zn (mg/kg) e Al (mg/kg)

ANOVA, nível de significância: ns: $P > 0.05$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

O enxofre combinado com o nitrogênio aumenta o teor de metionina nas proteínas dos cereais, melhorando sua qualidade nutritiva, conseqüentemente, elevando a produção de colmos e o teor de sacarose na cana-de-açúcar (MALAVOLTA & MORAIS, 2007). Segundo Malavolta (1996), o elemento enxofre influencia em numerosos compostos, como aminoácidos e proteínas, coenzimas, sulfolipídeos, flavonóides, lipídeos, glucosinolatos, polissacarídeos, compostos não saturados, sulfóxidos, alcaloides, nucleotídeos, compostos reduzidos, entre outros. Aliado com o nitrogênio, o enxofre participa de todas as funções e processos vitais da planta, desde a absorção iônica, aos papéis dos ácidos nucleicos (RNA e DNA), inclusive controle hormonal para o crescimento e a diferenciação celular. Portanto, a existência de uma relação nitrogênio/enxofre está associada com o crescimento e a produção da planta.

O enxofre é importante não só como nutriente, mas como mecanismo de defesa da planta contra pragas e doenças. Ainda, o enxofre compõe a ferredoxina, molécula responsável pela transferência de elétrons na fotossíntese, na fixação de nitrogênio atmosférico, na redução de compostos oxidados, tal como o nitrato (MENGEL & KIRKBY, 2001) e influencia, também, nos teores de clorofila, o qual se eleva nas plantas que recebem adubação sulfatada (TISDALE, 1977).

Deficiência e diminuição na produção das culturas podem acontecer quando os teores de enxofre na forma de SO_4^{2-} (S-SO_4^{2-}) na camada 0–20 cm do solo forem menor que 10 mg dm^{-3} (MALAVOLTA & MORAES, 2007). A carência de enxofre causa diminuição da produção de aminoácidos e as proteínas que os contêm não poderão ser formadas. Portanto, plantas insuficientemente abastecidas com enxofre não conseguem assimilar o nitrogênio em proteínas e o mesmo se acumula na forma de aminas, amidas e aminoácidos solúveis, assim, os sintomas de deficiência de enxofre lembram os de nitrogênio: plantas cloróticas e mal desenvolvidas. A clorose causada pela deficiência de enxofre surge primeiramente nas folhas jovens, pois o elemento não se redistribui das partes mais velhas (VITTI, 1989; EPSTEIN & BLOOM, 2006).

Apesar da não diferença estatística, vale ressaltar que o teor médio de fósforo no solo no tratamento com adubo biológico produzido com Microgeo® +

N. amazonense (18 g/kg) foi maior quando comparado aos demais tratamentos (adubo biológico produzido com Microgeo[®], *N. amazonense* (200 mL/ha), *N. amazonense* (100 mL/ha) e Testemunha: 13,8; 11,3; 8,3; 13,3 g/kg, respectivamente). Esta tendência indica uma sinergia positiva entre a tecnologia Microgeo[®] e o *N. amazonense* a este macronutriente de alta relevância na agricultura.

6.2. Composição morfológica das plantas de cana-de-açúcar

Na Tabela 2 foram apresentados os resultados da composição morfológica das plantas de cana-de-açúcar crescidas nos diferentes tratamentos avaliados neste estudo. Os dados mostram aumento significativo nos aspectos de largura da folha + 3, o número de folhas verdes nos tratamentos Testemunha e em maior quantidade nos tratamentos contendo adubo biológico produzido com Microgeo[®] + *N. amazonense*.

Tabela 2. Composição morfológica de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em solo contendo adubo biológico Microgeo® e *Nitrospirillum amazonense*

Composição Morfológica	Tratamentos experimentais					Estatística (ANOVA)
	Adubo biológico Microgeo®	<i>Nitropirillum amazonense</i> (200 mL/ha)	<i>Nitrospirillum amazonense</i> (100 mL/ha)	Adubo biológico Microgeo® + <i>N. amazonense</i>	Testemunha	
Perfilhos 15/07	7,0 ^o Aa ±1,24	6,45 aA ±0,67	4,77 bA ±0,50	5,94 AAa ±0,82	5,95 aa ±1,32	
Perfilhos 10/02	4,16 Aa ±0,54	5,11 aA ±0,69	4,22 aA ±1,07	4,16 AAa ±0,75	3,99 aa ±0,50	
Altura da planta (cm)	928,82 Aa ±88,95	898,9 aA ±64,07	983,97 aA ±82,98	1020,78 AAa ±118,88	948,11 aa ±98,34	
Diâmetro do colmo (mm)	183,71 Aa ±1,20	183,91 aA ±0,26	183,46 aA ±0,54	183,11 AAa ±2,38	183,83 aa ±0,85	
Número de colmos	3,33 Aa ±0,84	3,99 aA ±0,66	3,22 aA ±0,84	3,22 AAa ±0,65	3,47 aa ±0,27	
Comprimento +3	1,35 Aa ±0,05	1,37 aA ±0,05	1,33 aA ±0,12	1,36 AAa ±0,04	1,34 aa ±0,06	
Largura da folha +3	194,40 Aa ±3,30	196,62 aA ±6,41	192,46 aA ±0,84	196,75 AAa ±3,30	187,48 bb ±1,17	*
N° de folhas verdes	4,20 Aa ±0,6	4,05 aA ±0,6	4,96 aA ±0,51	5,17 AAa ±0,35	4,05 ba ±0,23	*
Massa verde de folha	1511,61 Aa ±245,16	1910,94 aA ±387,75	1577,89 aA ±286,81	1768,80 AAa ±598,53	1708,51 aa ±173,99	
Massa seca de folha	472,23 Aa ±57,09	552,27 aA ±43,49	472,46 aA ±66,87	508,72 AAa ±159,84	536,22 aa ±46,52	

^oMédia calculada com base nas replicadas.

Teste Tukey ($P < 0.05$) foi conduzido considerando: adubo biológico produzido com Microgeo® vs. adubo biológico produzido com Microgeo® + *N. amazonense* (letras maiúsculas em negrito), *N. amazonense* 200 mL/há vs. *N. amazonense* 100 mL/ha (letras minúsculas sem negrito), *N. amazonense* (200 e 100 mL/ha) vs. adubo biológico produzido com Microgeo® + *N. amazonense* (letras maiúsculas sem negrito), adubo biológico produzido com Microgeo® + *N. amazonense* vs. Testemunha (letras minúsculas em negrito), adubo biológico produzido com Microgeo® vs. Testemunha (letras minúsculas sem negrito em itálico). As comparações são interpretáveis nas linhas.

ANOVA, nível de significância: ns: $P > 0.05$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

A folha é, a princípio, o órgão que melhor sinaliza o estado nutricional da planta e permite avaliar, de forma indireta, a fertilidade do solo e se há a necessidade de adubação. A folha utilizada para a diagnose, bem como a faixa de teores foliares considerada adequada, varia de acordo com a espécie vegetal e com diversos fatores, a saber: época e procedimento de coleta de amostras, potencial produtivo da lavoura e eficiência varietal (MALAVOLTA, VITTI & OLIVEIRA, 1997). Lucchesi (1987) explanou que o aumento da área foliar induz um aumento na capacidade da planta de absorver a energia solar para a realização da fotossíntese e, desta forma, este critério pode ser utilizado para indicar a produtividade.

As folhas são responsáveis diretamente pela transformação da energia solar em energia química através da fotossíntese, por isso, a baixa disponibilidade de enxofre no solo vem acarretando significativa redução da produção de biomassa e na qualidade das plantas, pois está atrelado às várias funções biológicas essenciais que desempenham papéis críticos, incluindo o papel de compostos orgânicos como aminoácidos, vitaminas, acetil-CoA e atividades de muitas enzimas que participam da fotossíntese e do metabolismo do nitrogênio (PANDEY et al., 2009; SHAH et al., 2013).

6.3. Características químicas foliares

Na Tabela 3, foram apresentados os resultados das análises químicas foliares das plantas de cana-de-açúcar crescidas nos diferentes tratamentos avaliados. Os resultados mostram aumento significativo nos teores de enxofre no tratamento contendo adubo biológico produzido com Microgeo® + *N. amazonense*.

Tabela 3. Características químicas foliares de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em solo contendo a adubo biológico Microgeo® e *Nitrospirillum amazonense*

Características químicas foliares	Tratamentos experimentais					Estatística (ANOVA)
	Adubo biológico Microgeo®	<i>Nitrospirillum amazonense</i> (200 mL/ha)	<i>Nitrospirillum amazonense</i> (100 mL/ha)	Adubo biológico Microgeo® + <i>N. amazonense</i>	Testemunha	
N (g/kg)	9,0 Aa ±1,8	8,11aA±2,09	8,20aA±0,91	9,35 AAa ±1,69	7,57 aa ±3,49	
P (g/kg)	0,71 Aa ±0,11	0,61aA±0,11	0,71aA±0,17	0,73 AAa ±0,11	0,76 aa ±0,22	
K (g/kg)	10,79 Aa ±2,33	10,08aA±1,69	9,58aA±2,12	9,66 AAa ±2,07	10,35 aa ±1,97	
Ca (g/kg)	2,87 Aa ±0,30	3,0aA±0,25	2,83aA±0,62	3,12 AAa ±0,68	2,92 aa ±0,60	
Mg (g/kg)	1,54 aA ±0,13	1,5aA±0,07	1,42aA±0,21	1,60 AAa ±0,17	1,57 aa ±0,13	
S (g/kg)	1,20 Aa ±0,27	1,10bA±0,28	1,46aA±0,30	1,86 AAa ±0,57	1,04 ba ±0,33	*
B (mg/kg)	26,41 Aa ±22,53	11,58a±4,20	34,14a±35,94	16,35 Aa ±13,64	14,80 aa ±6,18	
Cu (mg/kg)	15,58 Aa ±5,47	17,0aA±9,5	11,66aA±2,92	16,41 AAa ±6,85	15,0 aa ±4,73	
Fe (mg/kg)	145,91 Aa ±55,81	141,5aA±19,01	124,16aA±10,25	133,91 AAa ±22,59	149,64 aa ±32,89	
Mn (mg/kg)	84,82 Aa ±19,39	90,03aA±27,96	76,18aA±9,76	82,77 AAa ±13,05	81,23 aa ±9,37	
Zn (mg/kg)	46,25 Aa ±19,60	42,83aA±11,51	36,5aA±3,77	41,83 AAa ±9,05	39,64 aa ±10,17	
Al (mg/kg)	125,66 Aa ±66,44	120,71aA±43,36	114,3aA±19,8	92,93 AAa ±27,46	123,51 aa ±48,24	

ªMédia calculada com base nas replicadas.

Teste Tukey ($P < 0.05$) foi conduzido considerando: adubo biológico produzido com Microgeo® vs. adubo biológico produzido com Microgeo® + *N. amazonense* (letras maiúsculas em negrito), *N. amazonense* 200 mL/ha vs. *N. amazonense* 100 mL/ha (letras minúsculas sem negrito), *N. amazonense* (200 e 100 mL/ha) vs. adubo biológico produzido com Microgeo® + *N. amazonense* (letras maiúsculas sem negrito), adubo biológico produzido com Microgeo® + *N. amazonense* vs. Testemunha (letras minúsculas em negrito), adubo biológico produzido com Microgeo® vs. Testemunha (letras minúsculas sem negrito em itálico). As comparações são interpretáveis nas linhas.

ANOVA, nível de significância: ns: $P > 0.05$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Há efeito positivo da combinação do adubo biológico produzido com Microgeo® e *N. amazonense* na área foliar e número de folhas verdes. Por meio da análise estatísticas dos fatores químicos do material foliar, é possível observar que esta combinação aumentou o teor de enxofre na folha da cana-de-açúcar. O enxofre desempenha funções vitais no metabolismo das plantas por ser componente importante de aminoácidos (cistina, cisteína, metionina e taurina), proteína, coenzimas (tiamina e biotina) e ésteres com polissacarídeos (COLEMAN, 1966; MALAVOLTA, VITTI & OLIVEIRA, 1997; CRAWFORD et al., 2000). A presença de enxofre ajuda a evitar a clorose nas folhas (VITTI, 1989; EPSTEIN & BLOOM, 2006).

No solo, as diferenças significativas (pH, Na, V%, K, H+Al, Mn) foram a Testemunha e os demais tratamentos experimentais, sem efeito da combinação do adubo biológico produzido com Microgeo®+ *N. amazonense* no tempo avaliado.

Apesar da não diferença estatística, destaca-se o teor médio de nitrogênio foliar no tratamento com adubo biológico produzido com Microgeo® + *N. amazonense* (9,35 g/kg), tendo sido este maior em 23,5%, 15,3%, 14% e 3,9% quando comparado ao tratamento Testemunha, *N. amazonense* (200 mL/ha), *N. amazonense* (100 mL/ha) e adubo biológico produzido com Microgeo®, respectivamente. Mais uma vez, esta tendência indica uma sinergia positiva entre a tecnologia Microgeo® e *N. amazonense*. Salientando a importância de desenvolver adubos biológicos no aspecto da sustentabilidade com vantagens do uso desse produto como o baixo custo e o aumento da produtividade e da biodiversidade microbiológica do solo.

Por fim, vale destacar que, assim como na adubação nitrogenada, as respostas à inoculação, e possivelmente à combinação desta com adubação biológica, são dependentes da variedade de cana-de-açúcar utilizada (SCHULTZ et al., 2012; URQUIAGA et al., 2012) e podem ser mais notáveis em solos de média e baixa fertilidade (OLIVEIRA et al., 2006; GOSAL et al., 2012).

7. CONCLUSÃO

Este estudo, baseado na avaliação dos primeiros estádios do desenvolvimento da cana planta em condições controladas, revelou aumento significativo na largura da folha +3 e número de folhas verdes no tratamento com adubo biológico produzido com Microgeo® + *N. amazonense* comparado aos dados do tratamento Testemunha, em que foram aplicados apenas fertilizantes minerais. Por isso, conclui-se que existiu efeito positivo da combinação do adubo biológico Microgeo® e *N. amazonense* na área foliar e no número de folhas verdes nos primeiros estágios do desenvolvimento da planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARGAWAL, A. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 33, p. 233-271, 2007.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, R.S; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legumes plants. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford,v.29, p.922- 928, 1997.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicaegen. nov.*, a root associated nitrogen-fixing. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.36, p.86-93, 1986.

BATAGLIA, O. C. et al. Métodos de Análise Química de Plantas. Campinas: **Instituto Agrônômico**, 1983. 48p. (Boletim Técnico, 78).

BILLAH, M. M.; HASSAN, M. H.; KALAM, M. A.; PALASH, S. M.; HABIBULLAH, M. Effect of alcohol-gasoline blends optimization on fuel properties and their effect on SI engine performance and emission. **Journal of Cleaner Production**, v. 86, n. 1, p. 230-237, 2014.

CASAGRANDE, A. A.. **Tópicos de Morfologia e Fisiologia de Cana-de-açúcar**. Jaboticabal: Funep. 157p. 1991.

CASAGRANDE, A. A. Crescimento da cana-de-açúcar. **Stab, Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.14, n.5, p.7-8, 1996.

CAVALCANTE, V.A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.108, p.23-31, 1988.

CÉSAR, F. R. C. F. Eficiência agrônômica de misturas no mesmo grânulo de fosfatos acidulados, fosfatos naturais e enxofre elementar. 2016. 136f. (Tese: Doutorado em Agronomia) – **Escola Superior de Agricultura — Luiz de Queiroz II**, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

CHEN, R. H.; CHIANG, L. B.; CHEN, C. N.; LIN, T. H. Cold-start emissions of an SI engine using ethanol-gasoline blended fuel. **Applied Thermal Engineering**, v. 31, n. 8-9, p. 1463-1467, 2011.

COLEMAN, R. The importance of sulfur as a plant nutrient in the world crop production. **Soil Science**, New Brunswick, v. 101, p. 230-239, 1966.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Séries históricas das safras. Disponível em: <Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras> >. Acesso em 10 de janeiro de 2021.

CRAWFORD, N. M.; KAHN, M. L.; LEUSTEK, T.; LONG, S. R. Nitrogenandsulphur. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.). *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville: **American Society of Plant Physiologists**, 2000. chap. 16, p. 789-849.

D'ANDREA, P. A. Agricultura de processos. In: SIXEL, B.T. Biodinâmica e agricultura. Botucatu: **Associação Brasileira de Agricultura Biodinâmica**, 2003. p. 155-181.

DIAS, K. G. L. **Fontes e doses de foto do cafeeiro: produtividade, dinâmica de nutrientes no solo e nutrição mineral de plantas**. 2012, 90f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

DÖBEREINER, JOHANNA. **Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia**. Documento nº 110, 1999.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. 2. ed. Londrina: Editora Planta, 2006. 403 p.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. P. **Princípios e perspectivas**. Londrina. Editora Planta. 2006.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In. **45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria**. Anais. UFSCar, São Carlos, SP, p.255-258. 2000.

FIORINI, I. V. A.; PINHO, R. G. V.; PIRES, L. P. M.; SANTOS, À. O.; FIORINI, F. V. A.; CANCELLIER, L. L.; RESENDE, E. L. Avaliação de fontes de enxofre e das formas de micronutrientes revestindo o NPK na cultura do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 15, n. 1, p. 20-29, 2016.

GHAZIKHANI, M.; HATAMI, M.; SAFARI, B.; GANJI, D. D. Experimental investigation of performance improving and emissions reducing in a two stroke SI engine by using ethanol additives. **Propulsion and Power Research**, v. 2, n.4, p. 276-283, 2013.

HERMANN, E.R.; CÂMARA, G.M.S. 1999. Um método simples para estimar a área foliar de cana-de-açúcar. **Revista da STAB**, 17: 32-34.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, p. 413-425, 2010.

IODICE, P.; SENATORE, A. Cold start emissions of a motorcycle using ethanol-gasoline blended fuels. **Energy Procedia**, v. 45, n. 1, p. 809-818, 2014.

KIEHL, E. J. **Fertilizantes Orgânicos**, Piracicaba, SP: Ceres, 1985. 492 p.

KIM, J.; REES, D. C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. **Biochemistry**, New York, v. 33, p. 389-397, 1994.

LAL, R. Impactos do sequestro de carbono do solo na mudança climática global e na segurança alimentar **Science**, v. 304, p.1623, 2004.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2006. 550p.

LIN, S. Y. et al. Description of *Niveispirillum fermenti* gen. nov., sp. nov., isolated from a fermentor in Taiwan, transfer of *Azospirillum irakense* (1989) as *Niveispirillum irakense* comb. nov., and reclassification of *Azospirillum amazonense* (1983) as *Nitrospirillum amazonense* gen. nov. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 105: 1149-1162, 2014.

LIMA, F. B. de; VANZELA, L. S.; MARINHO, M. A.; SANTOS, G. O. Balanço hídrico climatológico normal ponderado para o município de Fernandópolis - SP. In: **XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROMETEOROLOGIA**, Belo Horizonte, MG, 2009.

LUCCHESI, A. A. **Fatores da produção vegetal**. In: CASTRO, P. R. C.; FERREIRA, S. O.; YAMADA, T. *Ecofisiologia da produção agrícola*. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. p.1-11, 1987.

MALAVOLTA, E. **Nutri-Fatos: informação agronômica sobre nutrientes para as culturas**. Piracicaba: POTAFOS, 1996. p. 11-12. (Arquivo do agrônomo, n.10)

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional de plantas**. 2. ed. Piracicaba: Potafos, 1997. 319 p.

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. (Eds.). *Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira*. Piracicaba: IPNI, 2007. p. 189-249.

MAGRO, D. Supermagro: a receita completa. **Boletim da Associação de Agricultura Orgânica**, n. 16, p. 3-4, 1994.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1995. 889 p.

MENEZES, T.S.A. et al. Embriogene Sombra de Superiores de Cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). **Revista GEINTEC**, v. 2, n. 1, p. 32-41, 2012.

MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. **Principles of plant nutrition**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2001. 849 p.

MICROGEO. Adubação Biológica. Manual Técnico. Disponível em: http://www.microgeo.com.br/ns/pdf/manual_tecnico.pdf. Acesso em: 02/02/2021.

NAJAFI, G.; GHOBADIAN, B.; YUSAF, T.; ARDEBILI, S. M. S.; MAMAT, R. Optimization of performance and exhaust emission parameters of a SI (spark ignition) engine with gasoline-ethanol blended fuels using response surface methodology. **Energy**, v. 90, n. 2, p. 1815-1829, 2015.

NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Ecologia das bactérias diazotróficas nos solos tropicais. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, p.15-60.1998.

NUNES, J. L. S. **Tipos de fertilizantes**, 2016. Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/fertilizantes/tipos-de-fertilizantes_361441.html> Acesso em: 17 de novembro de 2020.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; BALDANI J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.284, n.1-2, p.23-32, 2006.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.242, p.205–215, 2002.

PANDEY, S. N.; NAAZ, S.; ANSARI, S. R. Growth, biomass and petroleum convertible hydrocarbons' yield of *Grindelia camporum* planted on an alluvial soil (Entisol) of North India and its response to sulphur fertilization. **Biomass and bioenergy**, v. 33, n. 3, p. 454-458, 2009.

RAIJ, B. VAN; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C., eds. Cana-de-açúcar. In: **RECOMENDAÇÕES de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2.ed. Campinas, Instituto Agronômico - Fundação IAC, 1997. p.237-239. (Boletim Técnico, 100).

RAIJ, B. van; ANDRADE, J.C. de; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais**. Campinas, Instituto Agronômico, 285p. 2001.lal

REES, D.C.; TECZAN, F. A.Structural basis of biological nitrogen fixation. Philosophical Thansactions of the Royal Society of London. **A Mathematical Physical and Engineering Sciences**, London, v. 363, p. 971-984, 2005.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T., GILLIS, M.; HOSTE,B.; VANCANNEYT, M.; KERSTERS, K; DE LEY J.*Azoarcus*gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of kallar grass (*Leptochloafusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcusindigen* ssp. Nov and *Azoarcuscommuni* ssp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.43, n.3, p.574- 584, 1993.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; URQUIAGA, S. **Recomendação de uma mistura de estirpes de cinco bactérias fixadoras de nitrogênio para inoculação de cana de açúcar**. Seropédica, Embrapa Agrobiologia, 2009. 4p. (Circular Técnica 30).

REIS, V. M. et al. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M. S. Nutrição mineral de plantas. Viçosa: **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, 2006. cap. 6, p. 153-174.

ROLIM, G.S.; CAMARGO, M.B.P.; LANIA, D.G.; MORAES, J.F.L. **Classificação climática de Köppen e de Thornthwaite e sua aplicabilidade na determinação de zonas agroclimáticas para o Estado de São Paulo**. Bragantia, Campinas, 66(4): 711-720, 2007.

ROSWALL, T. Nitrogen loses from terrestrial ecosystems: global, regional and local considerations. In: International Meet. **Global Impacts of Applied Microbiology**.v.5, p 17 – 26, 1979.

SCUDELETTI, Daniele.; **Modos de inoculação de *Azospirillum brasilense* em cana-de-açúcar** / Daniele Scudeletti. Botucatu: [s.n.], 2016.

SUGAWARA, L, M. et al. Avaliação de três métodos de estimativa de índice de área foliar aplicados à cana-de-açúcar. **Simpósio Brasileira de Sensoriamento Remoto**. p 499- 506, 2009.

SCHULTZ, N. et al. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 38: 407-414, 2014.

SCHULTZ, N. et al. Produtividade e diluição isotópica de ¹⁵N em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 51: 1594-1601, 2016.

STIPP, S. R.; CASARIN, V. **A importância do enxofre na agricultura brasileira**. Informações Agrônômicas, Piracicaba, n. 129, p. 14-20, 2010.

TISDALE, S. L. Sulfur in forage quality and ruminant nutrition. **Washington, DC: The Sulfur Institute**, 1977. 13 p. (Technical Bulletin, 22).

VAN DEN BERG M, BURROUGH P, DRIESSEN P. Uncertainties in the appraisal of water availability and consequences for simulated sugarcane yield potentials in São Paulo State, Brazil. **Agriculture Ecosystems and Environment**, 2000.

VITTI, G. C.; OTTO, R.; SAVIETTO, J. **Manejo do Enxofre na agricultura**. **Informações Agrônômicas**, Piracicaba, n. 152, p. 1-14, 2015.

YABUUCHI, E.; YANO, H.; OYAIZU, Y.; HASHIMOTO, T.; ZAKI, E.; YAMAMOTO, H. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* *homology* group II to the new genus, with the type species *Burkholderiacepacia*(Palleroni and Holmes, 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v.36, p.1251-1275, 1992.

YAO, Y. C.; TSAI, J. H.; WANG, I. T. Emissions of gaseous pollutant from motorcycle powered by ethanol–gasoline blend. **Applied Energy**, v. 102, n .1, p. 93-100, 2013.