

VIABILIDADE DO *Bacillus subtilis* NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE VINHAÇA.

VICTOR H.HERNANDEZ¹, LUCAS F. DE ARAÚJO², FELIPE BATISTELLA FILHO³,
CAROLINE PIGATTO DE NARDI⁴

¹ Graduando em Tecnologia em Biocombustíveis, PIVICT, IFSP, Câmpus Matão, victor.hernandez27@gmail.com

² Graduando em Tecnologia em Biocombustíveis, PIVICT, IFSP, Câmpus Matão, lucas.araujo1507@gmail.com

³ Docente, IFSP, Câmpus Matão, batistella@ifsp.edu.br

⁴ Docente orientador, IFSP, Câmpus Matão, carolinepigatto@ifsp.edu.br

Apresentado no

9º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP ou no 3º Congresso de Pós-Graduação do IFSP

11 13 de dezembro de 2018 - Boituva-SP, Brasil

RESUMO: Os nematoides causam graves prejuízos na plantação de cana. Uma forma prevista para o controle dessa doença seria a presença do *Bacillus subtilis*, que funcionaria como um defensor contra o ataque dos parasitos. Para viabilizar o uso do *Bacillus* como controle biológico, em solos de regiões que utilizam vinhaça como adubo, estudos preliminares para conhecer qual é a concentração de vinhaça que o *Bacillus subtilis* suporta são necessários. Assim, este estudo tem como objetivo inocular esta bactéria em caldo de vinhaça pura e em diferentes concentrações e testar o tempo de sobrevivência do micro-organismo nessas condições. Foram trabalhados oito sistemas com três repetições envolvendo vinhaça tamponada, sem tampão, com e sem controle de pH. 10⁸ UFC/mL de *Bacillus subtilis* foi inoculada em cada sistema e, por meio da contagem de micro-organismos em câmara de Neubauer foi possível observar a viabilidade até o décimo dia. Após o período de cinco dias ocorreu uma significativa queda na população em todos os sistemas. A vinhaça pura pode ser utilizada sem prejuízo a bactéria até o quinto dia. Estes dados sugerem que o micro-organismo estudado sobrevive por tempo suficiente e pode ser veiculado na plantação sendo inoculado na vinhaça.

PALAVRAS-CHAVE: controle biológico; combate a nematoides, microbiologia.

VIABILITY OF *Bacillus subtilis* IN THE PRESENCE OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF VINASSE.

ABSTRACT: The nematodes cause serious damage to the cane plantation. One way to control this disease would be the presence of *Bacillus subtilis*, which would act as a defense against the attack of the parasites. In order to make feasible the use of *Bacillus* as a biological control in soils of regions that use vinasse as fertilizer, preliminary studies to know the concentration of vinasse that *Bacillus subtilis* supports are necessary. Thus, this study aims to inoculate this bacterium in pure vinasse broth and in different concentrations and to test the survival time of the microorganism under these conditions. Eight systems with three replicates involving buffered vinasse, without buffer, with and without pH control were worked. 10⁸ UFC/mL of *Bacillus subtilis* was inoculated in each system and, through the counting of microorganisms in the Neubauer chamber, it was possible to observe the viability until the tenth day. After the five day period there was a significant drop in population across all systems. The pure vinasse can be used without prejudice to the bacteria until the fifth day. These data suggest that the studied microorganism survives long enough and can be carried in the plantation being inoculated in the vinasse.

KEYWORDS: biological control; nematode fighting, microbiology.

INTRODUÇÃO

Os nematoides são vermes que parasitam plantações de cana, apresentam corpo cilíndrico, geralmente são alongados e as suas extremidades são afiladas (SANTIAGO; ROSSETTO, 2016b). Os micro-organismos da rizosfera, também conhecidos como rizobactérias, têm colaborado para evitar o ataque de patógenos ao solo e nas plantas. Algumas espécies de micro-organismos são capazes de proteger substancialmente as plantas contra os nematoides. Isolados de *Bacillus* já foram observados

em várias espécies de plantas e existem inúmeros relatos de sua habilidade no controle de doenças. (ARAUJO, 2015).

Muitos solos no Brasil que são parasitados por nematoides são, também, adubados com caldo de vinhaça que é um subproduto da fermentação da cana. A vinhaça é um resíduo gerado no processo de fabricação de álcool. Para cada litro de etanol são produzidos por volta de 13 litros de vinhaça, com diferentes concentrações de potássio, de acordo com o mosto (SANTIAGO; ROSSETTO, 2016a).

Com base nas informações supracitadas, este trabalho tem como objetivo, cultivar o *Bacillus subtilis* e colocá-lo em diferentes concentrações de vinhaça para determinar a viabilidade do micro-organismo neste ambiente. Este é um trabalho preliminar que visa à utilização de cepas de *Bacillus subtilis* no controle biológico de parasitos da cana.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo do *Bacillus subtilis* e do Pé de Cuba

Foram preparadas cultura de *Bacillus subtilis* em ágar nutriente. Cultura contendo cinco mL do caldo nutriente, cinco mL de vinhaça e *Bacillus subtilis* em contagem 10^8 UFC/mL foram utilizadas. Esta solução chamada de pé de cuba, foi realizada para que o micro-organismo tivesse o período de adaptação ao meio contendo vinhaça. Foram preparados oito pés-de-cuba, um para cada erlenmeyer teste. A preparação do *B. subtilis* para o pé de cuba foi realizada utilizando a semeadura por esgotamento do micro-organismo em placa contendo ágar nutriente, incubada a 37°C por 24hs. Foram obtidas em alça de platina uma quantidade de bactérias que corresponde a uma cabeça de fósforo que foi adicionado aos pés de cuba que permaneceram 24hs a 37°C. Após este período foi realizada a contagem de células microbianas por meio de contagem em câmara de Neubauer (FERNANDES; VIEIRA, 2012), a contagem atingiu 10^8 UFC/mL.

Montagem do Sistema de Análise da Viabilidade do *Bacillus subtilis* em vinhaça

Todos os sistemas foram autoclavados, para evitar contaminação. Após este procedimento 10^8 UFC/mL de *Bacillus subtilis* foram mantidos nos erlenmeyers com os oito sistemas detalhados a seguir e mantidos a 37°C durante 10 dias. Os sistemas foram montados e distribuídos da seguinte forma:

- 100 mL de vinhaça com pH ajustado, com solução tampão.
- 100 mL de vinhaça com pH ajustado, sem solução tampão.
- 100 mL de vinhaça sem ajuste de pH, com solução tampão.
- 100 mL de vinhaça sem ajuste de pH, sem solução tampão.
- 20 mL de H₂O e 80 mL de vinhaça com ajuste de pH, com solução tampão.
- 20 mL de H₂O e 80 mL de vinhaça com ajuste de pH, sem solução tampão.
- 30 mL de H₂O e 70 mL de vinhaça com ajuste de pH, com solução tampão.
- 30 mL de H₂O e 70 mL de vinhaça com ajuste de pH, sem solução tampão.

Para melhor desenvolvimento do micro-organismo, as amostras foram mantidas em estufa BOD a 37°C. Os oito erlenmeyers foram trabalhados em três repetições. Todos os dias foi realizada análise da viabilidade do *B. subtilis* por meio de contagem em câmara de Neubauer. Diariamente foi realizada a verificação do pH das amostras por meio de fitas de pH, e para melhor aferição e maior certeza, no último dia foi analisado todos os erlenmeyers com o pHmetro.

Para a obtenção dos dados estatísticos, foi realizada uma análise de variância para efeitos principais e interações bacterianas. Para que, fosse possível observar as comparações das médias de efeitos principais, no caso, fator tamponamento, fator pH + vinhaça, e fator tempo. Esses dados foram obtidos através do método de Scott e Knott (1974) e dessa forma foi possível ter uma visualização melhor se o experimento era ou não viável do ponto de vista estatístico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do ponto de vista estatístico, através do Experimento Fatorial com 3 fatores, utilizando uma comparação das médias de efeitos principais, pelo método de Scott e Knott (1974), conseguimos visualizar e demonstrar o que ocorreu em cada tratamento (Tabela 1).

Com relação ao efeito no fator A, que é o tratamento com e sem tamponamento, a análise apresentou valores não significativos, ou seja, não fazendo diferença no uso da solução tampão, isso mostra que não haverá a necessidade de misturar essa solução de forma a não encarecer o processo. O

efeito no fator B, que é o tratamento pra neutralizar o pH da vinhaça, também apresentou valores não significativos, ou seja, no processo pode-se utilizar a vinhaça o mais pura possível, o que torna o processo menos custoso e mais ágil, pois desse modo, teremos a vinhaça pura, que necessitará só do acréscimo do micro-organismo na solução. Já a análise do efeito no fator C, que é a relação de dias que o micro-organismo ficou em meio a solução, apresentou valor significativo, isso acontece, pois o *Bacillus* começa a ter uma queda de viabilidade depois do quinto dia, ou seja, o ideal é a utilização dessa vinhaça até o quinto dia da inoculação, pois a partir dessa data, existe uma queda significativa de micro-organismos viáveis presentes na solução.

Tabela 1- Dados obtidos através do Experimento Fatorial com 3 fatores, pelo método de Scott e Knott (1974).

Causa de variação	Fatores	Médias
Tamponamento	Sem tamponamento	11.642.500 a ¹
	Com tamponamento	11.128.750 a
Diluição da vinhaça e controle do pH	100 ml vinhaça sem ajuste de pH	11.772.500 a
	100 ml vinhaça com ajuste de pH	11.731.667 a
	80 ml vinhaça + 20 ml de H ₂ O com ajuste de pH	11.059.167 a
	70 ml vinhaça + 30 ml de H ₂ O com ajuste de pH	10.979.167 a
Tempo (dias)	1	13.983.333 a
	2	14.387.500 a
	3	14.693.750 a
	4	15.354.167 a
	5	13.933.333 a
	6	11.839.583 b
	7	9.731.250 c
	8	8.337.500 c
	9	6.058.333 d
	10	5.537.500 d
Componentes estatísticos		
F tamponamento (T) = 2,34 ns		F pH + vinhaça (V) = 1,60 ns
F interação T x V = 1,81 ns		F tempo (t) = 48,70**
F interação T x t = 0,59 ns		F interação V x t = 0,30 ns
F interação T x V x t = 0,33 ns		Média geral = 11.385.625
		CV (%) = 22,86

NS = significa que não houve diferença significativa entre os tratamentos testados.

** = significa que houve diferença significativa entre os tratamentos testados com 99% de probabilidade de acerto.

¹ médias seguidas pelas mesmas letras, na coluna e dentro de um mesmo fator, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott.

Portanto foi viável a sobrevivência e multiplicação do micro-organismo em um ambiente com vinhaça e sem tratamento tamponante e de pH, diminuindo o custo do procedimento.

CONCLUSÕES

O *Bacillus subtilis* mostrou capacidade de sobreviver no ambiente com vinhaça, apresentando significativo número de organismos sobreviventes no decorrer dos dias previstos. Existe a possibilidade de usar o micro-organismo no controle biológico de nematoides tendo a vinhaça como agente inoculante na plantação de cana.

AGRADECIMENTOS

A instituição de ensino pela estrutura laboratorial disponibilizada.

REFERÊNCIAS

- FERNANDES, N.; VIEIRA, D. “**Microbiologia Aplicada**”. P.19. Disponível em: <http://estudio01.proj.ufsm.br/cadernos/ifgo/tecnico_acucar_alcool/microbiologia_aplicada.pdf> Acesso em 17 de ago 2018
- SANTIAGO, A.D; ROSSETTO, R. “**Adubação – Resíduos alternativos**”. Embrapa, 2016a. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_39_711200516717.html>. Acesso em 16 de out 2016.
- SANTIAGO, A.D; ROSSETTO, R. “**Nematoides**”. Embrapa, 2016b. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_54_711200516718.html>. Acesso em 15 out 2016.
- SCOTT, A. J; KNOTT, M. “**A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance**”. Biometrics, p.507-512, 1974.