

Revista
Ciência, Tecnologia & Ambiente

Compatibilidade entre a bactéria diazotrófica *Nitrospirillum amazonense* e vinhaça: alternativa para a nutrição de cana-de-açúcar

Compatibility between the diazotrophic bacteria *Nitrospirillum amazonense* and vinasse: an alternative for sugarcane nutrition

Victor Henrique Pereira^{1*} , Márcia Maria Rosa-Magri¹ 

¹Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, Araras, SP, Brasil.

*Autor para correspondência: victor.hpereira99@gmail.com

Como citar: PEREIRA, V.H.; ROSA-MAGRI, M.M., 2021. Compatibilidade entre a bactéria diazotrófica *Nitrospirillum amazonense* e vinhaça: alternativa para a nutrição de cana-de-açúcar. *Revista Ciência, Tecnologia & Ambiente*, vol. 11, e11204. <https://doi.org/10.4322/2359-6643.11204>.

RESUMO

Pesquisas do setor agrícola tem impulsionado por alternativas mais sustentáveis de produção devido aos prejuízos ambientais causados pelas técnicas convencionalmente empregadas. O uso de resíduos agroindustriais no solo, aliado à inoculação de micro-organismos benéficos, mais que potencial, tem se mostrado como alternativas viáveis para a manutenção ou incremento da produtividade vegetal. Considerando o exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a compatibilidade da bactéria *Nitrospirillum amazonense* e vinhaça, como alternativa à fertilização química. No primeiro experimento foi realizada a avaliação da capacidade da bactéria em crescer na presença de vinhaça. Concentrações de vinhaça e meio de cultura foram avaliadas (0%, 20%, 40%, 60%, 80% e 100% de vinhaça). Em um segundo experimento, o desenvolvimento inicial de mudas de cana-de-açúcar tratadas com vinhaça, bactéria e fertilizante mineral foi comparado em casa-de-vegetação por 2 meses. Os resultados obtidos mostraram que a bactéria *N. amazonense* conseguiu se desenvolver apenas nos meios de cultura com 20% ou menos de vinhaça. A substituição da adubação química convencional pela utilização de vinhaça, com inoculação de *N. amazonense*, não alterou o desenvolvimento da cana-de-açúcar após o transplante das mudas em vaso, pelo período de análise do experimento.

Palavras-chave: nutrição vegetal, fixação biológica de nitrogênio, resíduo agroindustrial, indústria sucroalcooleira.

ABSTRACT

Agricultural sector research has been looking for sustainable production alternatives due to the environmental damage caused by conventionally techniques. The use of agro-industrial residues in the soil, with the inoculation of beneficial microorganisms, more than potential, has been shown to be a viable alternative for the maintenance or increase plant productivity. The aim of this work was to evaluate the compatibility of *Nitrospirillum amazonense* and vinasse as alternatives to chemical fertilization. In the first experiment, the capacity of the bacteria to grow in the presence of vinasse was carried out. Vinasse and culture medium concentrations were evaluated (0%, 20%, 40%, 60%, 80% and 100% vinasse). In a second experiment, the initial development of sugarcane seedlings treated with vinasse, bacteria and mineral fertilizer was compared in a greenhouse for 2 months. The results obtained showed that the bacterium *N. amazonense* was able to survive and develop only in culture media with less than 20% of vinasse. The replacement



of conventional chemical fertilization using vinasse, with inoculation of *N. amazonense*, did not alter the development of sugarcane after transplanting the seedlings in pots, during the period of analysis of the experiment.

Keywords: plant nutrition, biological nitrogen fixation, agro-industrial waste, sugar and alcohol industry.

INTRODUÇÃO

A vinhaça é um resíduo produzido na indústria sucroalcooleira, durante a destilação do vinho fermentado, na produção do etanol. A quantidade de vinhaça produzida pela destilaria é grande e pode variar entre 10 e 18 litros de vinhaça por litro de etanol produzido, dependendo do teor alcoólico obtido (Baffa et al., 2009). É um material rico em matéria orgânica e minerais, como potássio, cálcio e magnésio (Rossetto, 1987; Baffa et al., 2009).

O uso de vinhaça no solo apresenta vantagens na economia de fertilizantes, por estimular a microbiota no solo e promover bons resultados em produtividade (Otto et al., 2019). Utilizando a vinhaça podemos suprir, quase por completo, a demanda nutritiva da cana-de-açúcar, e ao mesmo tempo, propiciar um solo adequado ao cultivo (Ruiz et al., 1997; Carvalho et al., 2013). A quantidade reduzida de nitrogênio em sua constituição, porém, obriga os produtores a complementarem a fertirrigação com adubos nitrogenados (Otto et al., 2019).

Uma alternativa à adubação nitrogenada é o emprego de bactérias fixadoras de nitrogênio. Esse grupo microbiano tem a capacidade de realizar a fixação biológica de nitrogênio atmosférico, reduzindo o nitrogênio em amônia, fornecendo o nutriente para as plantas (Reis et al., 2020b). A espécie diazotrófica *Nitrospirillum amazonense*, isolada de rizosfera de cana-de-açúcar, tem sido considerada de grande potencial para uso na cana-de-açúcar. Além do fornecimento de nitrogênio, esta bactéria produz fitormônios e solubiliza fosfatos, promovendo o crescimento do vegetal (Baldani et al., 1997). O emprego de bactérias em consórcio com a aplicação de vinhaça tem importante potencial biotecnológico e ambiental, devido as células bacterianas serem capazes de consumir a matéria orgânica excedente na vinhaça para o seu crescimento (Silva, 2018), e ao mesmo tempo torna o resíduo menos poluente.

Portanto a inoculação de bactérias diazotróficas em conjunto com a aplicação de vinhaça pode ser uma grande oportunidade para os produtores conseguirem ao mesmo tempo, diminuir custos e aumentar a produtividade. Além

disso, é possível obter um sistema de plantio sustentável, que preserve o meio ambiente, e proporcione lucros ao produtor. Considerando o exposto, o trabalho teve como objetivo avaliar a utilização da bactéria *Nitrospirillum amazonense* com vinhaça e seu emprego como fertilizante no desenvolvimento inicial de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar.

MATERIAL E MÉTODOS

Vinhaça

A vinhaça utilizada no estudo foi coletada na Usina São João, localizada no município de Araras, no estado de São Paulo, na safra de 2019/2020. A amostra utilizada foi obtida em uma única vez, e mantida em congelador -20°C por 3 meses antes de ser analisada e utilizada nos ensaios. A caracterização química do resíduo foi realizada utilizando o aparelho TOC-LCPN Shimadzu®, no qual foi quantificado o total de nitrogênio em solução, e carbono orgânico não purgável pela absorvância de CO₂. A análise mostrou a presença de 16,46 mg/L de carbono orgânico total e de 70,57 mg/L de nitrogênio total.

Microrganismo

A bactéria *Nitrospirillum amazonense* utilizada no experimento é da estirpe BR11145, a mesma utilizada no produto comercial Aprinza® (BASF). A linhagem foi cedida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Agrobiologia, de Seropédica/RJ. A bactéria foi recebida em suspensão em meio líquido, da qual foi repicada em placa de Petri em meio NA (Nutrient Ágar) composto por (g.L⁻¹): 1 g de extrato de carne, 2 g de extrato de levedura, 5 g de peptona, 5 g de cloreto de sódio e 20 g de ágar. A bactéria foi em seguida repicada em tubos de ensaio com meio de cultura NA inclinado e óleo mineral, e mantidas sob refrigeração a 8°C. O inóculo foi preparado em Erlenmeyer de 500 mL com 250 mL de Meio Nutritivo (MN) o qual contém em (g.L⁻¹) 1 g de extrato de carne, 2 g de extrato de levedura, 5 g de peptona bacteriológica e 5 g de cloreto de sódio. O frasco foi incubado por 24 horas a 35°C, 150 rpm.

Avaliação da Compatibilidade entre *N. Amazonense* e Vinhaça In Vitro

Para avaliar o desenvolvimento da bactéria *N. amazonense* em diferentes concentrações de vinhaça, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, considerando os seguintes tratamentos: i) 100%: 50 mL de vinhaça; ii) 80%: 40 mL de vinhaça e 10 mL de meio MN; iii) 60%: 30 mL de vinhaça e 20 mL de meio MN; iv) 40%: 20 mL de vinhaça e 30 mL de meio MN; v) 20%: 10 mL de vinhaça e 40 mL de meio MN; vi) 0%: 50 mL de meio MN. O experimento foi realizado em Erlenmeyers de 125 mL, com 50 mL da combinação do meio de cultura e/ou vinhaça. Cada tratamento foi avaliado com 4 repetições. O pH dos tratamentos foi avaliado antes da inoculação, em pHmetro de bancada. Em seguida os frascos foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Os tratamentos foram inoculados com 0,5 mL da suspensão da bactéria na concentração de 1×10^7 UFC/mL. Em seguida os frascos foram incubados a 35°C e 150 rpm. Para a avaliação de crescimento bacteriano, foi retirada uma amostra do cultivo, periodicamente, a cada 12 horas, sendo a última após 48 horas de incubação.

Para avaliação da viabilidade bacteriana, foi realizada diluição seriada decimal das amostras em solução salina (NaCl 0,85%) até diluição 10^{-4} , as quais foram plaqueadas em triplicata em meio NA. As placas então foram incubadas em estufa a 30 °C por 24 horas quando o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foi determinado utilizando-se contador de colônias de bancada. Também foi avaliado o valor de pH do meio de cultivo e/ou vinhaça em todos os tempos de amostragem. A análise foi realizada em pHmetro de bancada.

Avaliação do Crescimento das Mudanças Pré-Brotadas de Cana-de-Açúcar Inoculadas com *N. Amazonense* e/ou Vinhaça

Para a avaliação do desenvolvimento inicial de mudas pré-brotadas (MPB) de cana-de-açúcar, foi conduzido um experimento em casa-de-vegetação, do Centro de Ciências Agrárias/ UFSCar, *campus* Araras, Latitude Sul 22°18'53.7" e Longitude Oeste 47°22'49.1", entre os meses de junho a agosto de 2021. As mudas foram cultivadas em vasos de 25 L, os quais foram preenchidos com solo peneirado até a metade de sua capacidade. O solo é caracterizado como latossolo vermelho distroférrico húmico. O delineamento do experimento seguiu o sistema

inteiramente casualizado, com aleatorização sistemática da disposição dos vasos dentro da casa-de-vegetação considerando 10 vasos por tratamento.

As mudas de cana-de-açúcar utilizadas são da variedade RB966928, obtidas na empresa Mudas São José®, localizada em Santa Cruz das Palmeiras-SP. Os toletes foram plantados em 17/02/2021 e se desenvolveram em bandejas com substrato base na forma de MPB até os primeiros 4 meses de desenvolvimento. Então foram plantadas em casa-de-vegetação com irrigação diária até capacidade de campo total dos vasos, e receberam os tratamentos avaliados neste estudo.

Os tratamentos foram divididos da seguinte forma: i) Tratamento Controle (solo sem aditivos); ii) Tratamento com adição de fertilizante químico (NPK); iii) Tratamento com vinhaça e fertilizante químico (NPK); iv) Tratamento com vinhaça; v) Tratamento com inoculante de *N. amazonense*; vi) Tratamento com inoculante de *N. amazonense* multiplicado em meio 20% de vinhaça; vii) Tratamento com vinhaça e inoculação separada de *N. amazonense*. Foram utilizadas 10 plantas por tratamento.

Para o fertilizante químico (NPK) foram utilizadas as informações contidas no Boletim 100 do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) para o acúmulo de macronutrientes na cana-de-açúcar, e os dados obtidos na análise de solo, sendo a adubação (kg/ha) igual à necessidade nutritiva da planta, menos o que está presente no solo, o resultado desta subtração é multiplicado por um fator *f* de conversão, que representa o aproveitamento do fertilizante, corrigindo as perdas sofridas entre a aplicação e a absorção dos elementos pela planta (Fernandes, 2016). Para definir a quantidade de vinhaça, foi utilizada a Equação 1, substituindo os valores pelos dados obtidos na análise química do solo e da vinhaça. Como o vaso possui a forma de tronco de cone, é necessária a conversão matemática para o real valor aplicado do insumo:

Equação 1. Cálculo para a aplicação de vinhaça em vaso.

$$x(m^3) = \frac{y(m^3) \cdot \pi \cdot R^2}{10.000m^2} \quad (1)$$

Onde:

R = Raio do vaso em metros = 0,16 m;

$y = 80 \text{ m}^3$, valor mínimo para evitar saturação (Oliveira et al., 2009);

x = Resultado para aplicação de vinhaça nos vasos.

O meio para o cultivo do inoculante foi decidido após o experimento de cultivo da bactéria em vinhaça, descrito no item “Avaliação da Compatibilidade entre *N. Amazonense* e Vinhaça *In Vitro*”. As doses para aplicação nas plantas foram definidas segundo os parâmetros propostos pela RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola). O produto de inoculação deve fornecer de 600.000 a 1.200.000 células por material propagativo da planta, sendo este valor estipulado em 10^9 UFC por g ou mL de produto. O cálculo foi realizado de acordo com a Equação 2.

Equação 2. Cálculo da dosagem do inoculante a ser aplicado nos tratamentos.

$$\text{Bactérias por muda} = \left(\frac{\text{Concentração do Inoculante } x}{\text{Dosagem}} \right) / 350.000 \quad (2)$$

Onde:

350.000 = constante que minimiza as perdas que possam vir a acontecer pela mortalidade de células durante a aplicação do produto;

Bactérias por Semente = 1.200.000;

Concentração do Inoculante = contagem de UFC.mL⁻¹.

No momento de aplicação dos tratamentos, as mudas de cana-de-açúcar apresentavam 4 meses de idade (tempo desde o plantio). Após os tratamentos, as mudas permaneceram em casa-de-vegetação por 2 meses, totalizando 182 dias após plantio. As análises agrônomicas realizadas nas plantas tiveram como objetivo a análise do colmo (região de maior interesse para a produtividade da cultura). Para a avaliação foram destacadas as folhas e retiradas as raízes. As análises foram realizadas quanto a massa de matéria fresca, a massa de matéria seca (colmo seco em estufa a 70 °C por 48 horas, esfriado em dessecador e pesado), densidade do colmo (relação entre a massa seca e seu volume, obtido pelo deslocamento de água em pipeta graduada (Azzini et al., 1986), diâmetro do colmo (relação entre circunferência do colmo e π), comprimento do colmo (medida da base do broto até folha +1 (sistema de Kujiper para numeração das folhas)) e contagem de folhas verdes (Marafon, 2012). Os dados obtidos no trabalho foram avaliados no software R®, com

análise de variância (ANOVA), e teste de Tukey a nível de 5% de significância, para comparação das médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Compatibilidade entre *N. Amazonense* e Vinhaça *In Vitro*

O uso da vinhaça não permitiu o desenvolvimento da bactéria, causando até mesmo a morte das células inoculadas, em concentrações superiores a 20%. Foi possível observar crescimento bacteriano apenas nos tratamentos de 20% e 0% de vinhaça (Figura 1). O emprego de vinhaça como fonte nutricional para o desenvolvimento microbiano é assunto bastante estudado, com resultados variados quanto a resistência e capacidade de crescimento microbiano em diferentes espécies (Sydney et al., 2014; Sydney et al., 2018; Quintero-Dallos et al., 2019; Reis et al., 2020a). Aparicio et al. (2017) avaliaram a capacidade de espécies de actinomicetos em se desenvolver em soluções com diferentes concentrações de vinhaça. Os autores observaram que 20% foi a concentração que proporcionou maior produção de biomassa microbiana.

O crescimento da bactéria em meio com 20% de vinhaça foi mais lento, sendo que em 48 horas a bactéria ainda se encontra na fase logarítmica (Figura 1). Para o tratamento com 0% de vinhaça, porém, é possível observar que a fase logarítmica alcança seu final após 12 horas de incubação, a fase estacionária após 36 horas, e na última amostragem é possível observar a cultura em fase de declínio (Figura 1).

Os resultados observados para as diferentes curvas de crescimento podem ser explicados considerando que a ausência da vinhaça proporciona condições ótimas para crescimento da bactéria, e desta forma, o micro-

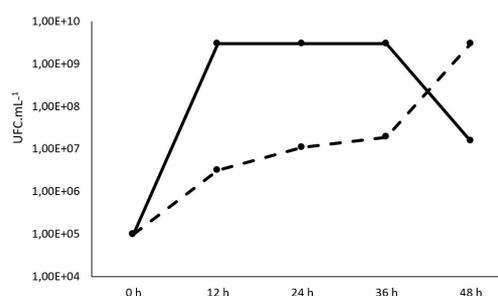


Figura 1. Curva de crescimento da bactéria *N. amazonense* em meio com 20% (linha tracejada) e 0% (linha contínua) de vinhaça.

organismo alcança ótima taxa de multiplicação, esgotando as fontes de nutriente do meio rapidamente, e obtendo crescimento máximo (fim da fase log) após 12 horas de incubação. Na presença de 20% de vinhaça, por sua vez, a presença de ácidos orgânicos e outros compostos inibidores no meio, oriundos da vinhaça, promovem uma curva de crescimento com menor inclinação, com taxa de multiplicação lenta, mantendo-se na fase log mesmo após 48 horas de incubação.

A bactéria *N. amazonense* é preferencialmente microaerófila, o que favorece a fixação biológica de nitrogênio, ainda que possa se proliferar em condições aeróbias (Moreira et al., 2010). Este mecanismo diazotrófico é prejudicado ao utilizar vinhaça como meio de cultivo líquido, uma vez que o resíduo possui alta concentração de material orgânico, além de outros elementos dissolvidos ou em suspensão, que também confere a turbidez do meio. Essa característica prejudica a dissolução no meio de O₂ e N₂ a partir da atmosfera, o que torna o meio um ambiente pobre em nitrogênio dissolvido (ND). A baixa taxa de ND força a bactéria a utilizar seu metabolismo heterotrófico, apesar de poucos substratos serem prontamente assimiláveis nos componentes da vinhaça (Bonini, 2012).

A vinhaça *in natura* (não estéril) possui uma comunidade microbiana natural, que atua sobre as moléculas mais complexas e recalcitrantes do resíduo, liberando moléculas mais simples e assimiláveis para serem utilizadas pela *N. amazonense* como fonte de energia. Esse fato torna a vinhaça estéril um ambiente de difícil desenvolvimento, considerando as fontes de energia disponíveis. No tratamento com menor concentração de vinhaça (20%), tem-se mais ND no meio, e maior concentração de moléculas orgânicas de cadeia curta e de fácil assimilação, oriundas do meio MN, o que possibilitou o crescimento da bactéria (Figura 1).

Os resultados obtidos nas análises de pH mostraram que para a vinhaça são baixos, com valores médios abaixo de 5,0. Os valores de pH nos diferentes tratamentos podem ser observados na Figura 2. É possível notar que o pH inicial dos tratamentos com vinhaça possuem valores que variam de 4,15 (100% de vinhaça) até 4,89 (20% de vinhaça). A bactéria *N. amazonense* é relatada na literatura como sendo tolerante a valores de pH baixo

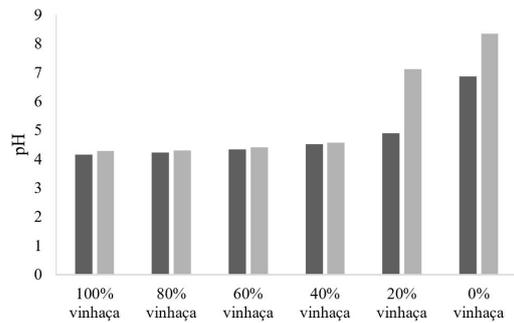


Figura 2. Valores de pH dos meios nos diferentes tratamentos, no início (cinza escuro) e no final (cinza claro) do experimento (após 48 horas de cultivo).

(Baldani et al., 1997). Magalhães et al. (1983) isolaram a espécie a partir de amostras de gramíneas forrageiras, dos estados do Amazonas e Rio de Janeiro, cultivadas em solos de pH ácido. A espécie, porém, possui crescimento ótimo na faixa de 6,0 a 6,2 (Pereira, 2011). Os valores de pH nos tratamentos em que houve desenvolvimento da bactéria (20% e 0% vinhaça) aumentou após o período de incubação (Figura 2). Este fato tem relação com o metabolismo diazotrófico do microrganismo, que reduz o nitrogênio atmosférico para NH₃, principal responsável por alcalinizar o meio de cultivo (Bonini, 2012).

Efeito da Aplicação de N. Amazonense e/ou Vinhaça no Desenvolvimento Inicial de Cana-de-Açúcar (MPB)

Os resultados observados no segundo experimento de desenvolvimento vegetal em casa de vegetação mostraram que não houve diferença estatística entre os tratamentos para as variáveis número de folhas, circunferência de colmo, massa fresca, massa seca e densidade do colmo (Tabela 1).

Para a variável comprimento de colmo foi possível observar um desenvolvimento estatisticamente inferior no tratamento com aplicação de NPK e vinhaça. Resultado semelhante também foi observado por Oliveira et al. (2014). Os autores observaram que a adição de vinhaça na adubação com NPK provocou a queda na produtividade da cana-de-açúcar. A justificativa dos autores foi de que a maior disponibilidade de nutrientes para a cultura atrasa o desenvolvimento inicial da planta, devido a dificuldade em exportar os nutrientes na solução do solo saturada, consequentemente afetando e adiando seu processo de maturação. Santos et al. (2018) avaliando a aplicação das

Tabela 1. Análise estatística e valores médios dos dados agronômicos obtidos das plantas de cana-de-açúcar.

Análise de variância	n° folhas verdes	Colmo				
		Comprimento (cm)	Diâmetro (cm)	massa fresca (g)	massa seca (g)	densidade (g.L ⁻¹)
GL resíduo	49	49	49	49	49	49
F	0,85	2,91*	0,91	1,04	2,28	1,72
Média geral	8,25	20,19	4,06	13,61	1,99	824,76
Desvio-padrão	0,70	2,28	0,41	3,54	0,51	142,50
DMS (5%)	1,08	3,50	0,64	5,44	0,78	219,05
CV (%)	8,48	11,29	10,20	25,98	25,38	17,28
controle	8,38 a	21,09 a	4,05 a	14,50 a	2,20 a	810,35 a
NPK	8,13 a	19,30 ab	4,19 a	12,66 a	1,78 a	838,54 a
NPK e vinhaça	7,88 a	17,41 b	3,89 a	11,21 a	1,48 a	693,44 a
vinhaça	8,50 a	20,88 ab	4,10 a	14,10 a	2,07 a	819,89 a
bactéria	8,50 a	21,03 a	4,14 a	14,13 a	2,04 a	839,23 a
bactéria na vinhaça	8,13 a	20,58 ab	3,85 a	14,92 a	2,23 a	905,56 a
bactéria e vinhaça	8,13 a	21,03 a	4,20 a	13,78 a	2,14 a	866,30 a

*Nível de significância: 5%. GL: graus de liberdade; DMS: diferença mínima significativa; CV: coeficiente de variação. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos ao nível de 5%.

bactérias *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* e resíduos sucroalcooleiros (torta de filtro e vinhaça) observaram que o tratamento que conciliava o emprego de vinhaça com fertilizantes químicos foi o que apresentou os menores resultados de produção vegetal, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

Não foi observada diferença estatística para a variável número de folhas verdes. Uma folha verde foi considerada como sendo aquela que aplica resistência mínima quando puxada externamente ao colmo. A quantidade de folhas verdes está relacionada diretamente ao perfilhamento da planta, o que representa um maior índice de área foliar (IAF), que está relacionado à produtividade final da cana, não podendo ser excessivamente grande ou pequeno. Estima-se que um IAF igual a quatro seja ideal para captação de 95% dos raios solares, o que corresponde a cerca de oito folhas dispostas alternadamente pelo colmo (Oliveira et al., 2007). Este foi aproximadamente o valor médio encontrado em todos os tratamentos.

Tanto o diâmetro quanto o comprimento do colmo são variáveis que afetam a totalidade de açúcar retirado do campo após cada ciclo de cultivo. Além do fator nutricional, estas variáveis estão relacionadas à genética das plantas (Ferreira et al., 2007). Para a variável diâmetro de colmo não foi possível verificar diferença estatística entre os tratamentos. Isto pode ser explicado devido ao curto período que as plantas permaneceram

sob cultivo. Apesar disso, esta variável apresenta baixa variabilidade, fato também relatado por outros autores (Morais et al., 2017).

Apesar da falta de nitrogênio na composição da vinhaça, o tratamento que recebeu apenas vinhaça não demonstrou prejuízo em seu desenvolvimento. Isto se deve pela fertilidade do solo utilizado no ensaio, o que é corroborado pelo valor de densidade encontrado no tratamento controle (solo sem tratamento) e sobre o tratamento que recebeu apenas a inoculação de bactérias. Schultz et al. (2014) observaram que as respostas das plantas de cana-de-açúcar à inoculação por diazotróficas podem diferir entre as variedades; os autores estudaram as variedades RB72454 e RB867515 e notaram que a segunda não apresentou diferença entre os tratamentos inoculados e não inoculados, nos parâmetros de desenvolvimento vegetal e teor de nitrogênio nas plantas. Os resultados não diferiram nem mesmo do tratamento controle (sem nenhum tratamento). Reis et al. (2020b) avaliaram a inoculação de diazotróficas em canavial, e observaram que as respostas do tratamento nas plantas ocorreram apenas 90 dias após o tratamento. Análises realizadas aos 60 dias após o plantio não apresentaram diferenças nos diferentes tratamentos, nem mesmo do controle. É importante ressaltar que no trabalho de Reis et al. (2020b) não houve a aplicação de vinhaça. De qualquer forma, provavelmente, é necessário um período para o

estabelecimento da relação entre a planta e a bactéria para que seja possível observar benefícios da inoculação no desenvolvimento vegetal.

Assim como para os demais parâmetros, os tratamentos que receberam a vinhaça e a inoculação da bactéria não apresentaram diferença estatística para densidade do colmo. Este resultado mostra que a aplicação separada do inoculante e vinhaça, ou do uso da vinhaça estéril como veículo do inoculante não altera o resultado do processo. É válido, porém, ressaltar que a aplicação separada demanda menor mão-de-obra, devido à dificuldade em esterilização de vinhaça em altas quantidades e no crescimento da bactéria *N. amazonense* na vinhaça *in natura*.

CONCLUSÃO

A bactéria *Nitrospirillum amazonense* não permanece viável na presença de concentrações superiores a 20% de vinhaça em meio de cultivo. A aplicação de vinhaça em conjunto com a inoculação da bactéria *Nitrospirillum amazonense* não apresentou prejuízo no desenvolvimento da cana-de-açúcar. Os resultados não apresentaram diferença estatística com o tratamento controle e com o tratamento com emprego de fertilizantes químicos, provavelmente devido o curto período de cultivo da cana-de-açúcar. O uso de vinhaça e fertilizante químico (NPK) causou prejuízo no desenvolvimento vegetal, sendo observado com maior evidência na variável comprimento do colmo.

REFERÊNCIAS

APARICIO, J.D., BENIMELI, C.S., ALMEIDA, C.A., POLTI, M.A. & COLIN, V.L., 2017. Integral use of sugarcane vinasse for biomass production of actinobacteria: potential application in soil remediation. *Chemosphere*, vol. 181, no. 1, pp. 478-484. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.107>. PMID:28460294.

AZZINI, A., ZULLO, M.A.T., ARRUDA, M.C.Q., BASTOS, C.R. & COSTA, A.A., 1986. Densidade básica do colmo e sua correlação com os valores de brix e pol em cana-de-açúcar. *Bragantia*, vol. 45, no. 1, pp. 155-160. <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87051986000100014>.

BAFFA, D.C.F., FREITAS, R.G. & BRASIL, R.P.C., 2009. O uso da vinhaça na cultura da cana-de-açúcar. *The Nucleus*, no. 1, pp. 1-16.

BALDANI, J., CARUSO, L., BALDANI, V.L.D., GOI, S.R. & DÖBEREINER, J., 1997. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology & Biochemistry*, vol. 29, no. 5-6, pp. 911-922. [http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00218-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00218-0).

BONINI, M.A., 2012. *Cultivo heterotrófico de Aphanothece microscopica Nägeli e Chlorella vulgaris em diferentes fontes de carbono e em vinhaça*. Araras: Universidade Federal de São Carlos. 112 p. Tese de Mestrado em Agricultura e Ambiente.

CARVALHO, J.M., ANDREOTTI, M., BUZZETTI, S. & CARVALHO, M.P., 2013. Produtividade de cana soca sem queima em função do uso de gesso e vinhaça. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, vol. 43, no. 1, pp. 1-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S1983-40632013000100001>.

FERNANDES, F., 2016. *Nutrição e adubação de cana-de-açúcar*. Ilha Solteira: Unesp. 75 p. Tese de Doutorado em Agronomia.

FERREIRA, F.M., BARROS, W.S., SILVA, F.L., BARBOSA, M.H.P., CRUZ, C.D. & BASTOS, I.T., 2007. Relações fenotípicas e genotípicas entre componentes de produção em cana-de-açúcar. *Bragantia*, vol. 66, no. 4, pp. 605-610. <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052007000400010>.

MAGALHÃES, F.M.M., BALDANI, J.I., SOUTO, S.M., KUYKENDALL, J.R. & DÖBEREINER, J., 1983. A new acid-tolerant Azospirillum species. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, vol. 55, no. 4, pp. 417-429.

MARAFON, A.C., 2012 [acesso em 15 novembro 2021]. Análise quantitativa de crescimento em cana-de-açúcar: uma introdução ao procedimento prático. Embrapa Tabuleiros Costeiros [online], no. 168. 31 p. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/944871>.

MORAIS, K.P., MEDEIROS, S.L.P., SILVA, S.D.A., BIONDO, J.C., BOELTER, J.H. & DIAS, F.S., 2017. Produtividade de colmos em clones de cana-de-açúcar. *Revista Ceres*, vol. 64, no. 3, pp. 291-297. <http://dx.doi.org/10.1590/0034-737x201764030010>.

MOREIRA, F.M.S., SILVA, K., NÓBREGA, R.S.A. & CARVALHO, F., 2010. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, vol. 1, no. 2, pp. 74.

OLIVEIRA, E.L., ANDRADE, L.A.B., FARIA, M.A. & CUSTÓDIO, T.N., 2009. Vinhaça de alambique e nitrogênio na cana-de-açúcar, em ambiente irrigado e

- não irrigado. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, vol. 13, no. 6, pp. 694-699. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662009000600005>.
- OLIVEIRA, R.A., DAROS, E., ZAMBON, J.L.C., WEBER, H., IDO, O.T., FILHO, J.C.B., RIBAS, K.C.Z. & SILVA, D.K., 2007. Área foliar em três cultivares de cana-de-açúcar e sua correlação com a produção de biomassa. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, vol. 37, no. 2, pp. 71-76.
- OLIVEIRA, W.S.; BRITO, M.E.B.; ALVES, R.A.B.; SOUZA, A.S. & SILVA, E.G., 2014. Cultivo da cana-de-açúcar sob fertirrigação com vinhaça e adubação mineral. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, vol. 9, no. 1, pp. 1-5.
- OTTO, R., ALTARUGIO, L.M. & SANCHES, G.M., 2019. Atualizações sobre exigências nutricionais da cana-de-açúcar para fins de manejo e adubação. *Informações Agrônomicas*, vol. 1, no. 3, pp. 1-10.
- PEREIRA, W., 2011. *Produtividade e qualidade tecnológica da cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas*. Seropédica: Universidade Rural do Rio de Janeiro. 70 p. Tese de Mestrado em Ciências.
- QUINTERO-DALLOS, V., GARCÍA-MARTÍNEZ, J.B., CONTRERAS-ROPERO, J.E., BARAJAS-SOLANO, A.F., BARAJAS-FERRERIRA, C., LAVECCHIA, R. & ZUORRO, A., 2019. Vinasse as a sustainable medium for the production of *Chlorella vulgaris* UTEX 1803. *Water*, vol. 11, no. 8, pp. 1526. <http://dx.doi.org/10.3390/w11081526>.
- REIS, C. R., CARVALHO, A.K.F., BENTO, H.B.S., ALVES, T.M. & CASTRO, H.F., 2020a. Lowering the inhibition of sugarcane vinasse as a culture medium for oleaginous fungi through oxidative pre-treatment aiming at the degradation of toxic compounds. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 95, no. 11, pp. 2943-2950. <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.6454>.
- REIS, V.M., RIOS, F.A., BRAZ, G.B.P., CONSTANTIN, J., HIRATA, E.S. & BIFFE, D.F., 2020b. Performance agrônômica da cana-de-açúcar submetida à inoculação de *Nitrospirillum amazonense* (BR11145). *Revista Caatinga*, vol. 33, no. 4, pp. 918-926. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252020v33n406rc>.
- ROSSETTO, A.J., 1987. Utilização agrônômica dos subprodutos e resíduos da indústria açucareira e alcooleira. In: S.B. PARANHOS, org. *Cana-de-açúcar: cultivo e utilização*. Campinha: Fundação Cargill, vol. 2, pp. 435-504.
- RUIZ, H.A., GHEYI, H.R., ALMEIDA, M.T. & RIBEIRO, A.C., 1997. Torta de filtro e vinhaça na recuperação de um solo salino-sódico e no desenvolvimento de arroz irrigado. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, vol. 21, no. 4, pp. 659-665. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06831997000400017>.
- SANTOS, R.M., KANDASAMY, S. & RIGOBELLO, E.C., 2018. Sugarcane growth and nutrition levels are differentially affected by the application of PGPR and cane waste. *MicrobiologyOpen*, vol. 7, no. 6, pp. e00617. <http://dx.doi.org/10.1002/mbo3.617>. PMID:29653035.
- SCHULTZ, N., SILVA, J.A., SOUSA, J.S., MONTEIRO, R.C., OLIVEIRA, R.P., CHAVES, V.A., PEREIRA, W., SILVA, M.F., BALDANI, J.I., BODDEY, R.M., REIS, M. & URQUIAGA, S., 2014. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, vol. 38, no. 2, pp. 407-414. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832014000200005>.
- SILVA, M.T., 2018. Inoculação de vinhaça com bactéria diazotrófica – uma prática sustentável. In: *Anais do XV Congresso Nacional do Meio Ambiente de Poços de Caldas*, 2018. Minas Gerais: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia. p. 5.
- SYDNEY, E.B., LARROCHE, C., NOVAK, A.C., NOUAILLE, R., SARMA, S.J., BRAR, S.K., LETTI, L.A.J., SOCCOL, V.T. & SOCCOL, C.R., 2014. Economic process to produce biohydrogen and volatile fatty acids by a mixed culture using vinasse from sugarcane ethanol industry as nutrient source. *Bioresource Technology*, vol. 159, no. 1, pp. 380-386. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.042>. PMID:24675397.
- SYDNEY, E.B., NOVAK, A.C., ROSA, D., MEDEIROS, A.B.P., BRAR, S.K., LARROCHE, C. & SOCCOL, C.R., 2018. Screening and bioprospecting of anaerobic consortia for biohydrogen and volatile fatty acid production in a vinasse based medium through dark fermentation. *Process Biochemistry*, vol. 67, no. 1, pp. 1-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.012>.