



CULTIVO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM VINHAÇA

Guilherme Miglioli Martins¹, Guilherme Duarte Bellod², Thais de Oliveira Iácono Ramari³, Kelly Caroline da Silva⁴, Francielli Gasparotto⁵

RESUMO: Nos últimos anos o governo brasileiro vem incentivando práticas agrícolas sustentáveis, isto é, que reduzam o impacto ambiental ocasionado por estas atividades. Uma destas práticas é o uso de microrganismos diazotróficos como insumos biológicos. O presente estudo tem por objetivo avaliar o uso da vinhaça como meio de cultivo para multiplicação de bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Acetobacter* e *Herbaspirillum*. As estirpes utilizadas serão obtidas através de via comercial, e a vinhaça, de uma usina da região de Maringá-Pr. O experimento será realizado em delineamento experimental inteiramente casualizado, com tratamentos em arranjo fatorial (3x5), com cinco repetições totalizando 75 unidades experimentais. Os tratamentos serão compostos pelos três gêneros supracitados e 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. A quantificação dos microrganismos será obtida por uso de espectrofotômetro e pelo método de diluição em série em meio de cultivo nutriente ágar. Em todos os tratamentos serão determinadas as curvas de crescimento bacteriano. Os resultados serão submetidos a uma análise de variância e ao teste de médias Scott-Knott a 5% de significância. Espera-se com esta pesquisa verificar que se ocorre a sobrevivência e a multiplicação das bactérias estudadas no subproduto vinhaça visando a inoculação na cultura de cana-de-açúcar.

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. Estes elementos irão constituir os custos de produção da cultura, e os adubos químicos utilizados representam uma boa parcela destes valores. Entre os nutrientes exigidos pela cultura o nitrogênio é o segundo mais extraído, sendo que na cana-planta este elemento é utilizado em menores quantidades e na cana-soca são exigidas maiores doses deste nutriente (VITTI et al., 2010). Segundo os autores 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).

Muitos autores têm verificado que cultivares de cana de açúcar e outras gramíneas encontravam-se em associação com bactérias diazotróficas, evidenciando que em gramíneas o processo de fixação biológica de nitrogênio também é de grande importância sendo de fato crucial para a disponibilização do nitrogênio (BALDANI et al.; 1999). Schultz et al. (2012) demonstrou que a variedade de cana de açúcar RB867515 inoculada com

¹ Acadêmico do Curso de Agronomia do Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – PR. Bolsista PIBIC/CNPq-UniCesumar. guil.miglioli@gmail.com; ² Acadêmico do Curso de Agronomia do Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – PR; ³ Acadêmica do Curso de Mestrado em Tecnologias Limpas do Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – PR. thaisiacono@yahoo.com.br ⁴ Acadêmica do Curso de Agronomia do Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – PR. keel-caroline@hotmail.com. ⁵ Orientadora, Prof. Dra. do Curso de Agronomia do Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – PR. francielli.gasparotto@unicesumar.edu.br



bactérias diazotróficas teve um incremento de desenvolvimento e produtividade semelhante a adição de 120 kg/ha⁻¹ de fertilizante nitrogenado.

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. Santos et al. (2009) demonstrou em seus estudos que a aplicação de doses de vinhaça proporcionou aumento na população bacteriana do solo.

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. mucilaginosa* se desenvolve satisfatoriamente em vinhaça bruta, isto é, não diluída. 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, este trabalho tem por objetivo avaliar o uso da vinhaça como meio de cultivo para multiplicação de bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Acetobacter* e *Herbaspirillum*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento será realizado no Laboratório de Fitopatologia do Unicesumar, Maringá/PR. A vinhaça utilizada será fornecida por uma usina de açúcar e álcool localizada na região de Maringá. Inicialmente será realizada uma análise química para definição da composição do subproduto. Serão utilizados três gêneros bacterianos, *Azospirillum*, *Acetobacter* e *Herbaspirillum*, que serão obtidos a partir de produtos comerciais recomendados para inoculação de gramíneas.

O delineamento experimental a ser utilizado será o inteiramente casualizado (DIC) com tratamentos em arranjo fatorial (3x5), com cinco repetições, totalizando 75 unidades experimentais. Os tratamentos serão compostos pelos três gêneros bacterianos supracitados e 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). Os meios serão preparados para um volume final de 50 mL, acondicionados em erlenmeyer de 250 mL e autoclavados antes da adição das bactérias. Para a inoculação será utilizado a alíquota de 1 mL ($2,0 \times 10^8$ células/ml) de cada gênero bacteriano a partir dos inoculantes comerciais. Após a inoculação os recipientes serão colocados em mesa agitadora orbital (120 rpm) por um período de cinco dias, em temperatura ambiente e agitação constante.

O crescimento bacteriano será aferido por meio de espectrofotômetro, através de turbidimetria, com comprimento de onda de 700nm a cada 2 h a partir da inoculação dos meios, totalizando quatro avaliações. E também pelo método da diluição em série, com cinco amostragens dos tratamentos sendo a primeira realizada 24 horas após a inoculação da vinhaça e mais quatro amostragens realizadas durante o período de incubação, a cada 24 horas, utilizando-se diluições a 10^{-3} inoculadas em placa de Petri contendo o meio ágar nutriente, procedimento realizado em triplicatas para cada tratamento. As placas serão incubadas em temperatura ambiente, e a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) será realizada após 3 e 7 dias da incubação.

Para todos os tratamentos serão determinadas curvas de crescimento bacteriano a partir dos resultados obtidos pelo espectrofotômetro e pelo método de diluição seriada. Os resultados serão submetidos a uma análise de variância e ao teste de médias Scott-Knott a 5% de significância.

3 RESULTADOS ESPERADOS

Por meio desta pesquisa, espera-se verificar se ocorre sobrevivência e também multiplicação das bactérias estudadas no subproduto vinhaça. E a partir destes resultados, novos estudos deverão ser realizados com a finalidade do desenvolvimento de uma metodologia para aplicação das bactérias diazotróficas via vinhaça no campo em diferentes culturas agrícolas, visando o aumento da produtividade e a redução parcial do emprego de fertilizantes nitrogenados.

REFERÊNCIAS

BALDANI, J. I.; AZEVEDO, M. S. de; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. dos S.; OLIVARES, F. L.; GOI, S. R.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R.; FAQUIN, V.; FURTINNI, A. E.;



CARVALHO, J. G. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS; Lavras: UFLA-DCS, 1999. p. 621-666.

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.

CAZETTA, M. L.; COLABONE CELLIGOI, M. A. P. Aproveitamento do melaço e Vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa protéica e lipídica por leveduras e bactéria. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 105-112. 2005.

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.

SCHULTZ. N.; MORAIS. R. F.; SILVA. J. A.; BAPTISTA. R. B.; OLIVEIRA. R. P.; LEITE. J. M.; PEREIRA. W.; JÚNIOR. J. B. C.; ALVES. B. J. R.; BALDANI. J. I.; BODDEY. M. R.; URQUIAGA. S.; REIS. V. M. Avaliação agronômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.47, n.2, p.261-268. 2012.

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.