

15º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP - 2024

Desenvolvimento de novos inoculantes para cana-de-açúcar: bactérias endofíticas diazotróficas promovendo incrementos após 100 dias de inoculação em MPB.

DA SILVA, A. R.¹, MARTINS, A. G.², AZEVEDO, S. V.³.

¹ Graduanda em Ciências Biológicas, Bolsista PIBIFSP, IFSP, Campus Barretos

² Técnico de Laboratório, IFSP, Campus Barretos

³ Professor EBTT, IFSP, Campus Barretos, e-mail: sergio.azevedo@ifsp.edu.br

Área de conhecimento (Tabela CNPq): 2.12.02.00-1 Microbiologia Aplicada

RESUMO: A cana-de-açúcar é uma das principais culturas do Brasil, sendo uma importante fonte renovável de alimento e energia. O fortalecimento desta cultura depende de práticas que permitam a redução do uso de fertilizantes químicos, oriundos de fontes não renováveis e importadas, com os bioinsumos se apresentando como uma alternativa viável. O desenvolvimento de novos bioinsumos é um desafio a ser perseguido pelas Instituições de Ciências e Tecnológicas (ICTs) nacionais, dentre as quais os Institutos Federais. Neste contexto, o presente projeto visou avaliar a ação dos isolados de bactérias endofíticas diazotróficas BC3, BC4, BC8 e BC9 pertencentes a coleção bacteriana da instituição, observando ganhos significativos em relação ao tamanho das raízes, peso seco das raízes e diâmetro do colmo nas mudas pré-brotadas (MPB) de cana-de-açúcar, inoculada com as estirpes BC4, BC8 e BC9, após 100 dias de plantio. Os ganhos observados estão relacionados às habilidades de fixação biológica de nitrogênio (FBN), solubilização de fosfato e produção de auxina observadas para estes três novos isolados.

PALAVRAS-CHAVE: cana-de-açúcar; bioinsumos, bactérias diazotróficas, mudas-pré-brotadas.

Development of bacterial inoculant for sugarcane

ABSTRACT: Sugarcane is one of Brazil's primary crops, serving as a significant renewable source of food and energy. The enhancement of this crop relies on practices that reduce the use of chemical fertilizers, which are derived from non-renewable and imported sources, with bioinputs emerging as a viable alternative. The development of new bioinputs presents a challenge for national Science and Technology Institutions (STIs), including Federal Institutes. In this context, the present project aimed to evaluate the effects of endophytic diazotrophic bacteria isolates BC3, BC4, BC8, and BC9, from the institution's bacterial collection, observing significant improvements in root length, root dry weight, and stalk width in pre-sprouted sugarcane seedlings inoculated with strains BC4, BC8, and BC9 after 100 days of planting. The observed improvements are related to the biological nitrogen fixation (BNF) abilities, phosphate solubilization, and auxin production exhibited by these three new isolates.

KEYWORDS: sugarcane, bioinputs, diazotrophic bacteria, pre-sprouted seedlings.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do globo, com uma área colhida de cerca de quase 10 milhões de hectares e uma produção com valores acima de 90 bilhões de reais (IBGE 2022). Trata-se de uma fonte renovável de alimento e energia que ocupa um papel estratégico para sustentabilidade do planeta que vivencia um aumento significativo de sua população, que deve saltar dos atuais 7.7 bilhões para 9.7 bilhões em 2050 (ONU, 2019).

O fortalecimento desta cultura depende de práticas que permitam a redução do uso de fertilizantes químicos, oriundos de fontes não renováveis e importadas, dos quais mais de 80% vem de países como a Rússia, Canadá, China, Marrocos e EUA (BRASIL, 2022), tornando a produção vulnerável a fatores como a taxa cambial, guerras e pandemias.

Neste cenário, os bioinsumos vem se apresentando como uma alternativa viável, especialmente por se tratar de uma tecnologia renovável, de origem vegetal, animal ou microbiana capaz de interferir positivamente no desenvolvimento das plantas (BRASIL 2022).

O desenvolvimento de novos bioinsumos, com a identificação de microrganismos benéficos com potencial de ação em grandes culturas como a cana-de-açúcar é um desafio a ser perseguido pelas Instituições de Ciências e Tecnológicas (ICTs) nacionais, dentre as quais os Institutos Federais que têm como entre as suas principais finalidades a pesquisa aplicada em atendimento às demandas da cadeia produtiva.

Neste contexto, o presente projeto visou avaliar a ação de quatro novos isolados bacterianos, pertencentes à coleção do IFSP, Câmpus Barretos, focando no desenvolvimento de inoculantes para cana-de-açúcar.

MATERIAL E MÉTODOS

- Local

O projeto foi desenvolvido nos laboratórios do IFSP, Câmpus Barretos e na biofábrica da usina TEREOS no município de Guaíra-SP.

- Bactérias testadas

Foram testados quatro isolados bacterianos, pertencentes à coleção da instituição, obtidos a partir de raízes de cana-de-açúcar: BC3, BC4, BC8 e BC9, selecionados por suas habilidades de fixação biológica de nitrogênio (FBN), solubilização de fosfato e produção de auxina (AIA).

Essas habilidades foram confirmadas novamente antes da inoculação.

- Fixação biológica de nitrogênio (FBN)

A capacidade de fixação de nitrogênio seguiu metodologia de Doberheiner *et al.* (1995), com a confirmação se dando tanto pela formação do véu quanto pela mudança da coloração indicativa de produção de amônia. De acordo com esta metodologia, a capacidade de fixação de nitrogênio é confirmada a partir de repicagens sequenciais, tendo os isolados sendo submetidos ao menos a três repicagens em meio específico sem nitrogênio.

- Produção de ácido indol acético (AIA)

A capacidade de produção de AIA seguiu a metodologia de Bric *et al.*, (1991), adaptada para o método quantitativo por Husen (2003), com a concentração de AIA estabelecida por meio de curva padrão, calculada com base em doses conhecidas do hormônio sintetizado (Sigma), e os valores de absorvância estabelecidos em 520 mm de comprimento de onda. As análises foram feitas em triplicata.

- Solubilização de fosfato

A capacidade de solubilização de fosfato foi verificada a pela formação de halos em placas de Petri contendo meio de cultura específico: 10 g.L⁻¹ de glicose; 5 g.L⁻¹ de NH₄Cl; 1 g.L⁻¹ de NaCl; 1 g.

L⁻¹ de MgSO .7H O; 0,8 g. L⁻¹ de CaHP0; 15 g. L⁻¹ de ágar; pH 7,2, incubados a 28 graus Celsius por 120 horas. O diâmetro do halo (Dh) e o diâmetro da colônia (Dc) foram estabelecidos com a utilização de um paquímetro e a razão (Dh)/(Dc) serviu para classificar a solubilização como baixa (ISF<2), média (2<ISF<3) e alta (ISF>3) de acordo com padrão estabelecido por Silva Filho e Vidor (2000). As análises foram feitas em triplicata.

- Obtenção das gemas para produção de MPB

Para avaliação da ação das bactérias no desenvolvimento de cana-de-açúcar foram utilizados rebolos (gemas) retiradas de plantas com cerca de 10 meses de idade pertencentes a variedade (CTC 9007), focando nas gemas centrais e descartando as gemas do pé e da ponta.

As gemas foram submetidas a tratamento térmico por 30 minutos a 54°C.

- Inoculação das bactérias

As bactérias foram inoculadas separadamente, com gemas sendo imersas e mantidas em solução bacteriana, com concentração de 10⁻⁷ UFC/ml, por 1 hora, e depois transferidas para bandejas de germinação contendo substrato vegetal. Foram preparadas três bandejas por tratamento.

Esta etapa seguiu o procedimento padrão adotado pela biofábrica da usina parceira. Com re-inoculação de 2 ml de uma nova solução bacteriana, com concentração de 10⁻⁷ UFC/ml, no pé das plantas, após quinze dias do plantio.

- Avaliação do desenvolvimento inicial das MPB

As bandejas foram mantidas por 100 dias, sendo cuidadas pelo pessoal da biofábrica, conforme protocolo adotado para a produção de MPB, em estufas protegidas e com água em abundância.

Com a utilização de uma régua foi estabelecido o tamanho da raiz, com o auxílio de um paquímetro foi dimensionado o diâmetro do colmo e após lavagem, para retirar vestígios de substrato, e incubação a 65°C por 72 horas, o peso seco foi determinado.

Foram utilizadas 30 plantas por tratamento, escolhidas aleatoriamente.

- Análises estatísticas

Para verificação do efeito dos tratamentos, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), para 5% de significância, seguido de teste de média Tukey, utilizando software estatístico Jamovi v. 2.3.19.0 (disponível para download em: <https://www.jamovi.org/>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados testados confirmaram as habilidades inicialmente observadas na construção da coleção bacteriana da instituição (TABELA 1). Em relação à capacidade de solubilização de fosfato, todos os isolados demonstram essa capacidade. Para a produção de auxina, os isolados BC3 e BC4 se destacaram em relação aos BC8 e BC9, com o BC4 apresentando níveis cerca de 5X superior ao menor nível observado (BC9).

TABELA 1. Análise da capacidade de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), de solubilização de fosfato e produção de auxina dos isolados testados.

Isolados	FBN	Solubilização de Fosfato (Diâmetro do Halo/Diâmetro Colônia)	Produção de AIA (ug/ml)
BC3	Sim	1,6	119,58
BC4	Sim	1,9	146,58
BC8	Sim	1,9	40,65
BC9	Sim	2,5	29,01

As gemas de cana-de-açúcar inoculadas com as bactérias de interesse apresentaram bom desenvolvimento (Figura 1), apresentando, segundo dados coletados e compartilhados pelo responsável

pela manutenção das plantas na biofábrica, tamanhos maiores do que a testemunha e tempo até alcançarem 30 cm de altura cerca de 3 dias mais cedo (dados não mostrados).

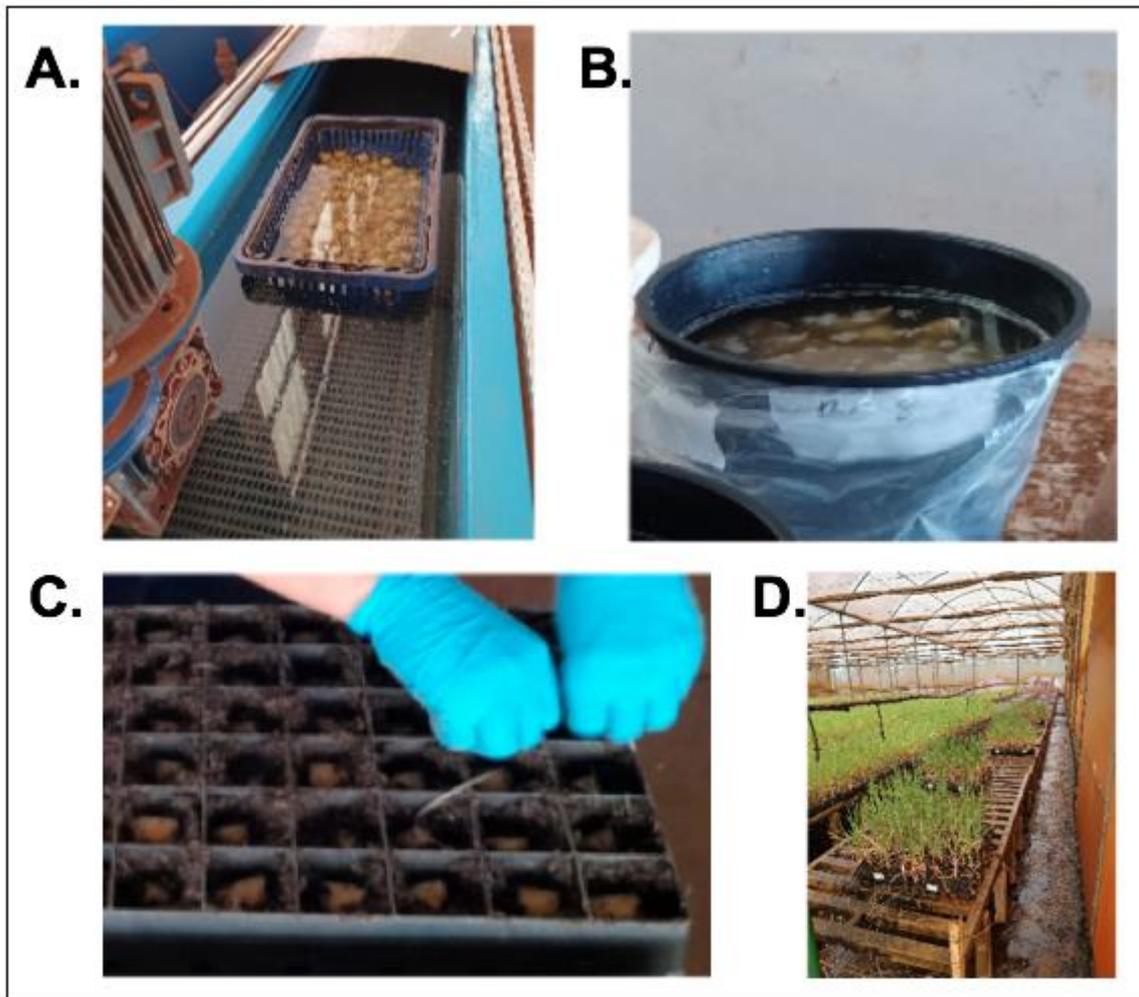


Figura 1: Etapas de tratamento térmico (A), Inoculação (B), Plantio (C) e Desenvolvimento (D) das mudas tratadas com as bactérias de interesse.

Em relação aos valores observados para o comprimento da raiz, peso seco e diâmetro do colmo após 100 dias de plantio (Figura 2), observou-se que o isolado BC4 apresentou o maior tamanho de raiz enquanto o isolado BC9 apresentou um maior peso seco. Já para o diâmetro do colmo, apenas o BC3 não apresentou ganhos significativos em relação à testemunha, tendo o isolado BC4 se destacado um pouco mais que as demais.

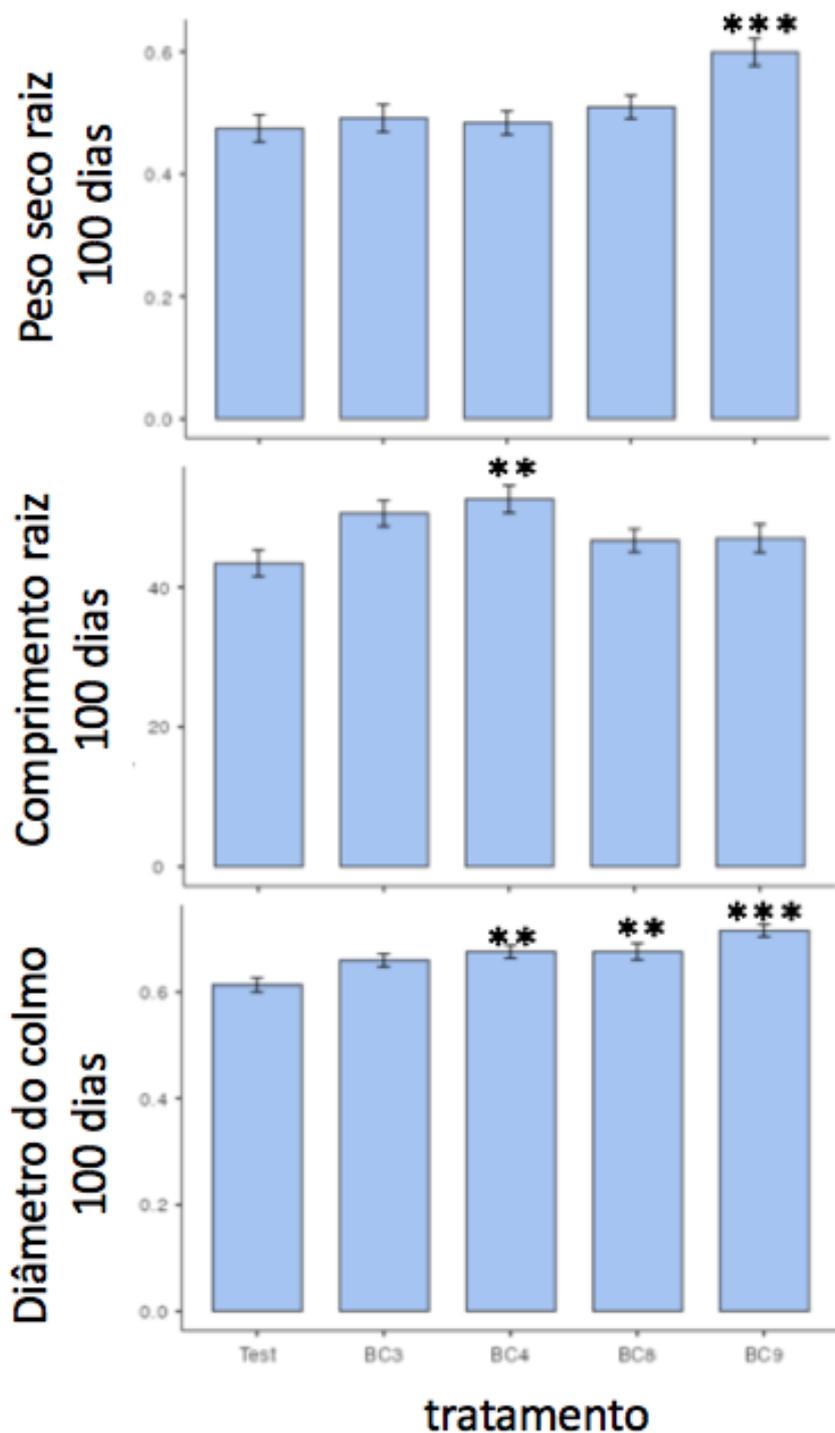


Figura 2: Resultado da comparação entre as médias para o peso seco da raiz, comprimento da raiz e diâmetro do colmo. * $p < 0.05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos na avaliação do desenvolvimento de mudas pré brotadas (MPB) de cana-de-açúcar inoculadas com os isolados BC3, BC4, BC8 e BC9 e considerando as habilidades de fixação biológica de nitrogênio (FBN), solubilização de fosfato e produção de auxinas observadas

conclui-se que as bactérias BC4, BC8 e BC9 são promotoras de crescimento e contribuem para o desenvolvimento inicial das plantas de cana-de-açúcar.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

AUTOR 1: Aluna do curso de graduação do curso de Ciências Biológicas, foi a responsável pela condução dos ensaios e coleta dos dados.

AUTOR 2: Técnico de laboratório do campus, colaborou com a aluna no preparo dos reagentes e soluções, na autoclavagem do material e no acompanhamento dos experimentos.

AUTOR 3: Professor orientador, contribuiu no acompanhamento e orientação das atividades, assim como na interpretação, discussão e apresentação dos dados.

AGRADECIMENTOS

A todos que participaram, diretamente ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho, em especial ao Caio Dassie, Líder da Biofábrica de MPB da usina Tereos, a bióloga Maysa Correa Cardoso e a agrônoma Valquíria Dias dos Anjos responsáveis pelo isolamento inicial das bactérias aqui testadas enquanto alunas do IFSP, Barretos.

Agradeço também ao IFSP pelo financiamento de bolsa de Iniciação Científica, edital PIBIFSP.

Agradeço aos colegas do grupo de pesquisa GEPEDBio pelo apoio e parceria.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Decreto no 10.991, de 11 de março de 2022. **Institui o Plano Nacional de Fertilizantes 2022–2050 e o Conselho Nacional de Fertilizantes e Nutrição de Plantas**. Disponível em: <https://in.gov.br/en/web/dou/-/decreto-n-10.991-de-11-de-marco-de-2022-385453056#:~:text=D%20E%20C%20R%20E%20T%20A%20%3A,data%20de%20publica%C3%A7%C3%A3o%20deste%20Decreto>. Acesso em: 31/01/2024.

BRIC, J.M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S.E. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 535-538, 1991. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.57.2.535-538.1991>. Acesso em: 17 ago. 2024.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: EMBRAPA, 1995.

HUSEN, E. Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities in vitro. **Indonesian Journal of Agricultural Science**, Cibirong, v.4, p. 27-31, 2003. Disponível em: <https://www.neliti.com/publications/70160/screening-of-soil-bacteria-for-plant-growth-promotion-activities-in-vitro#cite>. Acesso em: 08 ago. 2024.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (Ibge). Produção de Cana-de-açúcar. Rio de Janeiro, 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producaoagropecuaria/cana-de-acucar/br>. Acesso em: 30 jul. 2024.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Atividade de micro-organismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, p. 1495-1508, 2001.