

## FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO ATMOSFÉRICO POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS INOCULADAS EM VINHAÇA

Guilherme Miglioli Martins<sup>1</sup>

Bárbara Maria Lustrí<sup>2</sup>

Raissa Fernanda Matias<sup>3</sup>

Francieli Gasparotto<sup>4</sup>

Reaproveitamento, Reutilização e Tratamento de  
Resíduos (sólidos e líquidos)

### Resumo

Uma prática que pode ser utilizada no setor sucroalcooleiro é a utilização da vinhaça como meio para aplicação de bactérias diazotróficas na cultura da cana-de-açúcar. Assim, objetivou-se quantificar a fixação biológica de nitrogênio atmosférico por bactérias diazotróficas cultivadas em vinhaça. A vinhaça foi obtida de uma usina da região de Maringá-PR e o gênero bacteriano empregado foi o *Azospirillum*. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com arranjo fatorial 3X5, três tempos de determinação do nitrogênio fixado (1, 3 e 5 dias) e cinco meios de cultura líquidos: T0 (caldo nutriente), T1 (100% vinhaça), T2 (75% vinhaça e 25% água), T3 (25% vinhaça e 75% água) e T4 (50% vinhaça e 50% água), ambos inoculados com 1 ml de meio líquido contendo  $2,0 \times 10^8$  células bacterianas.ml<sup>-1</sup> e com cinco repetições. A quantificação do nitrogênio fixado foi realizada através do método de digestão, destilação e titulação de Kjeldahl. Ocorreu um aumento na porcentagem de nitrogênio total inicialmente em todos os meios avaliados, mostrando que além de se multiplicar na vinhaça o gênero avaliado também fixa nitrogênio na mesma. Com destaque para os tratamentos T1 e T4. Estes resultados atestam a viabilidade da utilização da vinhaça como meio para aplicação de bactérias diazotróficas na cultura da cana

Palavras-chave: Subproduto; Sustentabilidade; Vinhoto; *Azospirillum*; Cana-de-açúcar

<sup>1</sup> Aluno do curso de graduação em Agronomia, Unicesumar – Campus Maringá, [guil.miglioli@gmail.com](mailto:guil.miglioli@gmail.com).

<sup>2</sup> Aluna do mestrado em Tecnologias Limpas, UniCesumar, [barbaramlustri@gmail.com](mailto:barbaramlustri@gmail.com).

<sup>3</sup> Aluna do mestrado em Tecnologias Limpas, UniCesumar, [raissa.feernanda@hotmail.com](mailto:raissa.feernanda@hotmail.com)

<sup>4</sup> Prof. Dra. do Mestrado em Tecnologias Limpas do UniCesumar, – Campus Maringá, Pesquisadora do Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação, [francielli.gasparotto@unicesumar.edu.br](mailto:francielli.gasparotto@unicesumar.edu.br).

## INTRODUÇÃO

O processo produtivo do etanol acarreta geração de diversos resíduos com destaque para a vinhaça, que é gerada em maior quantidade (ESPAÑA – GAMBOA et al., 2011). O principal destino dado a vinhaça é a fertirrigação dos canaviais (PRADO et al., 2013). Porém, de acordo com Fuess e Garcia (2014) sua utilização sem critérios técnicos resulta na lixiviação dos sais presentes neste resíduo, contaminação de lençóis freáticos, salinização do solo, entre outros impactos.

Buscando a sustentabilidade nos sistemas produtivos além do emprego de resíduos para suprir as necessidades nutricionais das culturas agrícolas, uma alternativa é o uso de insumos biológicos como as bactérias diazotróficas (OLIVEIRA et al., 2014). Um dos organismos que pode ser utilizado neste processo é a bactéria *Azospirillum sp.* Seu uso na cana é benéfico pois quando associada à rizosfera pode contribuir para a nutrição nitrogenada das plantas (LINO, 2018), reduzindo assim o emprego de adubos nitrogenados sintéticos que podem ocasionar impactos ambientais.

A aplicação destas bactérias em cultivos de cana-de-açúcar muitas vezes é tecnicamente difícil, porém uma alternativa seria sua aplicação juntamente com a vinhaça. Silva (2018) verificou que bactérias do gênero *Azospirillum* sobrevivem quando inoculadas em vinhaça, e que ocorre aumento do pH deste material após a inoculação. Porém, é necessário saber se estes organismos são capazes de fixar nitrogênio atmosférico neste subproduto. Assim, objetivou-se avaliar a ocorrência do processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico por bactérias diazotróficas inoculadas em vinhaça.

## METODOLOGIA

O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Unicesumar, Maringá/PR. A vinhaça foi fornecida por uma usina de açúcar e álcool da região de Maringá e o gênero bacteriano utilizado foi o *Azospirillum*, obtido de um produto comercial.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial (3X5), com cinco repetições: três tempos de determinação de nitrogênio total (1, 3

e 5 dias após a inoculação) e cinco meios de cultura líquidos: 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. Estes foram preparadas com volume final de 50 ml e utilizou-se para inoculação 1 ml de meio líquido contendo  $2,0 \times 10^8$  células bacterianas.ml<sup>-1</sup>. 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.

A quantificação do nitrogênio foi realizada por meio da determinação do nitrogênio total na amostra (NT), seguindo a metodologia de Kjeldahl, em três etapas: digestão, destilação e titulação das amostras. A partir daí o teor de nitrogênio total (NT) em cada amostra foi determinado pela equação:  $NT = [(Va - Vb) \times F \times 0,1 \times 0,014 \times 100] / P1$ , onde: NT – teor de nitrogênio total (%); Va – volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação (ml); Vb – volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação do branco (ml); F – fator de correção para o ácido clorídrico 0,01 mol/L; P1 – massa da amostra (g).

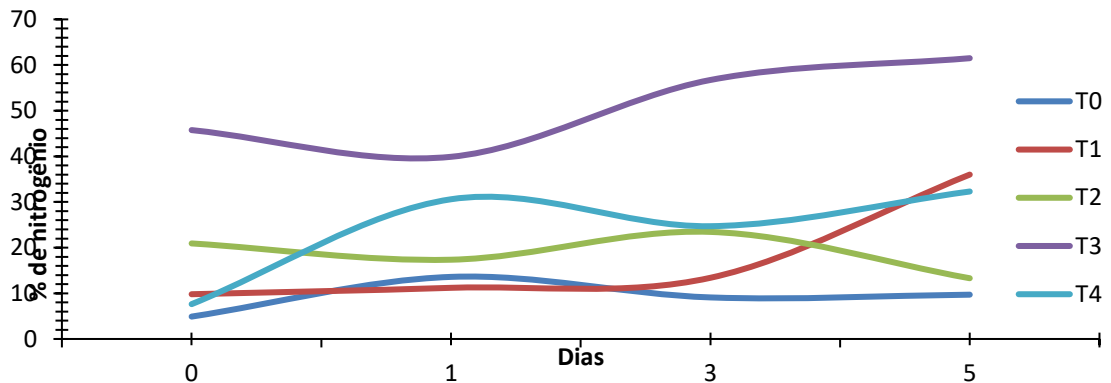
Para determinação do teor de nitrogênio atmosférico fixado (NF) em cada amostra em cada tempo de inoculação foi realizado o cálculo diminuindo do teor de nitrogênio total inicial na amostra (%) o teor de nitrogênio total final (%). Os resultados obtidos de NF foram utilizados para compor curvas do teor de nitrogênio atmosférico fixado aos 1, 3 e 5 dias após a inoculação em cada tratamento.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A primeira avaliação para quantificação do teor de nitrogênio nos meios avaliados foi realizada imediatamente antes da inoculação com a bactéria *Azospirillum* e verificou-se que todos os meios testados apresentavam nitrogênio em sua constituição (Figura 01).

Na primeira avaliação após a inoculação houve aumento no teor de nitrogênio apenas de T0, T1 e T4 (Figura 01). Já três dias após a inoculação, T1 apresentou um leve aumento do teor de nitrogênio total, passando de 11,2% para 13,4%, e a partir deste ponto houve um acúmulo exponencial deste nutriente, chegando a 36% aos cinco dias após a inoculação. É importante ressaltar que o meio que apresentou maior teor de nitrogênio no quinto dias após a inoculação foi o T3, sendo que este já apresentava maior teor deste nutriente no momento da inoculação.

O único tratamento que apresentou variação negativa no teor de nitrogênio total foi o T2, - 7,6%. Nos tratamentos T0, T1, T3 e T4 ocorreram variações positivas, com um aumento de 4,8; 26,2; 15,75 e 24,67%, respectivamente. Desta forma verifica-se que os tratamentos T1 e T4 foram os apresentaram um maior acúmulo de nitrogênio advindo provavelmente do processo de fixação biológica de nitrogênio.



**Figura 01.** Concentração de nitrogênio (%) em diferentes meios de cultivo inoculados com a bactéria *Azospirillum*.

<sup>1</sup>Tratamentos: 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 tratamentos 1 e 2 correspondem aos meios com maior porcentagem de vinhaça em sua constituição, mostrando que o subproduto disponibiliza os nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo avaliado, possivelmente devido ao alto teor de matéria orgânica presente.

Ainda são escassos trabalhos onde o subproduto vinhaça é utilizado como meio de cultivo para microrganismos, nesta linha Bonini (2016) avaliou o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* em vinhaça convencional e orgânica em diferentes concentrações, com e sem adição de nutrientes minerais e verificou maiores taxas de crescimento na vinhaça convencional. E ainda que a adição de nutrientes foi importante para aumentar a densidade final de células quando utilizada a concentração de 10% dos efluentes, mas não foi essencial para concentrações maiores.

A prática da inoculação da cultura da cana com bactérias diazotróficas já foi relatada por vários autores como viável e eficiente (OLIVEIRA et al., 2003; SCHULTZ et al., 2012), e com os resultados deste trabalho verifica-se que seria possível a aplicação destes

organismos diretamente por meio da vinhaça utilizada na fertirrigação da cana, prática que aumentaria a sustentabilidade e viabilidade deste processo.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ocorreu um aumento na porcentagem de nitrogênio total inicialmente em todos os meios avaliados, mostrando que além de se multiplicar no meio o gênero avaliado também fixa nitrogênio nestes. Havendo destaque quanto ao acúmulo de nitrogênio aos cinco dias para os tratamentos constituídos por 100 e 50% de vinhaça.

## REFERÊNCIAS

- BONINI, M. DE A. **Potencial de utilização de vinhaça como meio para o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*: aspectos toxicológicos e microbiológicos.** São Carlos: UFSCar, 2016. 88 p. Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.
- ESPAÑA – GAMBOA, E.; MIJANGOS-CORTES, J.; BARAHONA-PEREZ, L.; DOMINGUEZ-MALDONADO, J.; HERNANDEZ-ZARATE, G.; ALZATE-GAVIRIA, L. Vinasses: characterization and treatments. **Waste Management & Research**, v.29, p.1235-1250, 2011.
- FUESS, L.T.; GARCIA, M.L. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. **Journal of environmental management**, v.145, p.210-229, 2014.
- LINO, A.C.M. **Fixação biológica de nitrogênio em soqueira de cana-de-açúcar com *Azospirillum brasilense* e na compatibilidade com agroquímicos.** 2018. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.
- OLIVEIRA, W. S.; BRITO, M. E. B.; ALVES, R. A. B.; SOUZA, A. S.; SILVA, E. G. Cultivo da cana-de-açúcar sob fertirrigação com vinhaça e adubação mineral. **Revista Verde**, v. 9, n. 1, p. 01-05, 2014.
- OLIVEIRA. A. L. M.; CANUTO. E. L.; REIS. V. M.; BALDANI. J. I. Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, s.1, p.59-61, 2003.
- PRADO, R. D. M.; CAIONE, G.; CAMPOS, C. N. S. Filter Cake and Vinasse as Fertilizers Contributing to Conservation Agriculture. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2013, p. 8, 2013.
- 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 agrônômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.2, p. 261-268, 2012.
- SILVA, M. T. **Uso sustentável de vinhaça como meio de cultivo para bactérias diazotróficas.** 2018. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Limpas) - Centro de Ensino Superior de Maringá, Maringá, 2018.