



## CULTIVO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM VINHAÇA

Guilherme Miglioli Martins<sup>1</sup>, Guilherme Duarte Bellodí<sup>2</sup>, Kelly Caroline da Silva<sup>2</sup>, Thaís de Oliveira Iácano Ramari<sup>3</sup>, Francielli Gasparotto<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico do Curso de Agronomia, Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR, Maringá-PR. Bolsista PIBIC/CNPq-UniCesumar. [guil.miglioli@gmail.com](mailto:guil.miglioli@gmail.com)

<sup>2</sup>Acadêmicos do Curso de Agronomia, UNICESUMAR

<sup>3</sup>Coorientadora, Mestre, Professora do Curso de Agronomia, UNICESUMAR

<sup>4</sup>Orientadora, Doutora, Professora do Mestrado em Tecnologias Limpas e do Curso de Agronomia, UNICESUMAR

### RESUMO

Objetivou-se avaliar o uso da vinhaça como meio de cultivo para multiplicação de bactérias do gênero *Azospirillum*. A estirpe utilizada foi obtida através de via comercial, e a vinhaça, de uma usina da região de Maringá-Pr. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com tratamentos em arranjo fatorial (2x5), com cinco repetições. Os tratamentos foram: T0 (caldo nutriente), T1 (100% vinhaça), T2 (75% vinhaça e 25% água destilada), T3 (25% vinhaça e 75% água destilada) e T4 (50% vinhaça e 50% água destilada), sendo estes autoclavados ou não autoclavados antes da inoculação com as bactérias. Os meios foram preparados para um volume final de 50 mL. Aferiu-se a multiplicação por uso de espectrofotômetro e também mediu-se o pH dos meios. Houve multiplicação das bactérias do gênero *Azospirillum* em todos os tratamentos avaliados, sendo que uma menor multiplicação ocorreu no T3, tanto para os tratamentos autoclavados quanto para os tratamentos sem autoclavagem prévia. A multiplicação das bactérias nos meios de cultura avaliados proporcionou um aumento dos valores de pH destes meios, que passaram de um pH ácido, próximo a 5,0, para valores de pH básicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Resíduo, fixação biológica do nitrogênio, cana-de-açúcar.

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar no Brasil tem se tornado relevante nos últimos anos devido ao seu papel no desenvolvimento do setor agrícola e energético. Desde a inserção do etanol na matriz energética do país durante a crise do petróleo, a área de plantio tem aumentado substancialmente ano a ano, proporcionando cada vez mais a expansão das fronteiras agrícolas e a utilização de meios e recursos naturais renováveis (LIMA; SOUZA, 2014). Tal acréscimo é explicado pela eficiência na utilização da planta como fonte de matéria prima para a produção do etanol.

Para que a cultura da cana-de-açúcar produza satisfatoriamente é necessário o uso de alta tecnologia em equipamentos e insumos. Segundo VITTI et al. (2010) a adubação nitrogenada da cultura é baseada na utilização de adubos químicos sintéticos, que além dos altos preços causam impactos ambientais. De acordo com Oliveira et al. (2014) uma das alternativas viáveis para suprir esta dependência é o aumento da oferta de insumos biológicos de alta eficiência como a utilização de microrganismos diazotróficos, que fixam o nitrogênio atmosférico e o disponibilizam para as plantas. Assim, esta tecnologia tem potencial para auxiliar o desenvolvimento da sustentabilidade dos sistemas agrícolas por serem produzidas e atuarem com baixa demanda de energia.



Estes microrganismos têm como principal característica beneficiar o desenvolvimento vegetal por meio de mecanismos diretos, incluindo a fixação biológica do nitrogênio (FBN), ou por mecanismos indiretos como o controle biológico de fitopatógenos e insetos (BULGARELLI et al., 2013).

O processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) ocorre através da associação benéfica de bactérias diazotróficas nas zonas radiculares das plantas (CAMILO et al., 2014). A visualização mais frequente deste processo ocorre por meio da nodulação em leguminosas, onde bactérias, tais como as do gênero *Rhizobium*, realizam uma relação de infecção nas raízes contribuindo significativamente para a utilização de nitrogênio e diminuindo a utilização de adubos nitrogenados nestas culturas. Atualmente este artifício (FBN) tem sido bastante estudado em plantas não-leguminosas, como trigo e milho, culturas em que o aporte mal dimensionado de nitrogênio compromete a produtividade (FAGOTTI et al., 2012).

Uma alternativa para a inoculação da cultura da cana-de-açúcar com estes microrganismos seria sua aplicação por meio da vinhaça, subproduto que já é utilizado na fertirrigação desta cultura a fim de sanar deficiências hídricas e nutricionais. De acordo com Martins et al. (2011) são gerados 13 litros de vinhaça a cada litro de etanol produzido. O constituinte principal da vinhaça é a matéria orgânica, basicamente sob a forma de ácidos orgânicos e, em menor quantidade, encontram-se cátions como o K, Ca e Mg.

Alguns autores vêm estudando a possibilidade de utilizar a vinhaça como meio de cultura para a multiplicação de microrganismos. Ramirez et al. (2014) demonstraram que há a possibilidade de multiplicarem-se microalgas em doses de vinhaça com diferentes concentrações, chegando as doses a concentração de até 40% do total do meio. Cazetta et al. (2005) constatou que a levedura *R. mucilaginoso* se desenvolve satisfatoriamente em vinhaça bruta, isto é, não diluída.

A pesquisa de microrganismos diazotróficos adaptados ao crescimento e multiplicação no subproduto vinhaça pode resultar no desenvolvimento de um processo biotecnológico que propicie o aumento da produtividade da cana-de-açúcar e redução parcial do emprego de fertilizante nitrogenado. Porém, ainda são escassos os estudos sobre a multiplicação de bactérias diazotróficas neste subproduto, fato que evidencia a necessidade de averiguação visto o potencial desta nova tecnologia para a sustentabilidade deste sistema agrícola. Assim, o presente estudo tem por objetivo avaliar o uso da vinhaça como meio de cultivo para multiplicação de bactérias do gênero *Azospirillum*.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Fitopatologia do Unicesumar, Maringá/PR. A vinhaça utilizada foi fornecida por uma usina de açúcar e álcool localizada na região de Maringá. Foi utilizado o gênero bacteriano *Azospirillum* obtido a partir de produto comercial recomendado para inoculação de gramíneas.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com tratamentos em arranjo fatorial (2x5), com cinco repetições, totalizando 50 unidades experimentais. Os tratamentos foram compostos por meios de cultura líquidos formulados com diferentes concentrações de vinhaça, sendo: T0 (caldo nutriente), T1 (100% vinhaça), T2 (75% vinhaça e 25% água destilada), T3 (25% vinhaça e 75% água destilada) e T4 (50% vinhaça e 50% água destilada), sendo estes autoclavados e não autoclavados antes da inoculação com as bactérias. Os meios foram preparados para um



volume final de 50 mL. Para a inoculação utilizou-se a alíquota de 1 mL ( $2,0 \times 10^8$  células/ml) do inoculante comercial. Após a inoculação os recipientes foram colocados em mesa agitadora orbital (120 rpm) por um período de cinco dias, em temperatura ambiente e agitação constante.

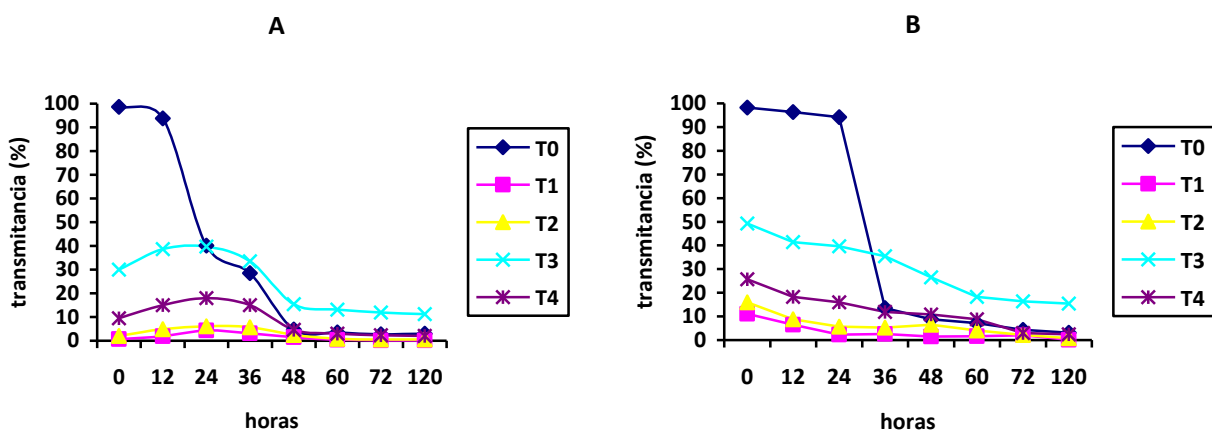
O crescimento bacteriano foi aferido por meio de espectrofotômetro, com comprimento de onda de 700nm a cada 2 h nas primeiras 24 horas após a inoculação dos meios e após esse período uma vez a cada 24 horas, totalizando oito avaliações. Foi ainda avaliado o pH de cada unidade experimental, realizando-se a leitura a cada 2 horas nas primeiras 24 horas após a inoculação dos meios e após esse período uma vez a cada 24 horas.

Para todos os tratamentos foram estabelecidas curvas de crescimento bacteriano a partir dos resultados obtidos pelo espectrofotômetro e curvas de variação do pH nos diferentes tratamentos.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A multiplicação da bactéria nos meios contendo vinhaça foi determinada de acordo com transmitância destes meios, onde quanto maior o número de bactérias no meio menor a transmitância do mesmo. De acordo com o gráfico 01 pode-se constatar que houve multiplicação das bactérias do gênero *Azospirillum* em todos os tratamentos avaliados, sendo que uma menor multiplicação ocorreu no meio constituído de 25% de vinhaça e 75% de água destilada (T3), tanto para os tratamentos autoclavados quanto para os tratamentos sem autoclavagem prévia. Este fato pode estar relacionado à menor quantidade de material orgânico e nutrientes presentes neste meio de cultivo, pois o mesmo apresenta a menor quantidade de vinhaça entre os tratamentos avaliados.

Ainda de acordo com os resultados de transmitância é possível verificar que em todos os tratamentos onde se realizou a autoclavagem dos meios antes da inoculação com as bactérias a porcentagem de luz transmitida foi menor do que em comparação com os tratamentos não autoclavados, a partir das 48 horas da inoculação. Ou seja, evidenciando uma menor densidade óptica do meio e uma maior multiplicação bacteriana.



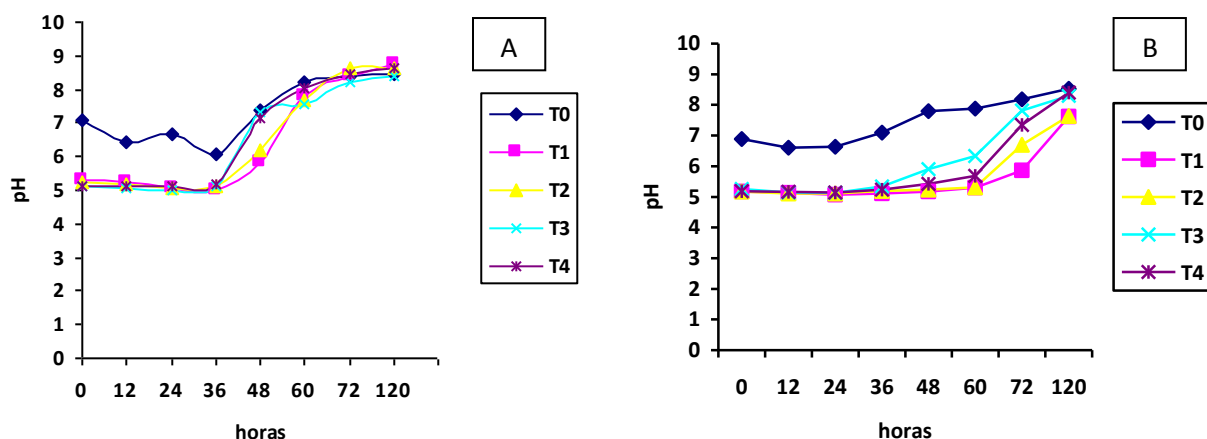
**Gráfico 01:** Variação de valores de transmitância de acordo com o teor de vinhaça em meio de cultivo para multiplicação de bactérias do gênero *Azospirillum*: A - Meios de cultivo previamente autoclavados, B - Meios de cultivo não autoclavados.

\*T0 (caldo nutriente), T1 (100% vinhaça), T2 (75% vinhaça e 25% água destilada), T3 (25% vinhaça e 75% água destilada) e T4 (50% vinhaça e 50% água destilada), sendo estes autoclavados e não autoclavados antes da inoculação com as bactérias.



Quanto ao pH, os valores mantiveram-se estáveis nas primeiras 36 horas nos tratamentos com diferentes doses de vinhaça autoclavados (T1, T2, T3 e T4), e após este período estes valores aumentaram chegando próximos ao pH 9,0, já para o tratamento padrão (T0) os valores decaíram até as 36 horas após a inoculação e após este período os mesmos aumentaram. Já para os tratamentos não autoclavados os valores mantiveram-se constantes por um tempo maior, próximo a 48 horas após a inoculação, e a partir deste período também sofreram uma elevação. Sendo que nos tratamentos T0, T3 e T4 o pH ficou entre 8,0 e 8,5, e nos tratamentos T1 e T2 os valores ficaram próximos a 7,6 (Gráfico 02).

De acordo com os resultados referentes ao pH ilustrados no gráfico 02, pode-se verificar que a multiplicação de bactérias do gênero *Azospirillum* nos meios de cultura avaliados proporcionou um aumento dos valores de pH destes meios, que passaram de um pH ácido, próximo a 5,0, para valores de pH básicos. Um dos problemas da aplicação da vinhaça em solos agrícolas é a acidificação destes solos, já que a mesma apresenta valores baixos, desta forma a multiplicação de bactérias diazotróficas neste subproduto poderia amenizar este problema, já que as mesmas proporcionam um aumento dos valores de pH.



**Gráfico 02:** Variação de valores de pH de acordo com o teor de vinhaça em meio de cultivo para multiplicação de bactérias do gênero *Azospirillum*: A - Meios de cultivo previamente autoclavados, B - Meios de cultivo não autoclavados.

\*T0 (caldo nutriente), T1 (100% vinhaça), T2 (75% vinhaça e 25% água destilada), T3 (25% vinhaça e 75% água destilada) e T4 (50% vinhaça e 50% água destilada), sendo estes autoclavados e não autoclavados antes da inoculação com as bactérias.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que é possível a utilização do subproduto vinhaça como meio de cultivo para multiplicação de bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum*, sendo esta autoclavada ou não previamente. Entre os tratamentos avaliados o que apresentou menor multiplicação destes organismos foi o T3, constituído de apenas 25% de vinhaça.

Ainda pode-se concluir que a multiplicação e colonização dos meios de cultivo avaliados pelo gênero bacteriano testado proporcionou um aumento do pH destes meios de cultivo, passando de ácido para básico.

De posse destas informações espera-se contribuir para novos estudos os quais se utilizem da vinhaça como meio de cultura para o crescimento de microrganismos, e a avaliação da ocorrência da fixação ou não de nitrogênio por estas bactérias quando



cultivadas neste subproduto. Almeja-se desta forma, adequar este tipo de condição a situações de campo as quais venham a contribuir com práticas agrícolas mais sustentáveis.

## REFERÊNCIAS

- BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; VAN THEMAAT, E. V. L.; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.64, p.807-838, 2013.
- CAMILO, B. G.; ABREU, T. C. C.; SANTOS, S. S.; MATTOS, B. B.; OLIVEIRA, C. A.; MARRIEL, I. E. Seleção de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio e Produtoras de FitoHormônios Associadas às Plantas de Milho Sob Condições de Campo. **XXX Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Anais**. Salvador – BA, 2014.
- FAGOTTI, D. S. L.; CERESINI, P.; DELAMUTA, J. R. M.; HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Diversidade de Bactérias Diazotróficas Endofíticas de Milho em Cultivos Convencional e Agroecológico. **Anais de FERTBIO**, 2012. 17 – 21 setembro. Maceió – AL. 2012.
- LIMA A., SOUZA R.R.D. Use of sugar cane vinasse as substrate for biosurfactant production using bacillus subtilis PC. **Chemical Engineering Transactions**, v.37, p.673-678. 2014. DOI: 10.3303/CET1437113
- MARTINS. M. E.; CAMPOS. D. T. S. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO SOLO FERTIRRIGADO COM VINHAÇA. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta - MT, v.9, n.2, p.273 - 282, 2011.
- OLIVEIRA, A. L. M.; COSTA, K. R.; FERREIRA, D. C.; MILANI, K. M. L.; SANTOS, O. J. A. P.; SILVA, M. B.; ZULUAGA, M. Y. A. Biodiversity of soil bacteria and its applications for a sustainable agriculture. **BBR - biochemistry and biotechnology reports**. Jan./jul., v.3, n.1, p. 56-77, 2014. DOI 10.5433/2316-5200.2014v3n1p56
- RAMIREZ. N. N. V.; FARENZENA. M.; TRIERWEILER. J.O. Growth of Microalgae Scenedesmus sp in Ethanol Vinasse. **Braz. Arch. Biol. Technol**, v.57, n.5, p. 630-635. 2014.
- VITTI, G.C.; LUZ, P.H.C. & ALTRAN, W.S. Nutrição e adubação. In: SANTOS, F.; BOREM, A.; CALDAS, C. **Cana-de-açúcar: Bioenergia, açúcar e álcool: tecnologia e perspectivas**. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, p.73-177. 2010.